



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

Talita Martins

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA
QUIMICAMENTE RETICULADOS PARA APLICAÇÃO POTENCIAL
NO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Belo Horizonte
2013

Talita Martins

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA
QUIMICAMENTE RETICULADOS PARA APLICAÇÃO POTENCIAL
NO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Ciência e Desenvolvimento de Materiais

Linha de Pesquisa: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior

Belo Horizonte
2013

Martins, Talita.

Síntese e caracterização de hidrogéis de quitosana quimicamente reticulados para aplicação potencial no tratamento tópico de lesões cutâneas / Talita Martins. - 2013.

87 f. : il., tabs., grafs., fotos. -

Orientador: Ezequiel de Souza Costa Júnior.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2013.

Bibliografia.

1. Quitosana. 2. Ligações cruzadas. 3. Hidrogel. 4. Ácidos Adípicos. 5. Etildimetilaminopropil Carbodi-Imida. 6. Biomateriais Poliméricos. I. Costa Júnior, Ezequiel de Souza. II. Título.

CDD: 620.192

Folha de aprovação

Talita Martins

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA QUIMICAMENTE
RETICULADOS PARA APLICAÇÃO POTENCIAL NO TRATAMENTO TÓPICO DE
LESÕES CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia de Materiais.

Aprovada em ___ de _____ de 2013.

Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Jr. - orientador

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Prof. Dr. Alexandre Rangel de Sousa

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Lívio Bruno Jacques da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico esse trabalho a minha amada mãe
Lúcia, que diante de todos os desafios esteve
incondicionalmente do meu lado.

A você dedico minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a meus familiares que tanto me apoiaram e ensinaram durante toda minha jornada e que o continuam fazendo, que suportaram minha ausência de forma compreensiva e que enxergaram de forma tão clara o quanto esse tempo era importante para minha formação profissional e pessoal, especialmente minhas primas Aline, Geórgia e Letícia, minhas irmãs em todos os sentidos, minha tia Irene, minha segunda mãe, meu tio Benício, tia e primas, meu tio João Batista (*"in memoriam"*), meus avós maravilhosos, Sebastiana e João ao meu irmão amado Fernando e principalmente a minha querida mãe Lúcia, a melhor amiga que uma pessoa pode desejar.

Aos meus amigos, aqueles que verdadeiramente se alegram com as minha conquistas, essa família que Deus me permitiu escolher e participar dos bons e dos maus momentos de minha vida. Em especial Verônica, Amanda Lobato, Amanda Rocha, Taís, Fernanda, Tamara, Débora, Michelle, Marcus Vinícius, Franklyn, Massote, Luciana, João, Leonardo e família, Felipe, Giselle (*"in memoriam"*), e tantos outros da mesma forma amados.

Ao meu orientador Professor Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior, pela amizade e convivência, que muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, que teve paciência e generosidade em momentos que muitos não teriam e cuja confiança no meu trabalho, me permitiu efetuá-lo de forma livre o suficiente para me tornar estruturalmente independente e mesmo assim não me deixando sem amparo e instrução nos momentos cruciais.

Aos professores Rachel Mary Osthues, Sidney Nicodemos da Silva, Joel Romano Brandão, Daniel Soares Leal, Ricardo José Alves e Carlos Alexandre Vieira, que foram também meus orientadores em vários sentidos, que me auxiliaram em momentos tão importantes e que acreditaram em mim desde o começo.

Aos professores Wellington Lopes e Alexandre Rangel de Sousa, que com muita paciência me ensinaram, e me auxiliaram tecnicamente neste trabalho.

Aos profissionais amigos Bruno Cordeiro, meu amigo de longas datas e que continua até hoje me auxiliando com seus conhecimento e sua boa vontade e Paulo Renato Paiva, que sem nenhuma obrigação, se dispôs a me auxiliar, tornando possível a execução de partes indispensáveis a esse trabalho. Nunca me esquecerei.

Agradeço a professora Dr. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, a Dr. Jaqueline Gontijo de Souza e Luís, bem como a todo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo auxílio absoluto no desenvolvimento das análises microbiológicas realizadas neste trabalho.

Agradeço de forma especial a Servidora Sonja Bárbara Barczewski do CEFET-MG, uma das pessoas mais generosas com quem pude ter contato durante minha formação do mestrado e que posso dizer com toda clareza, que sem a qual esse trabalho não teria sido iniciado.

Ao Senhor Lívio (Ping Ping Livón), cujo auxílio foi crucial a conclusão desse trabalho. Sua valorosa amizade pretendo levar para toda vida.

A Nayara Gontijo Fernandes, Fernanda De Magalhães Oliveira e Fabrício Rodrigues de Queiroz, pelo convívio, aprendizado e amizade. Agradecer a todos sem agradecer especialmente a vocês, os ratinhos de laboratório mais dedicados do mundo, meus companheiros e professores, as melhores pessoas para se conviver em um ambiente de trabalho. Com certeza nosso laboratório entrará para história como um dos mais fantásticos de se trabalhar e isso eu devo a vocês!

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), minha segunda casa, instituição onde pude conhecer realmente quem sou, onde pude firmar minha personalidade e abrir minha mente para as descobertas e sempre estar atenta as mudança, agradeço pela oportunidade, apoio e suporte absoluto ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo grande auxílio direto e indireto no desenvolvimento de várias etapas do trabalho.

Agradeço a Empresa Inside Materiais Avançados Ltda, por nos fornecer de forma gratuita alguns dos reagente utilizados durante a pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus colegas, que me auxiliaram durante todo nosso processo de aprendizagem e me incentivaram na busca de novos conhecimentos, especialmente a Luciana, João, Mailson, Hugo, Ramiro, Myrtes, Layla e Jacqueline.

E por fim e acima de tudo a Deus, por tudo o que ele representa em minha vida, por tudo que ele me permitiu ser hoje e me permitirá fazer no futuro.

A todos agradeço imensamente.

“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer.”

Albert Einstein.

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano correspondendo a 20% da massa corporal total. Dentre outras funções a mais importante é corresponder a primeira barreira imunológica do organismo. Sem a cobertura da pele o organismo se desarmoniza de tal forma que pode ser incompatível com a vida. Portanto, desde a pré-história, o tratamento de feridas, em especial as lesões cutâneas, sofreu modificações com o intuito de melhorar seu processo cicatricial. As lesões cutâneas julgadas como mais significativas para o presente trabalho, são os ferimentos por queimaduras e as úlceras crônicas. Nos estudos de engenharia de tecidos os hidrogéis são de grande interesse, sendo que um dos polímeros que melhor atende as necessidades de um hidrogel para fins biomédicos é a quitosana.

No presente estudo, hidrogéis de Quitosana foram reticulados com ácido adípico na presença de carbodiimida solúvel em água a fim de obter filmes para aplicação potencial no tratamento de lesões cutâneas. A matéria-prima foi caracterizada através de técnicas de viscosimetria, FTIR, titulação potenciométrica, DSC, TGA, DRX. Os filmes produzidos foram por sua vez caracterizados por MO, MEV, DRX, FTIR, DSC, TGA, bem como tiveram avaliadas suas propriedades mecânicas, GI e a transmissão do vapor d'água.

O material investigado apresentou resultados promissores quanto a uma futura utilização como biomaterial, tendo em vista as propriedades mecânicas obtidas e sua viabilidade celular que foi foram compatíveis com as características do tecido epitelial e por tal motivo o coloca como uma possibilidade para engenharia de tecidos. Além de outros resultados como modulação do grau de intumescimento e TVA pela quantidade de reticulações promovidas no material. Espera-se que os resultados obtidos possam permitir a continuidade no estudo desses materiais.

Palavras-chave: Quitosana, Reticulação química, Hidrogel, Ácido adípico, EDAC.

ABSTRACT

The skin is the biggest organ of the body corresponding to 20% of the total body mass. Among other functions, the most important match is the first immunological barrier of the body. Without the cover skin without harmony the organism such that it may be incompatible with life. Therefore, from pre-history, the treatment of wounds, especially skin wounds, was modified in order to improve their healing process. Cutaneous lesions judged as more significant for the present work, the injuries are burns and chronic ulcers. In studies of tissue engineering hydrogels are of great interest, and a polymer that best meets the needs of a hydrogel for biomedical purposes is chitosan.

In this study, chitosan hydrogels were crosslinked with adipic acid in the presence of water soluble carbodiimide to obtain films for potential application in the treatment of skin lesions. The raw material was characterized by techniques of viscometry, FTIR, potentiometric titration, DSC, TGA, XRD. The films were produced in turn characterized by OM, SEM, XRD, FTIR, DSC, TGA, and their mechanical properties were evaluated, GI and transmission of watervapor.

The material investigated showed promising results as for future use as biomaterial, in view of its mechanical properties and cell viability was that were compatible with the characteristics of epithelial tissue, and thus makes it a potential for tissue engineering. In addition to other modulation results as the degree of swelling and TVA promoted by the amount of crosslinking in the material. It is expected that the results may enable the continued investigation of these materials.

Keywords: Chitosan, Chemical Crosslinking, Hydrogel, Adipic Acid, EDAC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desacetilação alcalina da quitina, obtendo-se o produto quitosana.....	23
Figura 2 – Possibilidades de derivados das reações efetuadas com os grupos reativos da quitosana.....	24
Figura 3 – Estrutura química, fórmula e massa molar do do ácido hexanodioico.....	27
Figura 4 – Histologia da pele normal.....	30
Figura 5 – Fotografia de úlcera venosa consequência da IVC.....	34
Figura 6 – Fluxograma das etapas propostas para execução do trabalho.....	36
Figura 7 – Curva DSC da amostra de Quitosana sob atmosfera de N ₂ (30 a 500 °C).....	45
Figura 8 – Curva DSC da amostra de Quitosana sob atmosfera de N ₂ (-50 a 150 °C).....	46
Figura 9 – Curvas TG da amostra de Quitosana sob atmosfera de N ₂ (0 a 900°C).....	47
Figura 10 – Curva da Titulação Potenciométrica da QUI.....	49
Figura 11 – Curva da derivada primeira da Titulação Potenciométrica da QUI.....	49
Figura 12 – Viscosidade aparente em função da concentração do polímero QUI em solução de ácido acético 1% (v/v) sob temperaturas de 24 °C.....	51
Figura 13 – Difrátograma da matéria-prima Quitosana.....	52
Figura 14 – Espectro de FTIR e estrutura química da Quitosana.....	53
Figura 15 – Proposta de mecanismo para obtenção do derivado reativo do ácido adípico (1) seguido da reticulação química da quitosana.....	55
Figura 16 – Filmes de Quitosana e ácido adípico com 0,0%, 0,6% e 0,11% de EDAC.....	56
Figura 17 – Imagens de microscopia óptica de luz polarizada dos filmes lavados de Quitosana e ácido adípico com (A) 0,00%, (B) 0,06% e (C) 0,11% de EDAC (aumentos de 05X, 10X e 20X).....	57
Figura 18 – Fotomicrografias dos filmes de Quitosana e ácido adípico com (A) 00,%, (B) 0,6% e (C) 0,11% de EDAC, obtidas por MEV.	58

Figura 19 – Espectros de infravermelho dos filmes de Quitosana e ácido adípico com (a) 0,00%, (b) 0,06% e (c) 0,11% de EDAC, obtidas por FTIR.....	59
Figura 20 – Difratoograma dos filmes de Quitosana e ácido adípico com Filme A 0,00%, Filme B 0,06% e Filme C 0,11% de EDAC, obtidas por DRX.....	62
Figura 21 – Gráfico de Tensão x Deformação apresentando as curvas (a), (b) e (c) respectivamente dos filmes A 00,%, filme B 0,6% e filme C 0,11% de EDAC.....	64
Figura 22 – Perfil de intumescimento dos filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) no pH 4.....	65
Figura 23 – Perfil de intumescimento dos filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) no pH 7.....	66
Figura 24 – Esquema do sistema utilizado para as análises de Transmissão de Vapor D'água: (a) Copo de Paddington modificado, (b) Filme preso ao copo de Paddington modificado e (c) Sistemas montados no dessecador.....	67
Figura 25 – Perda de peso dos sistemas com os filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) em função do tempo.....	68
Figura 26 – Curvas de DSC das amostras dos filmes A com 0,00% (a) de EDAC, filmes B com 0,06% de EDAC (b) e filmes C com 0,11% de EDAC sob atmosfera de N ₂ (30 a 300 °C).....	71
Figura 27 – Curvas de TGA das amostras dos filmes A com 0,00% (a) de EDAC, filmes B com 0,06% de EDAC (b) e filmes C com 0,11% de EDAC sob atmosfera de N ₂ (25 a 500 °C).....	73
Figura 28 – Imagens feitas por MO dos filmes (a) 0,00%, (b) 0,06% e (c) 0,11% de EDAC após 24 do cultivo das células BHK-21 e VERO respectivamente e 2 horas após a incubação com MTT.....	75
Figura 29 – Viabilidade de células VERO analisadas com a metodologia de MTT.....	76
Figura 30 – Viabilidade de células BHK-21 analisadas com a metodologia de MTT.....	76
Figura 31 – Imagens de MEV para os filmes A, B e C respectivamente, evidenciando morfologia, adesão e proliferação das células BHK-21.....	78
Figura 32 – Imagens de MEV para os filmes A, B e C respectivamente, evidenciando morfologia, adesão e proliferação das células VERO.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do grau de profundidade da lesão por queimadura.....	33
Tabela 2 – Bandas características do espectro no infravermelho esperadas para matéria-prima Quitosana.....	39
Tabela 3 – Identificação dos hidrogéis de acordo com as concentrações da carbodiimida EDAC, pela solução total.....	39
Tabela 4 – Bandas características do espectro no infravermelho esperados para Quitosana pós processo de reticulação.....	40
Tabela 5 – Resumo dos resultados de TGA e DSC para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) da amostra de Quitosana sob atmosfera de nitrogênio.....	48
Tabela 06 – Viscosidades aparentes (cP) da QUI em função da velocidade de rotação e concentração do polímero em % (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v).....	50
Tabela 7 - Bandas características do espectro no infravermelho encontradas na matéria-prima Quitosana.....	53
Tabela 8 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme A com 0,00% de EDAC.....	60
Tabela 9 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme B com 0,06% de EDAC.....	61
Tabela 10 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme C com 0,11% de EDAC.....	61
Tabela 11 – Valores de Tenacidade, Tensão de ruptura e Módulo de elasticidade com seus respectivos valores de desvio padrão.....	63
Tabela 12 – Valores de perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água dos filmes..	67
Tabela 13 – Valores da perda de água por evaporação encontrados por Lamke et al.(1977) em seus estudos para determinadas condições do tecido epitelial.....	69
Tabela 14 – Resumo dos resultados de TGA e DSC para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) das amostras dos filmes de QUI/Ácido adípico sem e com adição do ativador EDAC sob atmosfera de nitrogênio.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

σ	Tensão de tração
ASTM	American Society Testing and Materials
BHI	Brain Heart Infusion
DE	Deformação específica
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E	Módulo de elasticidade
EDAC	Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GC	Grau de cristalinidade
GD	Grau de desacetilação
GI	Grau de intumescimento
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
MM	Massa Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
pH	Potencial hidrogeniônico
QUI	Quitosana
SCQ	Superfície Corpórea Queimada
T _c	Temperatura de cristalização
T _g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Termogravimetria
T _m	Temperatura de fusão
T _n	Tenacidade
TVA	Transmissão do vapor d'água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS E PLANOS DE TRABALHO.....	20
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Biomateriais.....	21
3.2 Quitosana.....	22
3.2.1 Histórico e processo de obtenção.....	22
3.2.2 Estrutura química e derivados.....	23
3.2.3 Características Físico - Químicas da quitosana.....	24
3.2.4 Propriedades e aplicações da quitosana.....	25
3.3 Processos de reticulação.....	26
3.3.1 Ácido adípico.....	27
3.4 Hidrogéis.....	28
3.5 Anatomia, histologia e fisiologia da pele.....	29
3.6 Lesões cutâneas.....	30
3.6.1 Queimaduras.....	31
3.6.2 Úlceras Venosas.....	33
3.7 Tratamento das lesões cutâneas: queimadura e úlcera venosa.....	35
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Materiais.....	36
4.2 Etapas de desenvolvimento do trabalho.....	36
4.3 Controle de Qualidade da Matéria prima.....	37

4.3.1 Estudo do comportamento térmico da quitosana.....	37
4.3.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana.....	37
4.3.3 Determinação da Viscosidade Aparente da quitosana.....	38
4.3.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade da quitosana.....	38
4.3.5 Análise dos grupos químicos da quitosana.....	38
4.4 Preparo dos filmes.....	39
4.5 Caracterização Física dos filmes de hidrogel.....	40
4.5.1 Análise morfológica dos filmes.....	40
4.5.2 Caraterização dos grupos químicos dos filmes.....	40
4.5.3 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes.....	41
4.5.4 Caracterização das propriedades mecânicas.....	41
4.5.5 Medida do grau de intumescimento (GI).....	41
4.5.6 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA).....	42
4.5.7 Análise do comportamento térmico dos filmes.....	42
4.6 Caracterização Biológica dos filmes de hidrogel por metodologia In Vitro.....	43
4.6.1 Análise da viabilidade celular por MTT.....	43
4.6.2 Análise da Adesão celular	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Controle de Qualidade da Matéria prima.....	45
5.1.1 Estudo do comportamento térmico da quitosana.....	45
5.1.2 Determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana.....	48
5.1.3 Determinação da Viscosidade Aparente da quitosana.....	50
5.1.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade da quitosana.....	51
5.1.5 Análise dos grupos químicos da quitosana.....	52
5.2 Reticulação Química da Quitosana com Ácido Adípico.....	54
5.3 Caracterização Física dos filmes de hidrogel.....	55
5.3.1 Avaliação qualitativa dos filmes.....	48

5.3.2 Análise morfológica dos filmes.....	57
5.3.2 Caracterização Física dos filmes de hidrogel.....	52
5.3.3 Caraterização dos grupos químicos dos filmes.....	59
5.3.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes.....	62
5.3.5 Caracterização das propriedades mecânicas.....	63
5.3.6 Medida do grau de intumescimento (GI).....	65
5.3.7 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA).....	66
5.3.8 Análise do comportamento térmico dos filmes.....	70
5.4 Caracterização Biológica dos filmes de hidrogel por metodologia <i>In Vitro</i>	74
5.4.1 Análise da viabilidade celular por MTT.....	74
5.4.2 Análise da Adesão celular	76
6 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, o tratamento de feridas, em especial as feridas cutâneas, sofreu modificações com o intuito de melhorar seu processo cicatricial, tornando-o cada vez mais rápido e com maior conforto ao paciente. Plantas, água e até lama já foram utilizados como tentativas para otimização desse processo, bem como mel, lã e cascas de árvores e outros materiais que não obtiveram sucesso em suas aplicações, muito provavelmente por processos infecciosos subsequentes. Pesquisas revelaram que os egípcios ao longo de sua história, utilizaram mais de 700 substâncias destinadas ao tratamento de lesões. Mas foi em 200 dC, que Celsus efetuou um trabalho de classificação dos tipos de feridas, seus sinais, bem como formas de tratamentos destinados a elas. No entanto, mesmo com a defesa do controle da infecção por personagens históricos como Lister e Pasteur durante o início de século XX, foi somente em 1960 que a ideia da manutenção de um leito úmido e limpo era a ideal para o processo de cicatrização das lesões (ANDRADE, 1992; CANDIDO, 2001).

As lesões cutâneas julgadas como mais significativas para o processo de execução do presente trabalho, são os ferimentos por queimaduras, por serem provavelmente as lesões de ocorrência mais profunda que podem acometer os tecidos moles e as úlceras crônicas, em especial, as úlceras venosas, consideradas nos estudos de Sellmer e seus colaboradores (2008) como um problema de saúde pública, não só no Brasil, mas em todo o mundo.

Dentro dos estudos da engenharia de tecidos referentes aos tratamentos de lesões, especialmente no que se refere aos estudos de novos tipos de curativos que sejam ideais a manutenção de um ambiente adequado a cicatrização no leito da ferida, os hidrogéis apontam como biomateriais possuidores de propriedades que os tornam de grande interesse. Propriedades essas como: manutenção do teor de água, hidrofiliabilidade, expansibilidade, permeabilidade seletiva, consistência macia e baixa tensão interfacial (WANG et al., 2004).

Os hidrogéis são baseados em ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas ou seja, pela reticulação dos polímeros. Portanto, até mesmo o grau dessa reticulação deve ser bem delineado observando que sua proporção pode gerar alteração nas características físico-química e mecânicas do hidrogel sintetizado.

Um dos polímeros que melhor atende as necessidades de um hidrogel para fins biomédicos é a quitosana (QUI), proveniente da N-desacetilação da quitina, polissacarídeo natural de

maior abundância na superfície terrestre e constituinte do exoesqueleto de crustáceos e insetos. A quitosana apresenta, dentre outras propriedades, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e grande adesividade, justamente por possuir uma natureza policatiónica. Os agentes reticulantes utilizados na produção de hidrogéis devem ser moléculas de baixa massa molar e que possuam grupos funcionais reativos para permitir o inter cruzamento entre as cadeias e preferencialmente atóxicos, no entanto a maioria dos reticulantes apresentam alguma toxicidade, isso faz com que seus resíduos tenham de ser removidos ou extraído após a preparação (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; BERGER et al., 2004) .

Diante das informações apresentadas o objetivo proposto para este trabalho é estudar a produção de hidrogéis de quitosana reticulados com ácido adípico, acidulante não tóxico utilizado na indústria de alimento como substituto do ácido cítrico, ou seja, que não exige etapa de remoção de resíduos tóxicos, pois não os produz, na presença de carbodiimida solúvel em água, caracterizando-os de forma a verificar a possibilidade de sua utilização como biomaterial destinado ao tratamento tópico de lesões cutâneas.

2 OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo proposto para este trabalho é estudar a obtenção e caracterização de hidrogéis do polímero quitosana reticulados quimicamente com ácido adípico por uma reação mediada por uma carbodiimida solúvel em água bem como a possibilidade de utilização como biomaterial destinado ao tratamento de lesões cutâneas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o intuito de atingir o objetivo geral, é proposto o seguinte plano de trabalho:

- Caracterizar o polímero matéria-prima quitosana mediante técnicas de viscosimetria, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), titulação potenciométrica, comportamento térmico, e difração de raio-X visando identificar as propriedades e características químicas dos mesmos.
- Obter filmes de quitosana por meio da reticulação química com ácido adípico por uma reação mediada pela carbodiimida solúvel em água Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC).
- Caracterizar os filmes obtidos mediante técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, difratometria de raios-X, bem como, avaliar as propriedades mecânicas dos filmes, seu comportamento térmico, grau de intumescimento e a transmissão do vapor d'água.
- Avaliar a citotoxicidade dos hidrogéis obtidos *in vitro* analisando o potencial de degeneração ou morte celular utilizando o ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e a adesão celular nos filmes obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Os tratamentos dados às várias formas de degradação dos tecidos do corpo humano, sejam elas provocadas por injúrias ou por doenças exigem cada vez mais novas tecnologias que possibilitem a reparação, substituição ou regeneração dos tecidos lesados. Afim de atender a essa necessidade a Engenharia de Tecidos vem trabalhando em substitutos biológicos que não somente preencham, mas que permitam a restauração e a melhoria do funcionamento do tecido afetado (O'BRIEN, 2011).

Os biomateriais são portanto uma das bases principais nos estudos de Engenharia de Tecidos e apesar de já terem sido usados por décadas, principalmente por invenções sem nenhum embasamento científico, trata-se de um campo jovem de estudos, tendo em vista que os biomateriais modernos proveem do final dos anos 40, e desde então e cada vez mais a biologia molecular associada a ciência dos materiais, a bioengenharia e a química vem trabalhando as cerâmicas, os metais e os polímeros como biomateriais (REICHERT, 2010).

A definição atual para Biomateriais, dada pela Sociedade Européia de Biomateriais é "material destinado a interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo". Portanto, hoje o estudo de biomateriais não passa apenas pelo processo de interação com o hospedeiro, mas trabalha com o objetivo de reprodutibilidade da função do tecido e sua regeneração (O'BRIEN, 2011).

A utilização dos biomateriais em determinados tecidos exige um estudo minucioso que vai desde o local do organismo onde será utilizado, o tipo de material a ser utilizado em sua confecção, a tecnologia de obtenção do material e o processo de confecção do produto final. Esses fatores podem alterar requisitos imprescindíveis a um biomaterial. O maior desses requisitos é sem dúvida a biocompatibilidade do mesmo com o tecido à ser implantado, ou seja, ele deve permitir o crescimento das células e sua adesão bem como seu funcionamento normal e produzir com isso uma resposta imunológica insignificante (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; O'BRIEN, 2011).

No entanto requisitos como bioatividade, propriedades mecânicas aprimoradas e a biodegradabilidade, são cada vez mais o foco de estudos dentro desse campo de pesquisa, pois possibilitam uma gama ainda maior de aplicações para o material e cada vez mais se

aproxima do objetivo de auxílio no processo de regeneração do tecido lesado (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; O'BRIEN, 2011).

Diante dessas novas necessidades e possibilidades, os polímeros biodegradáveis tem se mostrado promissores. A biodegradação, que trata do processo de decomposição dos materiais executado pelo organismo vivo ao qual serão implantados, ou expostos, pode se dar por ação dos processos físico-químicos do meio *in vivo* onde ele se encontra, ou a partir da ação de enzimas, de forma que suas macromoléculas são convertidas em compostos mais simples. As taxas em que essa degradação ocorre é que dependerão tanto do tipo de polímero, sua morfologia e o tipo de interperie ao qual será submetido, portanto, a escolha adequada do polímero para confecção de um biomaterial deve levar em conta todas essas condições (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

3.2 Quitosana

A quitosana (QUI) é constituída predominantemente por unidades D-glicosamina, proveniente da desacetilação da quitina, um polissacarídeo constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina de extrema abundância na natureza, constituinte do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Suas características estruturais permitem que a quitosana tenha utilização em uma vasta gama de áreas, sendo constantemente tema de estudos por todo o mundo (DUTTA; DUTTA ; TRIPATHI, 2004; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

3.2.1 Histórico e processo de obtenção

A quitina foi o primeiro polissacarídeo descrito, antes mesmo da celulose, sendo o segundo polímero mais abundante da terra. Descoberta por Henri Braconnot em 1811, sua descrição foi baseada em algumas reações realizadas sobre o material bruto isolado a partir de fungos, posteriormente, foi descoberta sua presença também em crustáceos e artópodes (MUZZARELLI, 2012).

Anos depois, em 1859 um pesquisador chamado C. Rouget ao submeter a quitina a um tratamento com hidróxido de sódio à quente, acabou por descobrir a quitosana, derivado esse que possui propriedades diferentes do polímero original, sendo uma das mais importantes, a solubilidade em algumas soluções ácidas (GOOSEN, 1997)

A Obtenção da quitosana através da quitina ocorre, portanto, por um processo de desacetilação, onde a quitina reage em uma solução alcalina, NaOH normalmente, $\geq 40\%$

sob agitação e aquecimento em torno de 100 °C por aproximadamente 2 horas. O produto obtido é lavado e seco. Se o processo de N- Desacetilação ocorrer em um grau $\geq 50\%$ dos grupos N-acetil da quitina, essa passa a ser considerada quitosana (Figura 1) (MOURA et al., 2006; SANTOS, 2004; MUZZARELLI, 2012; COSTA Jr; MANSUR, 2008).

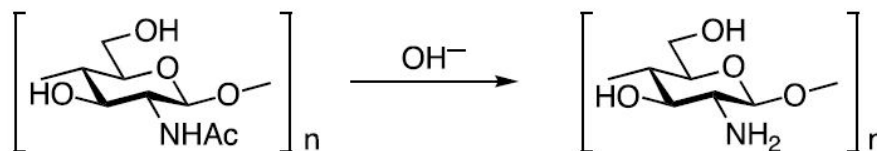


Figura 1 – Desacetilação alcalina da quitina, obtendo-se o produto quitosana.

Fonte: KURITA, 2006.

A produção comercial da quitina e da quitosana é feita pelo reaproveitamento dos rejeitos da indústria pesqueira a partir da carapaça de caranguejos, camarões, lagostas e krills. O descarte desses polímeros é um dos principais fatores de poluição das zonas costeiras, portanto sua utilização para outros fins, que não só a indústria de alimentos, pode significar uma colaboração com uma importante questão ambiental (SANTOS, 2004; DUTTA; DUTTA ; TRIPATHI, 2004).

3.2.2 Estrutura química e derivados

A quitosana é um polímero linear constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicose ligadas por ligações do tipo β -(1-4). Apresenta ao longo de sua cadeia grupos amino ($-\text{NH}_2$) na posição C-2, grupos hidroxila primários ($-\text{OH}$) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico. Além disso, são potencialmente reativos, sendo que a ordem de reatividade decresce do C2 > C6 > C3, isso acaba por permitir uma vasta gama de possibilidade de ligações com outras moléculas e reticulações (Figura 2, página 19). Tais modificações na sua estrutura permitem a criação de novos materiais, derivados possuidores de características específicas que podem ser potencializadas para determinadas aplicações (SANTOS, 2004; COSTA Jr., 2008).

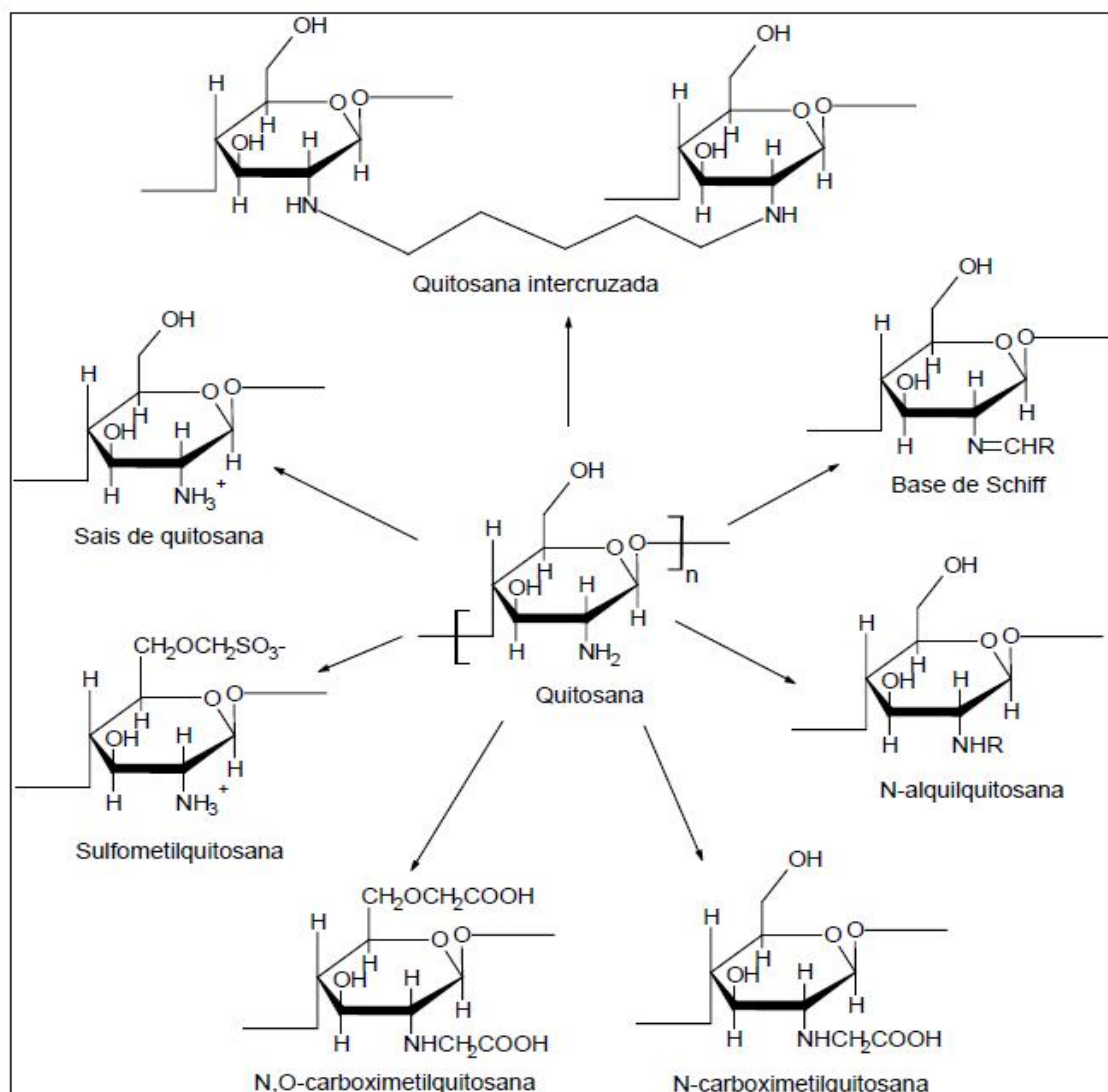


Figura 2 – Possibilidades de derivados das reações efetuadas com os grupos reativos da quitosana.

Fonte: COSTA Jr, 2008.

3.2.3 Características Físico-Químicas da quitosana

A quitosana, em meios apropriados, é um polieletrólito catiônico, o que a diferencia da maioria dos polissacarídeos de ocorrência natural que são polianiónicos e de natureza ácida. Essa característica físico-química leva a quitosana a apresentar natureza básica ($pK_a = 6,3$) (SANTOS, 2004; SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

Como trata-se de um polímero, a quitosana pode ser encontrada na forma semicristalina e amorfa. Além dessas características, o grau de desacetilação (GD), que representa a

percentagem de grupos NH_2 livres, apresentado pelo polímero é, provavelmente, dentre todas, a mais importante, pois a maioria de suas propriedades são dependentes desse fator. A solubilidade deste polímeros em soluções de ácidos orgânicos ou inorgânicos cujo pH esteja abaixo de 6 e o mais próximo de 3 é devida a desacetilação, isso ocorre porque nessa faixa de pH os grupos amino da cadeia do polímero estão protonados e os mesmos encontram-se carregados positivamente. Isso leva à repulsão entre as cadeias e a maior solvatação, portanto, quanto mais grupos amino carregados positivamente, maior a solubilização da quitosana no meio e quanto maior o grau de desacetilação da quitosana maior a quantidade de ácido necessária para levar a completa solubilização (SANTOS, 2004; RINAUDO, 2006).

3.2.4 Propriedades e aplicações da quitosana

Trata-se de um polímero com propriedades muito importantes e de interesse principalmente para aplicação no campo biomédico em engenharia de tecidos já que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana, boa adsorção, solubilidade dependente do pH do meio e grande adesividade e atração pelos tecidos, características essas relacionadas a sua natureza policatiônica e com intensidade de acordo com o seu grau de desacetilação (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

Dentre as aplicações industriais, pode ser utilizada: nos três ramos da cosmética, cuidados com a pele, com os cabelos e higiene bucal; na engenharia da água, principalmente no que se refere ao tratamento da água de efluentes industriais e esgotos comuns; na produção de papel, como substituinte da celulose; na indústria de alimentos como películas conservadoras, aumentando a vida de prateleira de frutas e etc (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

Já para aplicações biomédicas, possui potencial para ser utilizada: membranas semipermeáveis destinadas a hemodiálise; na engenharia de tecidos pode ser usada como *scaffold* para crescimento de células e no estudo de regeneração de tecidos, como ósseo, cartilaginoso e até mesmo estudos em tecidos neurológicos e no desenvolvimento de pele artificial; grande potencial para a produção de curativos cutâneos antimicrobianos e aceleradores do processo cicatricial; para aplicação também em sistemas de liberação de fármacos devido, além de suas características aderentes, a manutenção da integridade do tecido e a possibilidade de utilização de uma gama diferenciada de ativos, incluindo ativos hidrofílicos (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

No Brasil sua utilização é permitida como alimento funcional, sendo comercializada na forma de cápsulas para o auxílio a redução da absorção de gordura e colesterol (BRASIL, 2008).

3.3 Processos de reticulação

A reticulação é um processo baseado na interligação de cadeias mediante a reação das mesmas com uma substância química bifuncional, capaz de gerar uma rede tridimensional polimérica mais rígida, com menor mobilidade das cadeias.

Existem estudos que utilizam a radiação gama como indutor do processo de reticulação de polímeros com grande sucesso, no entanto, esse tipo de processo pode acarretar na cisão molecular do material pela ruptura da molécula, emissão de moléculas e fragmentos moleculares. Para que esta circunstância seja evitada, a escolha do polímero que passará pelo procedimento de radiação, bem como a dose de radiação a ser aplicada é imprescindível para que o sucesso da reticulação seja alcançado (SADAHIRA, 2007).

As moléculas bifuncionais envolvidas no processo de reticulação são chamadas de agentes reticulantes. Essas moléculas devem possuir massa molecular inferior ao peso molecular da cadeia polimérica em questão. A bifuncionalidade é um parâmetro essencial ao processo de reticulação, já que somente com o mínimo de dois grupos reativos esse será capaz de interligar as cadeias do polímero, outro parâmetro desejado é a não toxicidade dessa molécula (BERGER et al., 2004; COSTA Jr., 2008)

Porém a maior parcela dos agentes de reticulação existentes são tóxicos, ou potencialmente tóxicos e os seus resíduos têm que ser removidos ou extraído após a preparação (HENNINK; NOSTRUM, 2002).

No processo de reticulação química, normalmente usa-se um excesso do agente reticulante, para que seja garantida a interligação. No entanto, o sucesso da reticulação depende também de outros fatores, como as variáveis de concentração, o tempo de exposição do polímero ao reticulante, a temperatura a qual está sendo executada a reação e o pH ideal para que a reação proceda com a maior eficiência (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; SADAHIRA, 2007).

Quando se trata da quitosana o processo de reticulação ocorre por meio de reações químicas com os sítios reativos da molécula de quitosana sendo os mais reativos os grupos amino e a hidroxila presente no carbono C-2 (GONSALVES et al., 2011).

Os agentes mais tradicionalmente utilizados no processo de reticulação covalente da quitosana são: os aldeídos monofuncionais, ou bifuncionais como o glicoxal e glutaraldeído cuja reticulação produz as chamadas bases de Schiff; álcoois como o 1,2-etanodiol ; epícloridrina (haleto de epóxi-alquila); etilenoglicol diglicidil éter (EDGE); ácidos carboxílicos bifuncionais, ou trifuncionais como agentes de entrecruzamento, tais como ácido nitriloacético, etilenodiaminotetracético e dietilenotriaminopentacético todos dependentes da adição de um ativador dos grupos carboxílicos para que se originem as amidas correspondentes e agentes considerados não tóxicos como a Genipina (COSTA Jr., 2008; GONSALVES et al., 2011).

Os agentes utilizados na reticulação iônica da quitosana podem ser vários, uma vez que o mesmo deve ser apenas misturado a solução de quitosana e deve ionizar-se no pH ao qual será submetido. Através disso, forças intermoleculares do tipo íon-íon acabam por gerar um processo de reticulação, prendendo as cadeias poliméricas por forças eletrostáticas (GONSALVES et al., 2011).

3.3.1 Ácido adípico

O ácido hexanodióico mais conhecido comercialmente como ácido adípico (Figura 3) é um composto orgânico dicarboxílico, utilizado principalmente na fabricação do nylon-6,6, encontrando-se presente nas fibras de carpete, em tapeçaria, em reforço de pneus, em partes de automóveis, também utilizado como acidulante não tóxico na indústria de alimentos como substituinte do ácido cítrico. Age inibindo o crescimento de micro-organismos (LENARDÃO et al., 2003; FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002; GAVA; SILVA; FRIAS, 2009)

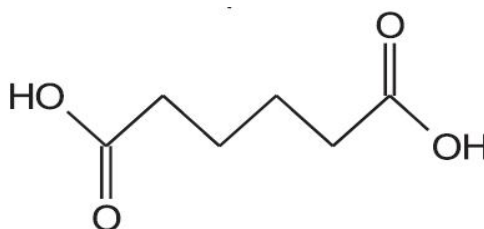


Figura 3 – Estrutura química, fórmula e massa molar do do ácido hexanodioico.

Fonte: adaptado de LENARDÃO et al., 2003.

Seus valores de pKa demonstram uma diferença pequena na dissociação entre as suas duas carboxilas sendo pK_{a1} : 4,43 e pK_{a2} : 5,62. É comercializado normalmente como um pó

branco, e apresenta baixa solubilidade em água (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009; SOLOMONS, 2009).

Sua síntese baseia-se na reação de oxidação de ciclohexanos através do ácido nítrico. A produção mundial do ácido adípico gira em torno de 2,2 milhões de toneladas ano (LENARDÃO et al., 2003).

Sua utilização como agente reticulante em polímeros é possibilitada pela sua bifuncionalidade e já foi descrita em vários estudos, no entanto, quando se trata da reticulação da quitosana o que se espera é a interação iônica entre os grupos carboxilatos desprotonados, ou seja, carregados negativamente com os grupos amino carregados positivamente. Para que ocorra a reticulação química covalente torna-se necessária a adição de uma molécula que aumente a reatividade dos grupos carboxílicos do diácido, justamente o procedimento pretendido e analisado neste trabalho. O fato desse reticulante não possuir toxicidade, faz do mesmo um substituinte ideal a outros reticulantes conhecidamente tóxicos e elimina etapas de neutralização posteriores a reação de reticulação (CHEN et al., 2008; TIKHONOV; RADIGINA; YAMSKO, 1996).

3.4 Hidrogéis

Nos estudos de engenharia de tecidos, as similaridades do material a ser utilizado com o tecido no qual será introduzido são fundamentais para o sucesso da aplicação. Nesse aspecto os hidrogéis possuem propriedades que os tornam de grande interesse na engenharia de tecidos moles, como manutenção do teor de água relativamente alto, possuem hidrofiliabilidade, expansibilidade, permeabilidade seletiva, apresentam uma consistência macia e baixa tensão interfacial com tecidos moles (WANG et al., 2004).

Diante de suas características funcionais e estruturais podem ser definidos como redes poliméricas capazes de reter uma quantidade significativa de água dentro de suas estruturas e intumescer sem que haja dissolução na água (WANG et al., 2004).

Essas redes poliméricas são baseadas em ligações cruzadas entre as cadeias dos polímeros utilizados em sua síntese, ou seja, pela reticulação de polímeros. Portanto, o grau dessa reticulação deve ser bem delineado observando que quanto maior o grau de reticulação apresentado por um hidrogel mais rígida será sua estrutura, e menos intumescimento ela apresentará. Da mesma forma muita atenção deve ser dada aos tipos de grupos químicos laterais apresentados pelos polímeros utilizados, pois quanto maior a

quantidade de grupos hidrofílicos, maior a absorção e retenção de fluidos pelo hidrogel (PEPPAS, 2000).

3.5 Anatomia, histologia e fisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano correspondendo a 20% da massa corporal total. Corresponde à primeira barreira imunológica, ou seja, sua primeira e principal função é a proteção, além de exercer as funções de nutrição, pigmentação, termo-regulação, transpiração, perspiração e absorção tendo relevância inclusive com a capacidade de socialização do indivíduo (SOUZA, 2003).

Derivada da Ectoderme e Mesoderme é anatomicamente constituída por três camadas:

- Epiderme: Originada na ectoderme é a porção constantemente renovada da pele, não possuidora de vasos e de espessura variável. Trata-se da camada protetora sendo formada pelo estrato córneo (EC), o estrato translúcido, a camada granulosa, camada espinhosa e a camada basal (SOUZA, 2003).
- Derme: Camada formada por mucossacarídeos ácidos, que são os grandes responsáveis pela fixação da epiderme e da própria derme, por polissacarídeos glicoprotéicos, eletrólitos e diversas células conjuntivas (SOUZA, 2003).
- Hipoderme: Com propriedades protetoras e de variação térmica possui vascularização profunda. A hipoderme é uma camada basicamente formada por tecido adiposo, fazendo parte desse pigmento lipocrômico, colesterol, vitaminas e água (SOUZA, 2003).

Além dessas camadas, a pele é constituída pelas glândulas sudoríparas e pilossebáceas responsáveis pela liberação de secreções através da mesma. É constituída quimicamente por água, sódio, potássio, magnésio, e cloro, bem como de carboidratos, lipídeos, especialmente o colesterol e proteínas como colágeno e a elastina (SOUZA, 2003; ARENAS, 2005). Na figura 4 (página 30) está representada a histologia da pele normal.

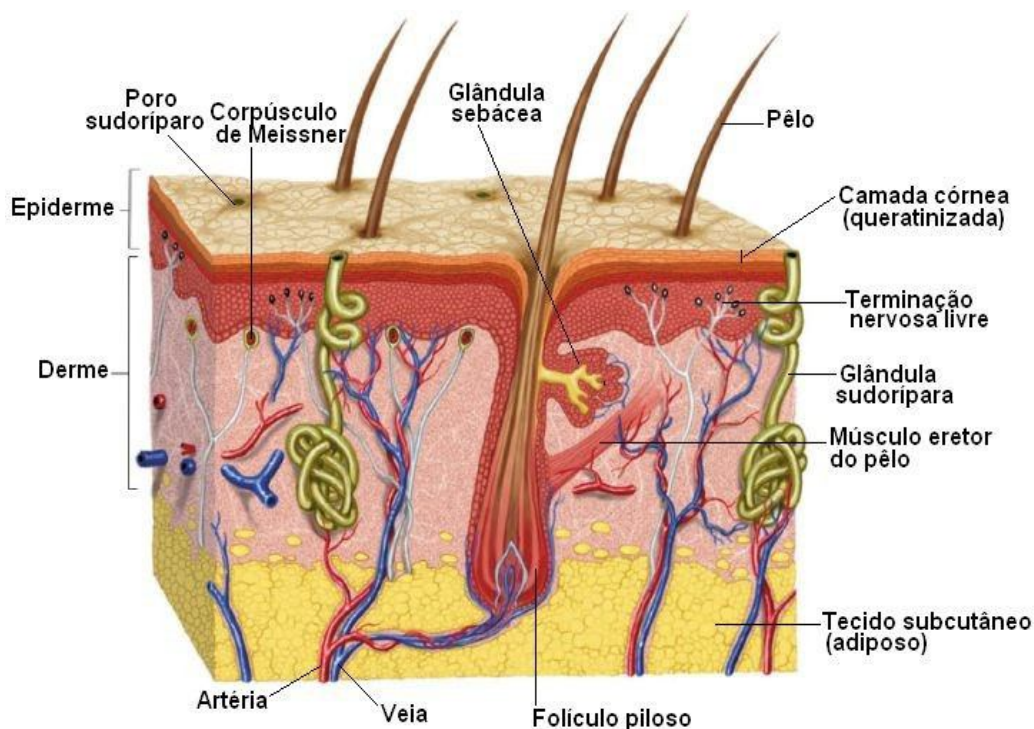


Figura 4 – Histologia da pele normal.

Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>

A absorção cutânea não possui padrão específico para todas as pessoas e tipos de pele, sendo condicionada a 3 fatores principais, a pele e suas condições de saúde, a natureza da substância que se deseja introduzir por essa via e o veículo escolhido para essa introdução, pois substâncias mais lipofílicas são mais capazes de penetrar no EC. A pele lesada, bem como a pele sob efeito de substâncias queratolíticas, alcalinas, possui maior fator de absorção cutânea pois o pH da mesma situa-se em torno de 4,5, variando de acordo com a região do corpo. Portanto a escolha do local de aplicação também acaba por interferir nessa absorção (SOUZA, 2003).

Sem a cobertura da pele o organismo se desarmoniza de tal forma que pode ser incompatível com a vida, como ocorre com algumas doenças congênitas e em casos de queimaduras. Sendo considerada por muitos como um reflexo da saúde e das emoções de uma pessoa (ARENAS, 2005).

3.6 Lesões Cutâneas

As lesões caracterizam-se por uma anormalidade do tecido, que pode acarretar em uma perda de sua integridade e/ou funcionalidade, provocada por doença ou injúria.

Quando essas anormalidades ocorrem na pele, são chamadas de lesões cutâneas. Essas podem ocorrer em vários níveis de gravidade e sob várias formas, sendo as lesões por queimaduras e as úlceras venosas consideradas as mais significativas para o processo de execução do presente trabalho.

Quando se trata de lesões leves, ou seja, de menor profundidade a regeneração da epiderme é realizada por um processo rápido acarretando na cura aparentemente total e normal do tecido. No entanto quando se trata de uma lesão de grande profundidade, que comprometa a derme, a regeneração do tecido, tal como era, não ocorre, levando a formação de um tecido conjuntivo no local e com isso o fechamento da ferida (BELDON, 2010; MUTSAERS et al., 1997).

Após a lesão, inicia-se uma cascata de ocorrências bioquímicas que se mantém ininterruptas até que ocorra o reparo do tecido, e a esse tipo de lesão é dado o nome de aguda. Porém, existem lesões cujo processo ordenado de reparo é, por algum motivo, interrompido e a essas é dado o nome de lesões, ou feridas crônicas (BELDON, 2010; GABRIEL, 2011).

3.6.1 Queimaduras

As queimaduras são provavelmente o tipo de lesão mais profunda que podem acometer os tecidos moles, suas formas mais severas contribuem fundamentalmente em traumas fisiológicos e psíquicos (RNJAK et al., 2011).

As queimaduras podem ser definidas como lesões nas quais um tecido é submetido a ação do calor, de produtos químicos, ou da eletricidade (MANUAL MERCK). Essas três formas de queimaduras são resultado da ruptura dos queratinócitos o que desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que culminam em um processo de inflamação aguda local e sistêmica, sendo esses processos dependentes do tempo de contato do agente com o corpo, a extensão do corpo atingida e o tempo transcorrido entre o momento do acidente e o primeiro socorro prestado a vítima (SBQ -REGIONAL SP, 2008; BOLGIANI; SERRA, 2010).

Os tipos de queimaduras mais comuns são as ocasionadas por calor causadas por líquidos aquecidos, geralmente em casa e na cozinha sendo as crianças as mais acometidas neste tipo de acidente. Em segundo lugar estão os acidentes causados pelo álcool incandescente. Dados estimados pela pesquisa de incidência e tratamento de queimadura nos Estados Unidos correspondente a 2010, e fornecidas pela American Burn Association, revelam que aproximadamente 450.000 lesões por queimadura receberam tratamento médico, sendo que

destas aproximadamente 3.500 levaram a morte do indivíduo (SBQ -REGIONAL SP, 2008; ABA, 2011).

Não há no Brasil um sistema centralizador efetivo de informações sobre a ocorrência e evolução dos atendimentos aos pacientes queimados, somente relatos e estatísticas retiradas de pequenos centros de atendimento regionais, no entanto a partir das informações destes centros, estima-se que os números no Brasil sejam ainda maiores que nos Estados Unidos (GIMENES et al., 2009)

A determinação do grau da queimadura, bem como a extensão da área queimada são importantes para que se possa delinear a melhor estratégia de tratamento ao paciente (GOMES; SERRA; MACIEIRA Jr., 2001).

O grau da queimadura determina a profundidade dérmica do trauma e é classificado da seguinte forma:

- **Queimaduras de 1º grau:** comprometem apenas a camada mais externa da pele, a epiderme. Provoca eritema, calor, evolução com descamação, mas não provoca bolhas, ou alterações hemodinâmicas e clínicas relevantes. Apresenta regressão sem cicatrizes (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001; REMPEL et al., 2011).
- **Queimaduras de 2º grau:** comprometem a epiderme totalmente e alcançam parte da derme. Provoca eritema, dor, bolhas e ulceração. A regeneração do tecido ocorre de 2 a 4 semanas, podendo deixar sequelas, como cicatrizes (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001; REMPEL et al., 2011).
- **Queimaduras de 3º grau:** comprometem todas as camadas da pele, podendo atingir tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos. Apresenta-se como uma lesão branca, ou marrom, sem elasticidade, seca e dura. Não há regeneração espontânea, exigindo portanto enxertia. Pode apresentar retração das bordas do tecido (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001; REMPEL et al., 2011).

Alguns autores consideram ainda a lesão de 4º grau sendo referente a carbonização do tecido atingido (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001). Abaixo a tabela 1 (página 33) traz um resumo da classificação do grau das queimaduras:

Tabela 1 – Classificação do grau de profundidade da lesão por queimadura (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001; REMPEL et al., 2011).

Queimadura de 1° Grau	Apenas epiderme
Queimadura de 2° Grau	Epiderme e parte da derme
Queimadura de 3° Grau	Epiderme e derme
Queimadura de 4° Grau	Carbonização total do tecido

A perda da proteção da pele devido a lesão por queimadura além de interferir no equilíbrio da microbiota natural da pele, promove uma abertura a entrada de micro-organismos patogênicos que ao encontrarem proteínas degradadas e tecido desvitalizado, podem formar ali um foco de crescimento, podendo levar desde infecções locais até processos de sepse. Além disso o paciente queimado possui outros fatores que favorecem situações infecciosas de maior gravidade, como a imunossupressão, a possibilidade de translocação bacteriana gastrointestinal, bem como o próprio processo de internação que o expõe a uma vasta gama de micro-organismo presentes no ambiente hospitalar e o uso inadequado de antimicrobianos que levam ao aparecimento de cepas multirresistentes (REMPEL et al., 2011).

Um dos principais patógenos encontrados em casos de bacteremia em pacientes queimados é o *Staphylococcus aureus*, seguido de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*. Outros microrganismos como *Cândida albicans* também são encontrados (GOMES, SERRA, MACIEIRA Jr., 2001; REMPEL et al., 2011).

3.6.2 Úlceras Venosas

A úlcera venosa crônica é consequência da insuficiência venosa crônica (IVC) que por sua vez é definida como uma anormalidade congênita ou adquirida, do funcionamento do sistema venoso causada por um mal funcionamento valvular, que pode estar associada, ou não, à obstrução do fluxo venoso, podendo afetar tanto o sistema venoso superficial quanto o sistema venoso profundo (PORTER; MONETA, 1995)

A úlcera pode iniciar-se espontaneamente ou a partir de uma lesão traumática. De acordo com o descrito por França e Tavares (2003, p. 320) existem duas teorias para a formação das úlceras em pacientes com insuficiência venosa crônica, a primeira descreve que com o aumento da pressão arterial há um alargamento dos poros intersticiais dos capilares e com isso o extravasamento de fibrinogênio, com posterior conversão em fibrina, a fibrina por sua

vez interfere na difusão do oxigênio e causa diminuição nutricional local levando assim à formação de úlceras, a segunda teoria descreve que os leucócitos seriam os responsáveis, pois estes entrando em contato com moléculas de adesão intracelular levariam à ativação de células que permitiriam a liberação de citocinas e radicais livres no local, esse processo acarretaria em uma reação inflamatória predispondo o surgimento da úlcera.

O tamanho das úlceras venosas é variável, bem como sua profundidade, no entanto sua prevalência nos pacientes com IVC é de aproximadamente 1%, sendo que fatores como obesidade, idade avançada, fraturas ou lesões antecedentes e flebites aumentam a possibilidade de ocorrência. Podem se apresentar de forma única ou múltipla sendo normalmente encontrada na panturrilha ou na parte superior do maléolo sendo as bordas da ferida bem delimitadas, de formato irregular, relativamente superficiais e com a borda em declive, apresentam a base vermelha e normalmente com exsudato, estando coberta por fibrina ou material necrótico (Figura 5) e pigmentação ao redor (FRANÇA; TAVARES, 2003; FITZPATRICK et al., 2005).



Figura 5 – Fotografia de úlcera venosa consequência da IVC.

Fonte: FITZPATRICK et al., 2005.

A dor local ocorre normalmente quando a lesão sofre infecção secundária bacteriana ou fúngica, o que nesses casos é muito comum. Para se descobrir o agente patológico deve se efetuar biópsia local (FRANÇA; TAVARES, 2003; FITZPATRICK et al., 2005).

3.7 Tratamento das lesões cutâneas: queimadura e úlcera venosa

Para evitar a contaminação e crescimento microbiano, o tratamento local adequado é imprescindível. O correto atendimento primário, bem como o uso de um curativo resistente, que permita o crescimento da neoderme, biodegradável no tempo necessário a esse crescimento e que proteja o local de infecções, são essenciais para um bom tratamento (NERY et al., 2011).

Um curativo tópico ideal seria aquele de fácil remoção, que dê conforto ao paciente, não exija trocas frequentes, mantenha o leito da ferida com umidade ideal permitindo que as áreas periféricas fiquem secas e protegidas, que controle o crescimento microbiano, estimule o crescimento dos queratinócitos, que seja de fácil aplicação e adaptável às várias partes do corpo do paciente e que apresente boa relação custo/benefício (BOLGIANI; SERRA, 2010; DEALEY, 2001).

Esse tópico ideal não existe, pois ainda não é possível encontrar todas essas características em um único material. Devido a isso, cada vez mais pesquisas têm sido realizadas nos campos de biomateriais e engenharia de tecidos a fim de desenvolver novas tecnologias que permitam que cada vez mais os curativos tópicos e substitutos dérmicos possam chegar o mais próximo possível da condição ideal (BOLGIANI; SERRA, 2010; NERY et al., 2011).

Hoje os curativos tópicos do tipo hidrogel disponíveis no mercado como *Intrasite gel®*, *Dermagran®*, *Duoderm gel®*, *Hydrosorb®*, *Hydrosorb Plus®*, *Nu-Gel®*, *Elasto-gel®*, *Purilon®*, *Curatec®* e outros podem apresentar-se na forma de gel transparente, ou placa. São compostos normalmente de misturas de água, propilenoglicol, carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona. Alguns possuem também associado o alginato a fim de melhorar o debridamento e glicerina para aumentar o poder bacteriostático e fungicida (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Apesar de vários estudos apontarem os hidrogéis a base de quitosana como grandes promessas no tratamento de feridas, ainda não existe um curativo comercializado com a quitosana em sua composição.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.) e água Milli-Q foi utilizada em todas as soluções com resistividade mínima de (18,0MΩ.cm) a 25 °C.

Quitosana em pó (Cat.#419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, USA, massa molar (MW) = 340.000g/mol, GD= >75%, viscosidade = 800-2000cP –1,0% em 1% de ácido acético) Ácido acético (CH₃COOH - Cat.#49199, Sigma-Aldrich), Ácido adípico ou ácido hexanodióico (COOH(CH₂)₄COOH - COD: 429.08, Vetec Química) agente reticulante (solução aquosa 0,01%), Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida - EDAC (Cat.#03449, Fluka).

4.2 Etapas de desenvolvimento do trabalho

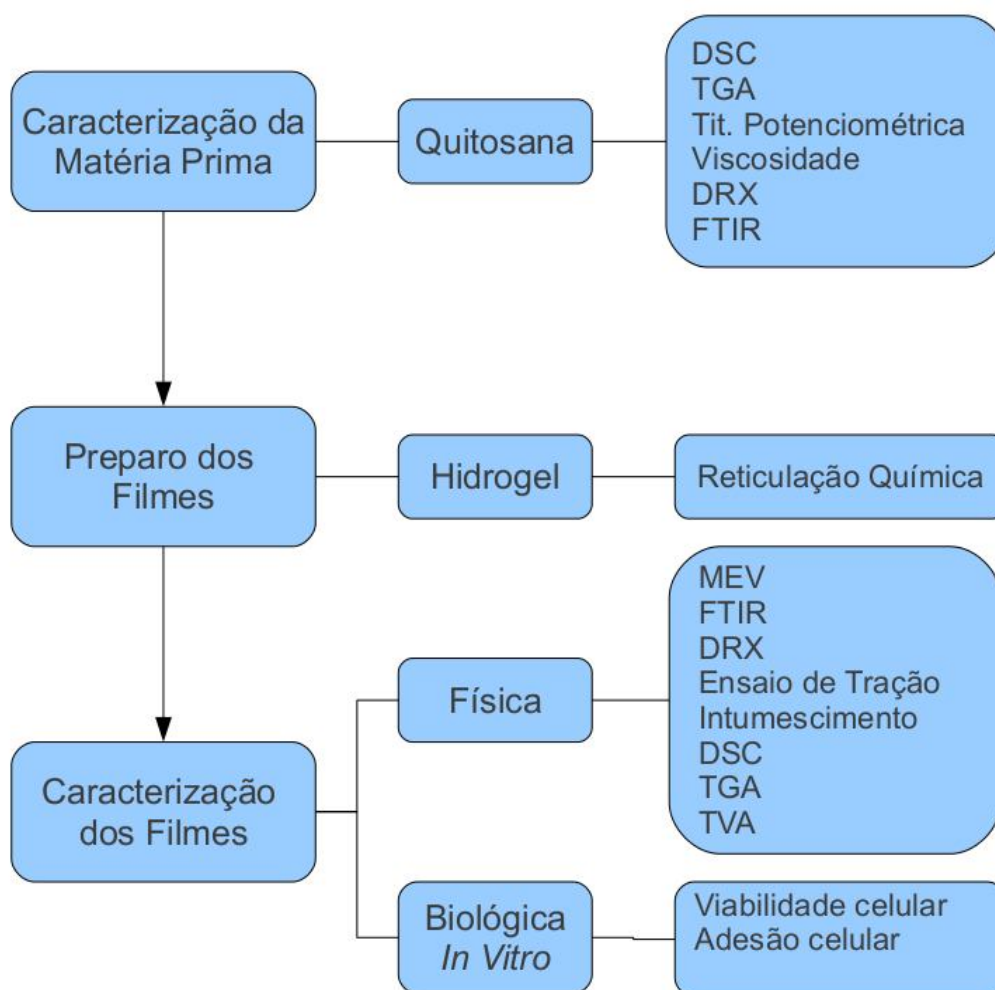


Figura 6 – Fluxograma das etapas propostas para execução do trabalho.

4.3 Controle de Qualidade da matéria-prima

4.3.1 Estudo do comportamento térmico da quitosana

O estudo do comportamento térmico da quitosana foi realizado utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA).

A análise de DSC foi realizada no equipamento SEICO SII DSC 7020 utilizando-se massas de aproximadamente 10mg de quitosana depositadas em suporte de amostra de alumínio. Essas amostras foram aquecidas a uma razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, partindo, em uma primeira análise, de 30 até 500°C , para verificação de características de desidratação, decomposição e presença de contaminantes na matéria-prima, a segunda análise partiu de -50 até 150°C , ambas em atmosfera dinâmica N_2 , com uma vazão de 90mL min^{-1} . O ponto médio foi utilizado para estimar os picos térmicos e a temperatura de transição vítrea (T_g), como descrito por Santos et al. (2003, p. 244).

A TGA foi realizada em equipamento SHIMADZU TG/DTA DTG-60 utilizando-se massa de aproximadamente 2,2mg de quitosana depositada em suporte de amostra de alumínio. Essa amostra foi aquecida a uma razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, partindo da temperatura ambiente até 900°C em atmosfera dinâmica de N_2 , com uma vazão de 50mL min^{-1} (Santos et al., 2003).

4.3.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada por meio do método de titulação potenciométrica, em peagâmetro TECNOPON MPA 210 onde 0,2g de quitosana foi dissolvida em 20mL de solução padrão de HCl à 0,10N, para que ocorresse a protonação dos grupos aminos presentes. Em seguida, foi introduzido na solução o potenciômetro previamente calibrado e iniciada a titulação com solução padrão de NaOH 0,01mol/L. Foi obtida uma curva típica de titulação potenciométrica (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; COSTA Jr; MANSUR, 2008). Os valores obtidos foram aplicados a equação 1, onde MA é a massa da amostra analisada, n_1 é o número de mols titulados, ou seja, de mero desacetilado, 161g/mol é a massa molar do monômero desacetilado, n_2 é o número de mols de mero acetilado e 204g/mol é a massa molar do mero acetilado. O valor obtido foi aplicado a equação 2 (página 38), que descreve, em porcentagem, o grau de desacetilação, e este foi comparado ao valor fornecido pelo fabricante:

$$MA = n_1 \times 161 + n_2 \times 204$$

Equação 1

$$GD\% = \frac{n_1}{(n_1 + n_2)} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.3.3 Determinação da Viscosidade Aparente da quitosana

A determinação da viscosidade aparente da quitosana foi realizada a partir das medidas viscosimétricas de três amostras de solução de quitosana a 0,5%, 1% e 1,5% (m/v) em ácido acético 1% (v/v) em um reômetro analógico Brookfield, modelo LVT, com *spindle* 1 a temperatura de 24°C, nas velocidades de deformação iguais a 3, 6 e 12rpm.

4.3.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade da quitosana

A análise da difração de raio-X (DRX) da matéria-prima quitosana, foi realizada em equipamento SHIMADZU XRD 7000 a partir do material em pó de forma que se procedeu em 2θ variando de 3,00 a 90,00° com passo de 0,06. A quitosana foi avaliada com base na estrutura ortorrômbica usando para isso radiação $K\alpha$ do cobre com $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ (COSTA Jr; MANSUR, 2008).

A partir das áreas do difratograma que foram identificadas como fração cristalina (AC) e amorfa (AA) e calculadas utilizando o programa Microcal Origin® 6.0, o grau de cristalinidade (GC) foi estimado a partir da Equação 3.

$$GC = \frac{AC}{(AC + AA)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.3.5 Análise dos grupos químicos da quitosana

A avaliação dos grupos químicos da quitosana foi realizada por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em equipamento SHIMADZU IR Prestige-21 onde a amostra, na forma de pó do polímero, foi empregada a técnica de reflectância difusa, realizando aproximadamente 30 varreduras entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e intervalos de 2 cm^{-1} . As bandas características esperadas para o espectro da quitosana encontram-se descritas na tabela 2 (página 39).

Tabela 2 - Bandas características do espectro no infravermelho esperadas para matéria-prima Quitosana (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
3570 – 3200 e 3450	Estiramento de O-H e NH
2878	Estiramento simétrico de C-H
2955 – 2845 e 2922	Estiramento assimétrico de C-H
1423	Deformação angular de C-H ₂
1321	Deformação axial de C-N de amina primária
1260	Deformação axial de C-N de amina secundária
1340 – 1250 e 1379	Deformação axial de C-N de amina terciária
1154 e 896	Estiramento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1070 e 1030	Estiramento C-O (cíclico)
1650 – 1550	Deformação axial de N-H (I)
1570 – 1515 e 1560	Deformação axial de N-H (II)

4.4 Preparo dos filmes

Os hidrogéis foram sintetizados pela mistura de quitosana 0,5g em 50mL de solução de ácido adípico 1% (m/v) sob agitação magnética a 60°C até completa dissolução. Foram adicionados 4mL de NaOH 1N ainda sob agitação com manutenção da temperatura em 40°C. A adição de uma solução de 5mL da carbodiimida EDAC foi realizada sob agitação vigorosa, de acordo com as concentrações listadas na tabela 3. Quando iniciada a gelificação, as amostras foram vertidas em placas de petri de poliestireno estéril para formação dos filmes. As placas foram mantidas à 50°C por 24 horas. Os filmes formados foram lavados com água deionizada e, por fim, levados a secagem em estufa a 50°C por mais 4 horas (TIKHONOV; RADIGINA; YAMSKO, 1996; COSTA Jr; MANSUR, 2008). Os valores de concentração de EDAC foram calculados de forma a se obter aproximadamente 20% e 10% de reticulação respectivamente. Cálculo esse baseado no grau de desacetilação do polímero e das massas molares dos reagentes utilizados.

Tabela 3 – Identificação dos hidrogéis de acordo com as concentrações da carbodiimida EDAC, pela solução total:

Identificação dos hidrogéis	Concentração do EDAC em m/v da solução total
A	0,00%
B	0,06%
C	0,11%

4.5 Caracterização Física dos filmes de hidrogel

4.5.1 Análise morfológica dos filmes

A análise morfológica dos filmes foi realizada por meio da microscopia óptica de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura (MEV), nos equipamentos Leica DM 2500 e SHIMADZU SSX-550, respectivamente. As amostras foram cobertas com fina camada de ouro por *sputtering* e posicionadas de forma que estavam a máxima distância do alvo, impedindo assim danos aos filmes (COSTA Jr; MANSUR, 2008; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2010).

4.5.2 Caraterização dos grupos químicos dos filmes

A caracterização dos grupos químicos foi realizada através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em equipamento SHIMADZU IR Prestige-21. Para tal análise foi utilizado o modo de transmitância e o modo de reflexão total atenuada na faixa compreendida entre 400-4000cm⁻¹. Após a normalização dos espectros as principais bandas de vibração foram atribuídas a seus respectivos grupos químicos, admitindo a QUI reticulada ao ácido adípico (Tabela 4) (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SADAHIRA, 2007).

Tabela 4 - Bandas características do espectro no infravermelho esperadas para Quitosana pós processo de reticulação (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
3570 – 3200 e 3450	Estiramento de O-H e NH
2878	Estiramento simétrico de C-H
2955 – 2845 e 2922	Estiramento assimétrico de C-H
1720 – 1670	Deformação axial de C=O de ácido carboxílico
1650 – 1550	Deformação axial de C=O de sal carboxilato
1690 - 1630	Deformação axial de C=O de amida
1260	Deformação axial de C-N de amina secundária
1340 – 1250 e 1379	Deformação axial de C-N de amina terciária
1070 e 1030	Estiramento C-O (cíclico)
1260	Deformação axial de C-N de amina secundária
1570 – 1515 e 1560	Deformação axial de N-H (II)

4.5.3 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes

A determinação dos padrões de cristalinidade dos filmes produzidos foi realizada por difração de raio-X (DRX) dos mesmos, foram analisados em equipamento SHIMADZU XRD 7000, de forma que se procedeu em 2θ variando de 3,00 a 90,00° com passo de 0,06° (COSTA Jr; MANSUR, 2008).

4.5.4 Caracterização das propriedades mecânicas

Foi realizado ensaio de tração de forma a revelar a tensão máxima de tração (σ), calculada por meio da equação 4, onde “F” é a força de tração aplicada a “A” que representa a área da seção transversal do material:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Equação 4}$$

O módulo de elasticidade do material, ou módulo de young (E) obtido a partir da razão entre $\Delta\sigma$, que representa a variação da tensão de tração e a deformação do material ($\Delta\epsilon$) (Equação 5):

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\epsilon} \quad \text{Equação 5}$$

A tenacidade dos materiais foi obtida pelo cálculo da área sob a curva gerada durante as análises por meio do programa Microcal Origin® 6.0.

Para tal, os filmes receberam uma tração de 50N, em máquina de teste universal Shimadzu AG-X, obedecendo as especificações da ASTM D882/02 conforme descrito no método de Costa Jr e Mansur (2008, p. 62), que descreve também a velocidade de ensaio, realizada em 5mm/min e a forma dos corpos de prova em gravata borboleta, com razão mínima de 8 entre a largura e a espessura. A análise foi realizada em 6 amostras e assim calculada sua média e desvio padrão.

4.5.5 Medida do grau de intumescimento (GI)

Para a determinação do grau de intumescimento (GI) os filmes produzidos foram adequadamente pesados, transferidos para um erlenmeyer onde receberam adição de um volume 50mL de solução-tampão de pH 4 e pH 7 da Hanna Instruments Brasil. As amostras ficaram, então, expostas às soluções durante 120 minutos e o intumescimento foi medido

em intervalos regulares (30, 60, 90 e 120 minutos) à temperatura ambiente. Após esse tempo, as amostras foram retiradas da vidraria e adequadamente pesadas. Seu grau de intumescimento (GI) foi calculado a partir da variação da massa inicial (M_0) e a massa final (M_t), como demonstra a equação 6 (SADAHIRA, 2007; AOUADA, 2005):

$$GI = \frac{(M_t - M_0)}{M_0} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

4.5.6 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)

A medida da transmissão do vapor d'água (TVA) pelos filmes poliméricos produzidos, ou seja, a medida da quantidade de água que passa através dos filmes durante um período de tempo, é importante para se determinar se um material é oclusivo ou permeável ao vapor do fluido. Esse ensaio foi conduzido de acordo com o método “B” da ASTM E96/10, com 3 amostras de cada tipo de filme de hidrogel produzido que foram afixadas em cúpulas de permeabilidade adaptadas como nos estudos de Belisário e seus colaboradores (2012), onde uma porção das cúpulas é destinada a deposição de água e outra porção com orifício destinado a permitir a permeação do vapor pelo filme polimérico. A cada cúpula foram adicionados 10mL de água destilada e posteriormente foram fixados os filmes com área de 4,9cm² cada. Os conjuntos formados foram pesados e depositados em dessecador contendo sílica gel, desidratada, à temperatura ambiente. Foram realizadas novas pesagens nos intervalos de tempo 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Em cada intervalo, a sílica gel utilizada foi substituída por sílica desidratada em estufa. As leituras dos pesos nos respectivos intervalos de tempo foram registradas e aplicadas a equação 7 para cálculo da taxa de transmissão de vapor d'água através dos filmes. Essa equação padroniza a TVA para um período de 24 horas, sendo que ‘g’ é o peso transmitido, ‘t’ o tempo em horas ao qual foi realizada a leitura e ‘a’ representa a área do filme polimérico (CAVALCANTI; CÍCERE, 2002) .

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \quad \text{Equação 7}$$

4.5.7 Análise do comportamento térmico dos filmes

O estudo do comportamento térmico do filme foi realizado utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA).

As análises foram realizadas utilizando pequenos pedaços dos filmes com cerca de 2,8mg.

Para o ensaio de DSC as frações dos filmes foram depositadas em suporte de amostra de alumínio com tampa furada no centro em equipamento Shimadzu DSC-60. Essas amostras foram aquecidas a uma razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, partindo de 30 até 300°C , em atmosfera dinâmica N_2 , com uma vazão de $90\text{mL}.\text{min}^{-1}$, o ponto médio foi utilizado para estimar as temperaturas de transição dos filmes (SANTOS et al., 2003; DON et al., 2006).

Para a TGA as frações dos filmes foram depositadas em suporte de amostra de platina em equipamento SHIMADZU TG/DTA DTG-60. Essas amostras foram aquecidas a uma razão de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, partindo da temperatura ambiente até 500°C em atmosfera dinâmica de ar e de N_2 , com uma vazão de $90\text{ mL}.\text{min}^{-1}$ (Santos et al., 2003).

4.6 Caracterização Biológica dos filmes de hidrogel por metodologia In Vitro

Todas as amostras submetidas ao ensaio de citotoxicidade foram previamente esterilizadas por vapor saturado de óxido de etileno.

4.6.1 Análise da viabilidade celular por MTT

A análise da viabilidade celular foi realizada através da redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio proporciona um modelo simples e eficaz para detectar células vivas sem o uso de elementos radioativos. A viabilidade de células VERO (ATCC CCL-81 - células fibroblásticas de rim de Macaco Verde Africano – *Cercopithecus aethiops*) e células BHK-21 (células de rim de bebe Hamster) em contato com os filmes foi realizada por meio da dosagem colorimétrica baseado na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio. Em placas de poliestireno de 96 poços os 3 materiais analisados foram incubados com *meio* essencial de *Eagle* modificado por Dulbecco - DMEM (pH 7,2 – 7,6) por 24 horas a temperatura aproximada de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após esse período foram adicionadas um total aproximado de 50.000 células a cada poço sendo que destes uma série de poços não receberam adição de amostras do material sendo o grupo controle celular positivo (C.C) e outra série, além de não terem amostras do material testado, receberam a adição de Triton, sendo portanto o controle negativo. As placas foram novamente mantidas a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Passadas as 24 horas do cultivo foram adicionados $30\mu\text{L}$ do MTT (5mg/ml) diluído aos poços e as placas foram incubadas por mais 3 horas em estufa de CO_2 (5%) e 37°C . No tempo de 2 horas de incubação, foram realizados registros fotográficos dos materiais em Microscópio Olympus IX70 (MANSUR; PEREIRA; ORÉFICE, 2005; COSTA Jr., 2008).

Completadas as 3 horas de incubação, foram retirados 120µl da solução presente e adicionou-se 120µl de álcool isopropílico para ressuspensão das células. O sobrenadante foi então transferido para outra placa e foi efetuada a leitura em espectrofotômetro MULTISKAN SPECTRUM – Thermo Scientific em comprimento de onda de 595nm. (MANSUR; PEREIRA; ORÉFICE, 2005; COSTA Jr., 2008).

4.6.2 Análise da Adesão celular

Para a análise de adesão celular foi realizada cultura de células VERO e BHK-21 de 24 horas e posteriormente a morfologia da adesão e proliferação celular foi analisada por MEV. Para o ensaio, as amostras foram distribuídas em placa de 24 poços e mantidas em DMEM (pH 7,2 – 7,6), sem suplementação, por 30 minutos a 37°C e em estufa a 5% de CO₂. Após esse período o meio foi retirado e células VERO e BHK-21 foram semeadas em DMEM numa concentração de 300.000 células/poço, as placas foram então mantidas incubadas em estufa 5% de CO₂ e 37°C por 24 horas. Após esse período as células foram fixadas com glutaraldeído a 2% em PBS 0,15M por 16h a 37°C. Em seguida, o glutaraldeído foi aspirado e passou-se para uma etapa de desidratação crescente com as soluções de álcoois 30, 50, 70 e 100%, por 30 minutos, para cada solução, à temperatura ambiente, antes de serem secos. Após a secagem atingir o ponto crítico, as amostras foram cobertas com uma camada ultrafina de ouro por *sputtering* e observadas em microscópio eletrônico de varredura, no equipamento SHIMADZU SSX-550 (BISPO, 2009; COSTA Jr., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 Controle de Qualidade da matéria-prima

5.1.1 Estudo do comportamento térmico da quitosana

As análises térmicas são conjuntos de técnicas que possibilitam a observação e avaliação das mudanças das propriedades físicas apresentadas por uma amostra de substância submetida a determinadas condições controladas de temperatura (RODRIGUES; MARCHETTO, 2002).

Dentro das técnicas utilizadas para análises térmicas a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TGA) são os métodos mais utilizados.

A figura 7 mostra a curva de DSC sob atmosfera de N_2 na faixa de temperatura de 30 a 500°C, assim como observado nos estudos de Santos et al (2003, p. 246) e de Torres et al (2005, p. 310) foi observada ocorrência de dois picos. Um pico endotérmico, cujo ápice denota a temperatura de 180°C, que seria correspondente ao processo de desidratação do material e um segundo pico exotérmico, ápice em 304°C, provavelmente correspondente ao processo de decomposição.

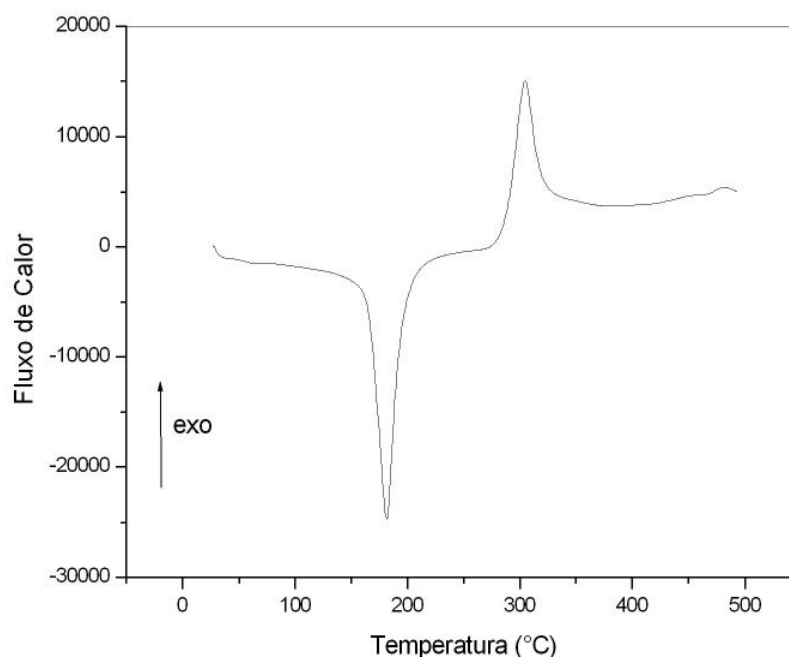


Figura 7 – Curva DSC da amostra de Quitosana sob atmosfera de N_2 (30 a 500°C).

Os polissacarídeos tendem a não apresentar a Temperatura de fusão (T_m) isso devido a grande quantidade de grupos $-OH$ presentes nestes polímeros, levando-os a degradação antes que ocorra essa transição térmica.

Já para a análise realizada a temperatura sub-ambiente (-50 a 150°C), observa-se a ocorrência de uma deflexão na curva (na temperatura aproximada de 60°C), referente a temperatura de transição vítrea (T_g) da quitosana (Figura 8) (SANTOS et al., 2003).

Os comportamentos apresentados nas curvas de DSC da amostra são comparáveis aos dos estudos de Santos et al (2003) que efetuaram em suas pesquisas purificação prévia de suas amostras, desta forma entendemos que o material utilizado no estudo não necessita do processo prévio de purificação. Além disso, os valores observados na matéria-prima serão comparados aos valores obtidos nas curvas DSC do material processado, pois a mudança dos perfis dessas curvas, bem como de seus valores de ocorrência são importantes na comprovação do processo de reticulação proposto. Os valores dos picos podem ser verificados de forma resumida na tabela 5 (página 48).

Nos ensaios de TGA Santos et al (2003, p. 246) concluíram em seus estudos que a razão de aquecimento mais adequada para análise qualitativa das curvas de TGA da quitosana seria de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, por tal motivo e concordando com suas considerações, no presente trabalho exploramos apenas essa razão de aquecimento.

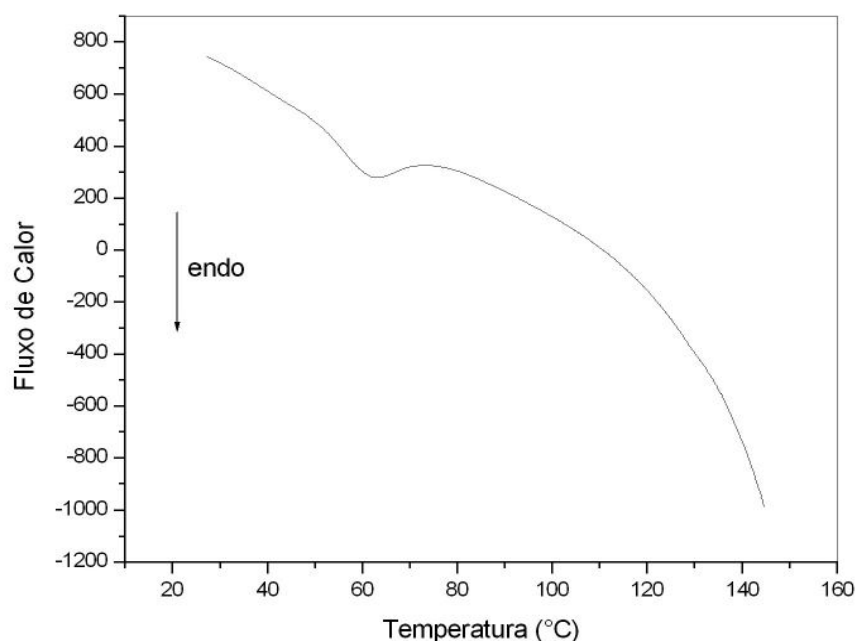


Figura 8 – Curva DSC da amostra de Quitosana sob atmosfera de N_2 (-50 a 150°C).

Na figura 9 é possível observar a curva de TGA da amostra em estudo, e com clareza percebe-se que o material não se degrada termicamente completamente mesmo após alcançado 800°C. Essa característica foi também observada nos trabalhos de Santos et al (2003, p. 246) e de Torres et al (2005, p. 310). Nos mesmos estudos foi possível fazer uma associação inversamente proporcional entre o grau de desacetilação e a estabilidade térmica da amostra, em que Santos et al (2003, p. 246) observaram que amostras com grau de desacetilação menores (na faixa ou abaixo de 75%), possuem maior estabilidade térmica, o que pode também ser observado no presente estudo. Verifica-se na curva a presença do processo de desidratação e posteriormente o processo de decomposição do polímero (segundo estágio), por volta de 300°C, que pode ser atribuída à degradação da cadeia polimérica da quitosana, ocorrendo a despolimerização e decomposição pirolítica da estrutura polissacarídea, liberando assim moléculas menores como água, dióxido de carbono, metano e amônia (ZOHURIAAN e SHOKROLAHI, 2004).

As variações de massa e os intervalos de temperatura do ensaio podem ser verificados na tabela 5 juntamente e comparativamente aos valores dos picos de DSC.

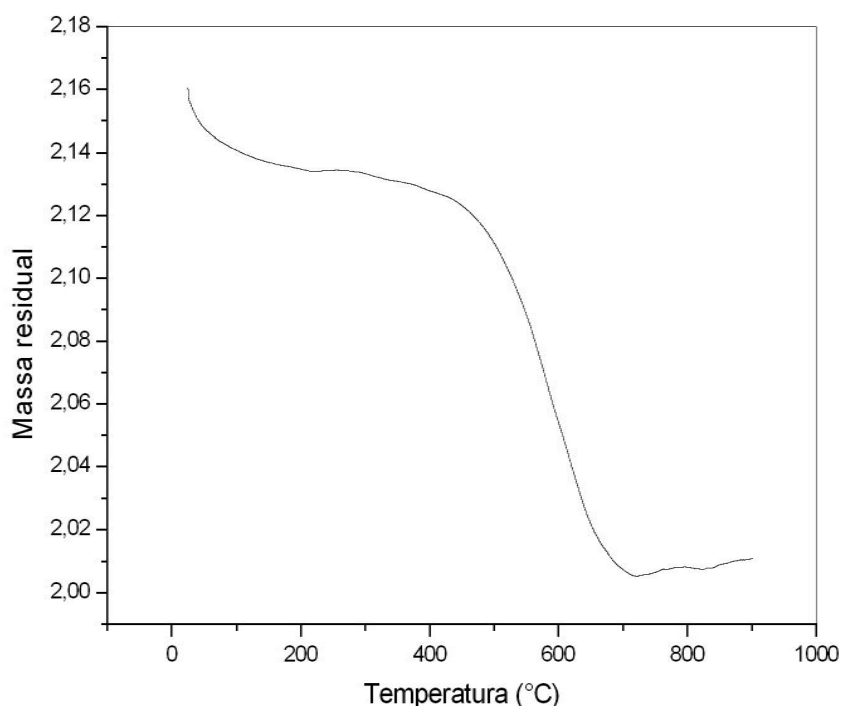


Figura 9 – Curvas TG da amostra de Quitosana sob atmosfera de N₂ (0 a 900°C)

Tabela 5 – Resumo dos resultados de TGA e DSC para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) da amostra de Quitosana sob atmosfera de nitrogênio.

Evento térmico	TGA		DSC
	Intervalo de temperatura / °C	Perda de massa / %	Picos / °C
$\text{QUI} \cdot n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{QUI} + n\text{H}_2\text{O}$	24 – 289	1,39	180 (endo)
$\text{QUI} \rightarrow \text{RC}$	289 – 897	6,9	304 (exo)

5.1.2 Determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana

A característica mais importante da quitosana é seu grau de desacetilação (GD). O GD desse polímero define qual será sua possível utilização e os produtos que poderá compor. Tal característica determina se a macromolécula é quitosana ou quitina, sendo que para uma quitina com grau de desacetilação maior que 50%, essa é considerada quitosana. Além disso, determinar este parâmetro auxilia o pesquisador na previsão de determinadas propriedades físico-químicas e mesmo microbiológicas da quitosana (TAN et al., 1997; HEIN et al., 2008; SANTOS et al., 2003).

Para determinar o GD da quitosana, foi realizado o ensaio de titulação potenciométrica. A figura 10 (página 49) demonstra a curva típica de titulação obtida a partir da solução de quitosana. Nesta curva, os pontos de inflexão correspondem a neutralização do HCl excedente na solução (353mL) e a neutralização dos grupos amino livres presentes na amostra (583mL) respectivamente. Para melhor observação a figura 11 (página 49) apresenta os valores da derivada primeira da quitosana (COSTA Jr., 2008).

De acordo com o observado na curva e juntamente com os cálculos realizados, foi determinada, através do volume de NaOH gasto no segundo ponto de inflexão, a quantidade em mols de $-\text{NH}_2$ presentes na amostra, o que dentro da Equação 2 e 3 representa o valor de n_2 . A partir disso, foi obtido um valor de 76% com desvio padrão de 2,32, ou seja, dentro do estabelecido pelo fabricante.

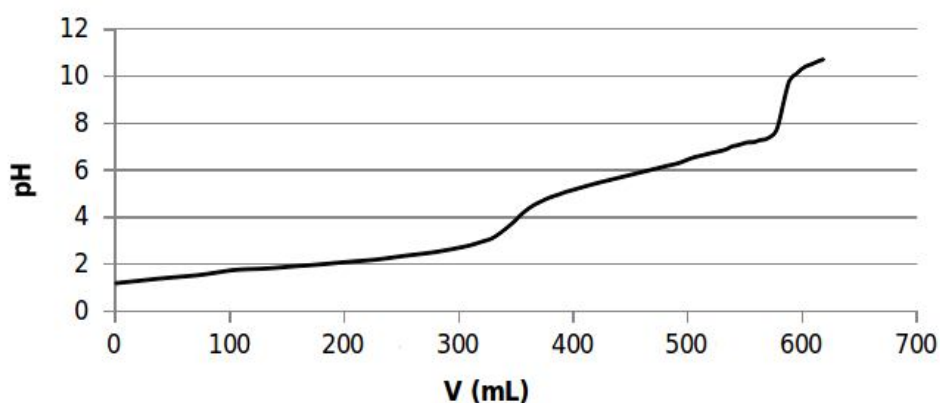


Figura 10 – Curva da Titulação Potenciométrica da QUI.

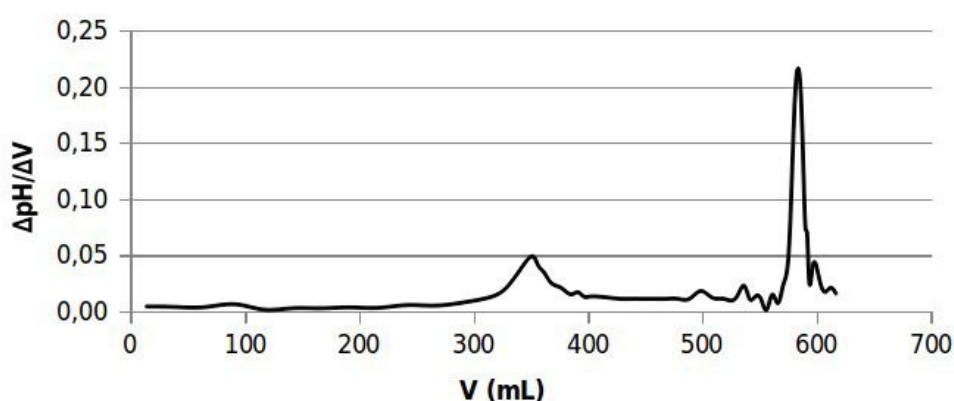


Figura 11 – Curva da derivada primeira da Titulação Potenciométrica da QUI.

Os estudos de Rabea et al. (2003) demonstraram que o caráter antimicrobiano da quitosana era mais acentuado em cepas de *E. Coli* quando em torno de pH 5,5 em relação a pH 7, isso devido a maior concentração de grupos amino protonados disponíveis em pH's de valores mais baixos, o que levou a uma segunda análise que constatou, assim como em outros estudos, que a quitosana com grau de desacetilação mais alto, possui características antimicrobianas mais acentuadas. Ou seja, quanto maior o caráter policatiónico apresentado pela amostra de quitosana, maior sua atividade antimicrobiana.

Nos estudos de Chatelet et al. (2001) foi observado um aumento do grau de adesão e proliferação celular com o aumento do GD, isso devido aos grupos amino protonados, que em grande quantidade, interagem mais facilmente com as porções aniônicas das membranas celulares das células, possibilitando assim maior adesão. Esse fator torna-se importante em termos de adesividade do curativo ao local da ferida, bem como sua capacidade de manter novas células aderidas e com capacidade proliferativa mantida.

Diante destes fatores, é desejável que a quitosana utilizada na preparação de biomateriais com potencial para o uso em engenharia de tecidos, possua um grau de desacetilação superior a 75%. Sendo portanto o utilizado neste estudo, adequado a estas pretensões.

5.1.3 Determinação da Viscosidade Aparente da quitosana

Na tabela 6 é possível observar os valores obtidos por meio da análise de viscosidade aparente realizada com o método de análise por Brookfield, sob as velocidades de rotação de 3, 6 e 12rpm. Na figura 12 (página 51) é possível observar a linearidade obtida mediante a avaliação da média aritmética das viscosidades obtidas em relação a concentração do polímero em solução (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

Por meio desta análise foi possível verificar os valores de viscosidade estimados pelo fabricante da matéria-prima de 800 – 2000cP para uma concentração de 1% de quitosana para 1% de ácido acético. Sendo a viscosidade obtida em análise de 787cP com desvio padrão de 0,067, 0,087 e 0,06 para as concentrações de 0,5, 1 e 1,5% respectivamente, ou seja, dentro do estabelecido pelo fabricante.

A viscosidade do polímero é um indicativo de sua massa molar, sendo que quanto maior a viscosidade, maior a massa molar média do polímero em questão.

Tabela 6 – Viscosidades aparentes (cP) da QUI em função da velocidade de rotação e concentração do polímero em % (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v).

Velocidade de rotação (rpm)	Concentração em % (m/v)		
	0,5	1,0	1,5
3	220 cP	788 cP	1385 cP
6	220 cP	788 cP	1387 cP
12	221 cP	785 cP	1384 cP

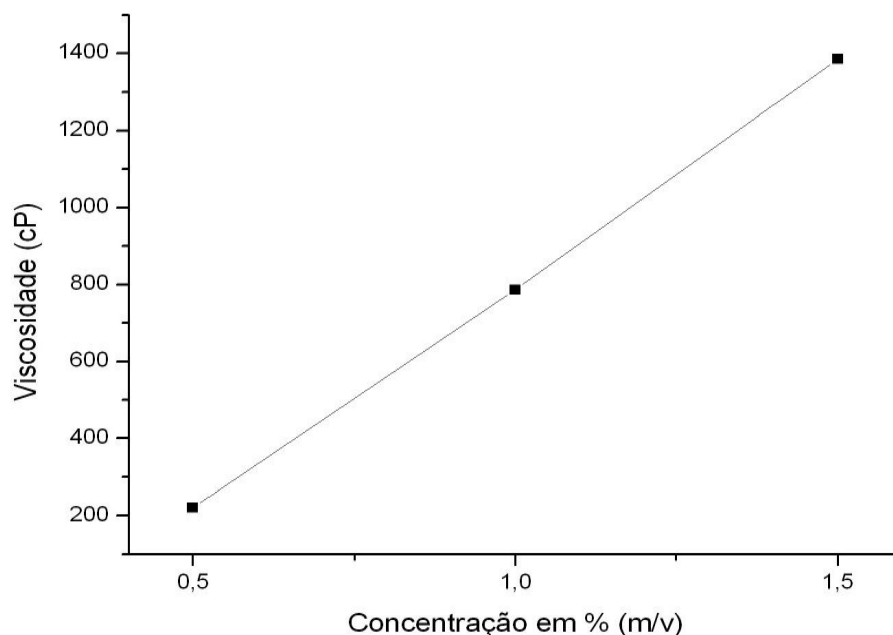


Figura 12 – Viscosidade aparente em função da concentração do polímero QUI em solução de ácido acético 1% (v/v) sob temperaturas de 24°C.

5.1.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade da quitosana

A figura 13 (página 52) mostra o difratograma obtido da amostra de quitosana onde são observados 2 picos característicos, o primeiro de alta intensidade em $19,8^\circ$ ($d=0,441\text{nm}$) e um de menor intensidade em $37,8^\circ$ ($d=0,244\text{nm}$) caracterizando a fase cristalina da amostra. O difratograma apresenta reflexão de 10° associada a cristais hidratados presentes na amostra (OKUYAMA et al., 2000). No entanto existe uma ampla faixa abaixo dos picos que caracteriza a fase amorfa da matéria-prima, essa faixa varia de aproximadamente 6° a 60° , onde predomina a forma amorfa do material. Os ângulos encontrados no difratograma podem ser associados aos planos (2 0 0) para o de alta intensidade e (1 2 4) para o de baixa intensidade. A partir do difratograma obtido da quitosana foi possível estimar sua cristalinidade em 17% (YUI et al., 1992; OGAWA et al., 2004; COSTA Jr; MANSUR, 2008).

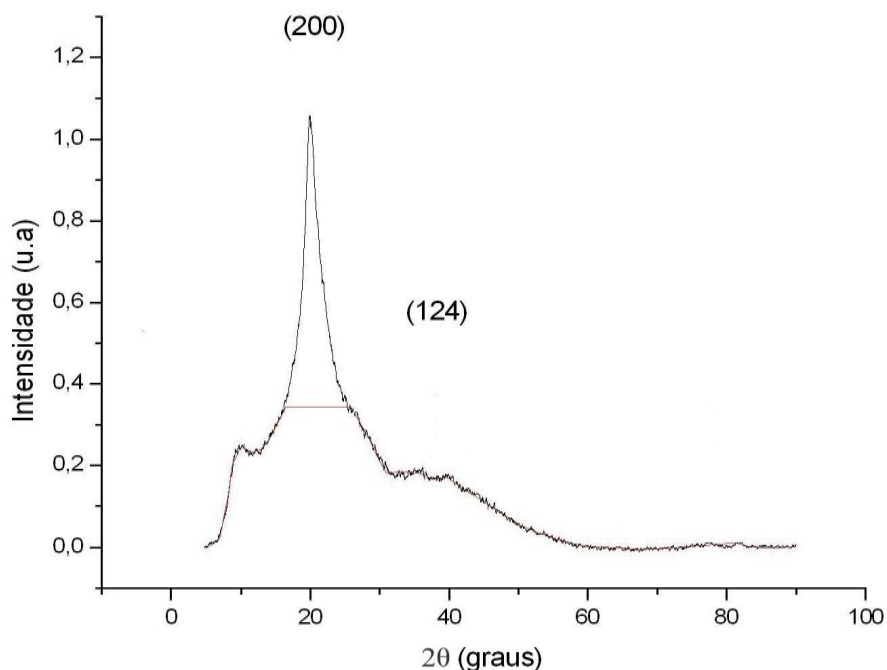


Figura 13 – Difratograma da matéria-prima Quitosana.

Devido as interações intra e intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio existentes entre os grupos amino, hidroxilas e carboxilas da quitosana, a mesma apresenta certa organização e por isso uma estrutura semi-cristalina. Nos estudos de Ogawa et al. (2004) é proposto que a quitosana possui uma célula unitária com $a=0,895\text{nm}$, $b=1,697\text{nm}$ e $c=1,034\text{nm}$ com estrutura em ziguezague estabilizada por estas interações intermoleculares. Tais fatores dariam a quitosana uma célula unitária ortorrômbica.

5.1.5 Análise dos grupos químicos da quitosana

A quitosana por ser uma amino glicose com algumas porções estruturais acetamida, apresenta bandas características bastante específicas e que facilitam sua identificação quando submetida a espectroscopia no infravermelho. Para tal foi realizado o FTIR cujo gráfico encontra-se representado na figura 14 (página 53) (COSTA Jr; MANSUR, 2008).

O espectro de infravermelho apresenta um amplo pico de absorção em 3281cm^{-1} e em 3355cm^{-1} , característico de ligações N-H e ao estiramento de O-H. Apresenta na banda de C-H os picos característicos de estiramento em 2948cm^{-1} (com menor intensidade) e de vibração assimétrica em 2878cm^{-1} (com maior intensidade). Apresenta também clara deformação angular de CH_2 (tesoura) no pico de 1421cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2007) .

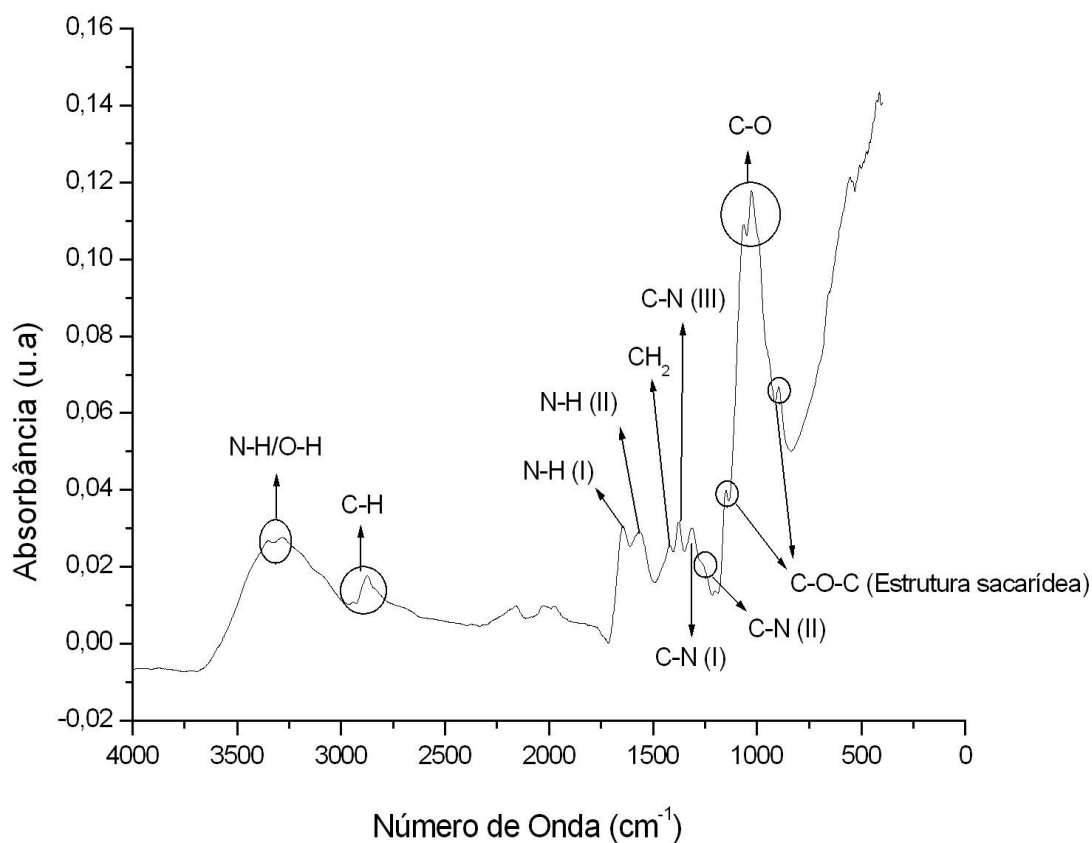


Figura 14 – Espectro de FTIR e estrutura química da Quitosana.

As fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária aparecem nas bandas de 1319cm^{-1} , 1265cm^{-1} , 1379cm^{-1} respectivamente. As vibrações fora do plano da ligação C-H correspondente à estrutura sacarídea, banda de COC que aparecem em 1151cm^{-1} e 893cm^{-1} . Também é possível observar a presença das bandas correspondentes ao estiramento de C-O cíclico em 1068cm^{-1} e 1027cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2007). A tabela 7 apresenta resumidamente todos os picos identificados no espectro FTIR da quitosana.

Tabela 7 - Bandas características do espectro no infravermelho encontradas na matéria-prima Quitosana (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição
3281 e 3355	Estiramento de O-H e NH_2
2878	Estiramento simétrico de C-H
2948	Estiramento assimétrico de C-H respectivamente
1421	Deformação angular de C-H_2
1319	Deformação axial de C-N de amina primária
1265	Deformação axial de C-N de amina secundária

1379	Deformação axial de C-N de amina terciária
1151 e 893	Estriamento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1068 e 1027	Estiramento C-O (cíclico)
1648	Deformação axial de N-H (I)
1570	Deformação axial de N-H (II)

5.2 Reticulação Química da Quitosana com Ácido Adípico

Como os ácidos carboxílicos são, em sua maioria ácidos fracos, faz-se necessária a síntese de um derivado mais reativo a fim de aumentar a velocidade e o rendimento das reações (SOLOMONS, 2009). Para preparação de um derivado reativo do ácido adípico (**1**), foi utilizada a carbodiimida EDAC (**2**), um reagente solúvel em água.

Na figura 15 (página 55), é apresentada uma proposta de mecanismo para obtenção do derivado reativo do ácido a partir de uma reação de substituição em compostos carbonílicos (adição/eliminação).

As amidas são, entre os derivados de ácido carboxílicos, os compostos menos reativos, podendo ser preparadas a partir de quase todos os outros derivados de ácidos (SOLOMONS, 2009).

A partir desse princípio, para obtenção da amida e consequentemente a reticulação química da quitosana, foi realizada a reação entre o derivado do ácido (**3**) e a amina pertencente a quitosana (**4**). O mecanismo proposto para obtenção da amida está ilustrado na figura 15 e é baseado no ataque nucleofílico da amina sobre o carbono carbonílico do derivado do ácido, esse processo é seguido de eliminação de outro derivado de ácido carboxílico, neste caso a uréia (**6**), e formação de duas amidas (**5**) ao final, com consequente obtenção de uma ligação cruzada entre as moléculas de quitosana (SOLOMONS, 2009).

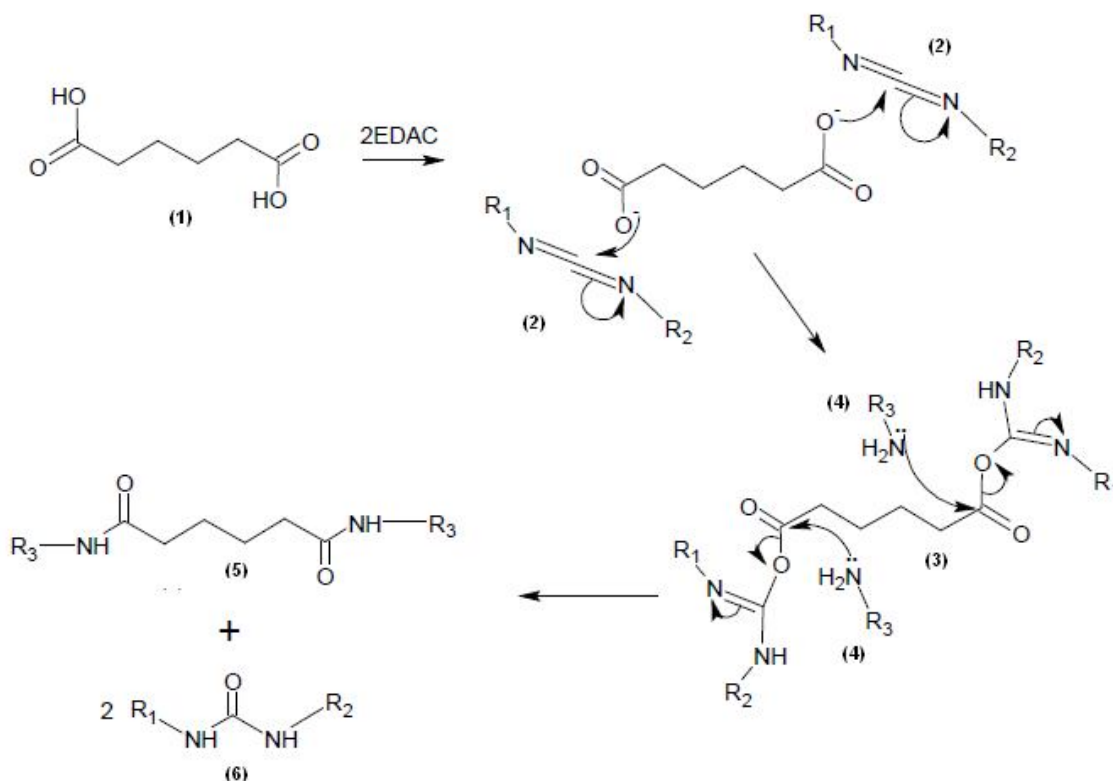
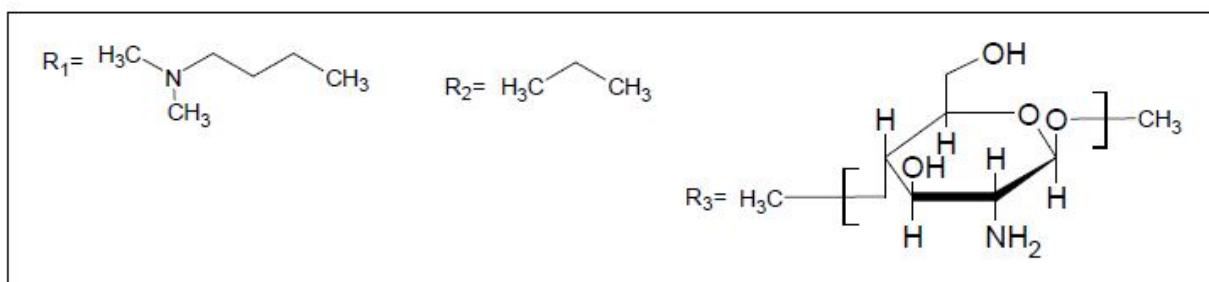


Figura 15 – Proposta de mecanismo para obtenção do derivado reativo do ácido adípico (1) seguido da reticulação química da quitosana.

5.3 Caracterização física dos filmes de hidrogel

5.3.1 Avaliação qualitativa dos filmes

A figura 16 (página 56) apresenta os filmes não lavados de quitosana e ácido adípico sem reticulação covalente (Filme A) e reticulados covalentemente com 0,06% (Filme B) e 0,11% (Filme C) de EDAC. Os filmes apresentaram-se com espessura de aproximadamente ($78 \pm 15 \mu\text{m}$). Pode-se observar opacidade no Filme A, que diminui relativamente no Filme B e é muito reduzida no Filme C, que apresentou maior transparência que todos os outros. A

maior transparência do filme é um indício de maior porção amorfa no filme, já que quanto mais amorfo um material, maior a tendência deste apresentar transparência característica.

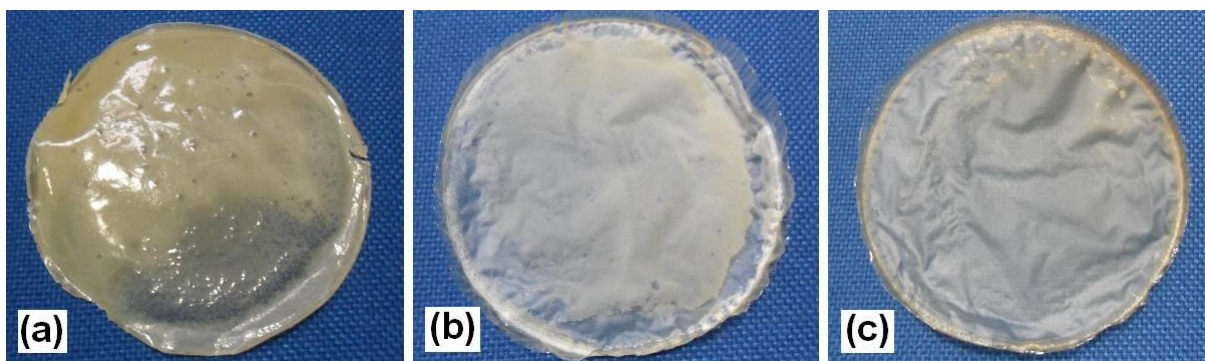


Figura 16 – Filmes de Quitosana e ácido adípico com (a) 0,0%, (b) 0,6% e (c) 0,11% de EDAC.

Além disso há uma diminuição progressiva opacidade dos filmes, e aumento da homogeneidade, com o aumento da porcentagem do agente ativador EDAC. Como é o ativador que possibilita o processo de reticulação química covalente, o esperado e observado é justamente o aumento da homogeneidade dos filmes.

Na figura 17 (página 57) estão representadas as microscopias ópticas dos filmes lavados realizadas em Microscópio de *polarização* trinocular marca *Leica DM 2500*, onde ficam evidentes as formações de núcleos de cristalização. Processo esse que tem gradativa diminuição do tamanho dos núcleos e maior refinamento da microestrutura com o aumento da adição do EDAC como pode ser observado em comparação dos filmes do tipo A, para o tipo B e e finalmente para o filme C.

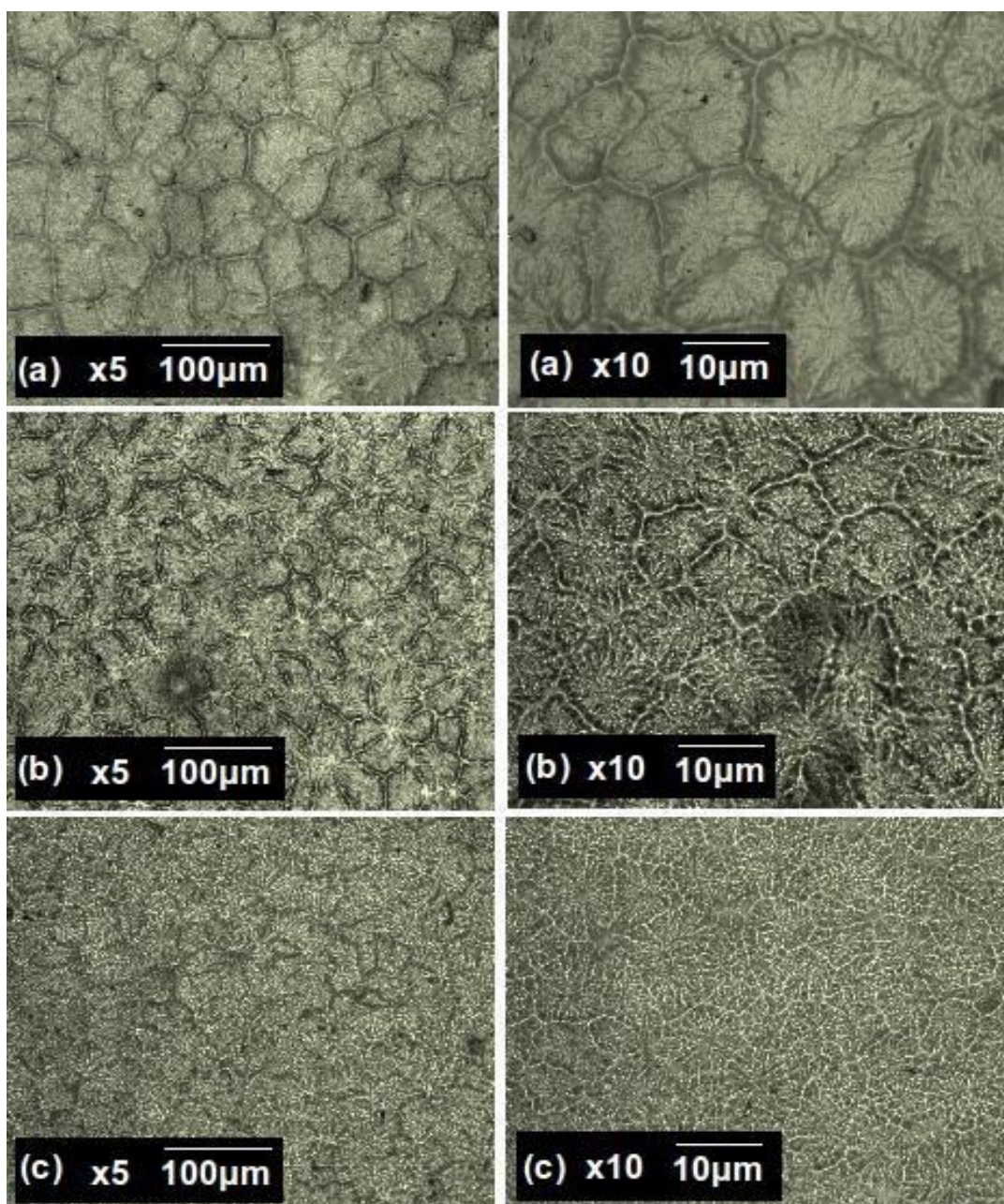


Figura 17 – Imagens de microscopia óptica de luz polarizada dos filmes lavados de Quitosana e ácido adípico com (A) 0,00%, (B) 0,06% e (C) 0,11% de EDAC (aumentos de 05X e 10X).

5.3.2 Análise morfológica dos filmes

A análise morfológica dos filmes foi realizada por MEV (Figura 18, página 58). A cristalização parcial dos filmes, apesar de existente, não foi suficiente para acarretar diferenças na estrutura dos filmes, que pelo contrário, apresentaram relativa homogeneidade.

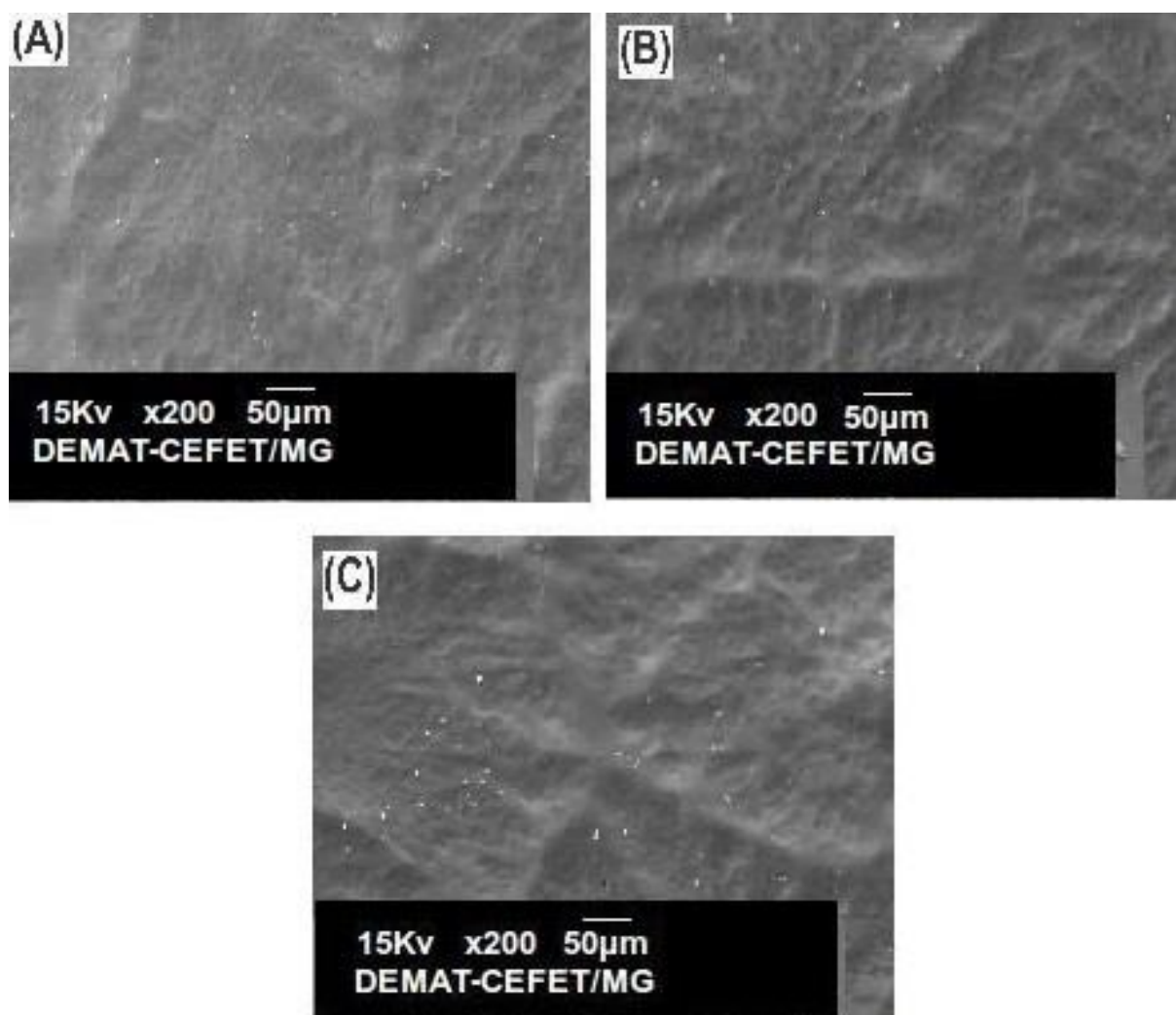


Figura 18 – Imagens dos filmes de Quitosana e ácido adípico com (A) 0,00%, (B) 0,06% e (C) 0,11% de EDAC, obtidas por MEV.

5.3.3 Caraterização dos grupos químicos dos filmes

A figura 19 apresenta o grupo de espectros no infravermelho dos filmes de quitosana reticulados com ácido adípico sem e com a adição do ativador EDAC. A reticulação química da quitosana com o ácido adípico ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amino ($-NH_2$) que reage com o carbono carbonílico ativado derivado do ácido carboxílico. Disso resulta a liberação de uréia e formação da ligação $(R-CO)NH_2$ ($\sim 1690\text{ cm}^{-1}$), grupamento amida (SOLOMONS, 2009).

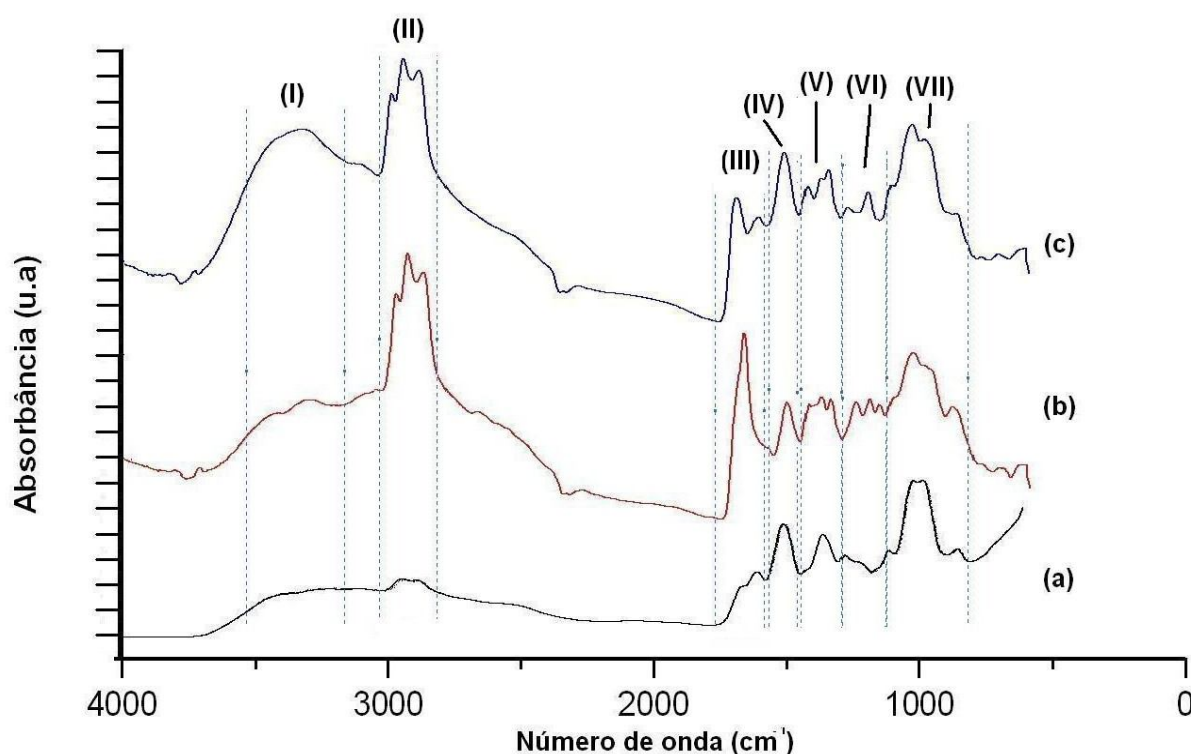


Figura 19 – Espectros de infravermelho dos filmes de Quitosana e ácido adípico com (a) 0,00%, (b) 0,06% e (c) 0,11% de EDAC, obtidas por FTIR.

O espectro de infravermelho foi dividido em 7 setores para melhor discussão das bandas presentes. No setor (I) é possível observar uma ampla banda de absorção entre 3100 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} característica das ligações N-H e ao estiramento de O-H, onde há estreitamento dessa banda em relação ao filme A não reticulado covalentemente e portanto com mais grupos N-H disponíveis em relação aos filmes B e C que foram reticulados. O setor (II) apresenta, para todas as curvas, bandas características de C-H de estiramento assimétrico $\sim 2929\text{ cm}^{-1}$ (com menor intensidade) e de vibração assimétrica em $\sim 2868\text{ cm}^{-1}$ (com maior intensidade) (SILVERSTEIN, 2007).

A partir dos espectros é possível observar no setor (III) a presença das bandas 1691cm^{-1} e 1709cm^{-1} relativos a deformação axial da C=O da amida produzida pelo processo de reticulação nos filmes B e C respectivamente. Bandas estas não presentes no material A que apresentou banda em 1640cm^{-1} referente a deformação axial da C=O do sal do ácido presente no material. A banda relativa a C=O do sal do ácido adípico pode ser observada em todos os espectros, no entanto com menor intensidade nos filmes B e C. O setor (IV) é referente à banda 1533cm^{-1} de deformação de N-H (II) sendo que todos os espectros foram normalizados a partir desta de tal forma a obter a absorção igual a 1, uma vez que essa banda está presente em todas as amostras produzidas (SILVERSTEIN, 2007).

As bandas encontradas no setor (V) referem-se respectivamente a deformação angular de CH_2 (tesoura) entre $1454 - 1390\text{ cm}^{-1}$ e a deformação axial de C-N de amina terciária, a deformação axial de C-N de amina primária e secundária, sendo que para o filme A a banda referente a deformação de C-N de amina terciária não foi evidente e os picos de amina primária não foram detectados nos materiais A e B. Seguindo no setor (VI) que possui as bandas atribuídas ao estriamento COC de estrutura sacarídea e Estiramento C-O (cíclico) respectivamente em aproximadamente 1441cm^{-1} e $1063 - 1028\text{cm}^{-1}$ presentes em todos os materiais (SILVERSTEIN, 2007). A tabela 8, a tabela 9 e a tabela 10 (página 61) apresentam resumidamente as bandas identificadas no espectro FTIR dos filmes A, B e C respectivamente.

Tabela 8 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme A com 0,00% de EDAC (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Atribuição
3044 – 3341	Estiramento de O-H e NH
2876	Estiramento simétrico de C-H
2929	Estiramento assimétrico de C-H
1640	Deformação axial de C=O de sal carboxilato
1392	Deformação angular de CH_2 (tesoura)
1309	Deformação axial de C-N de amina primária
1268	Deformação axial de C-N de amina secundária
1149	Estriamento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1069 e 1026	Estiramento C-O (cíclico)
1533	Deformação axial de N-H (II)

Tabela 9 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme B com 0,06% de EDAC (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
3430 – 3386 e 3290	Estiramento de O-H e NH
2868	Estiramento simétrico de C-H
2968 e 2929	Estiramento assimétrico de C-H
1691	Deformação axial de C=O de amida
1603	Deformação axial de C=O de sal carboxilato
1454 – 1411	Deformação angular de CH ₂ (tesoura)
1376	Deformação axial de C-N de amina terciária
1280	Deformação axial de C-N de amina secundária
1141	Estriamento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1075 e 1032	Estiramento C-O (cíclico)
1533	Deformação axial de N-H (II)

Tabela 10 – Bandas características do espectro no infravermelho obtidas para o Filme C com 0,11% de EDAC (COSTA Jr; MANSUR, 2008; SILVERSTEIN, 2007).

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
3408 – 3194 e 3095	Estiramento de O-H e NH
2867	Estiramento simétrico de C-H
2967 e 2927	Estiramento assimétrico de C-H
1709	Deformação axial de C=O de amida
1634	Deformação axial de C=O de sal carboxilato
1452 – 1404	Deformação angular de CH ₂ (tesoura)
1377	Deformação axial de C-N de amina terciária
1303	Deformação axial de C-N de amina secundária
1144	Estriamento COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1072 e 1028	Estiramento C-O (cíclico)
1537	Deformação axial de N-H (II)

A presença do estiramento relativo aos grupos amida em 1691cm⁻¹ e 1709cm⁻¹ em B e C respectivamente, comprova que o processo de reticulação do ácido adípico com a quitosana ocorreu com êxito.

5.3.4 Determinação dos parâmetros de cristalinidade dos filmes

A figura 20 apresenta os difratogramas realizados dos filmes A, B e C. Na análise do difratograma dos filmes, em comparação ao da quitosana pura, foi observado que as áreas dos picos relativos a quitosana apresentaram uma relativa diminuição principalmente após a adição do EDAC. No entanto, pode ser observado que a reticulação do polímero pelo ácido adípico na presença do EDAC induz a atenuação do pico que depende exatamente da quantidade de água (0 2 0), o que não é observado no filme A que não recebeu adição do ativador. Essa condição também foi observada nos estudos de Costa Jr. (2008, p. 75) onde também foi observada atenuação deste pico após o uso do glutaraldeído como reticulante da quitosana.

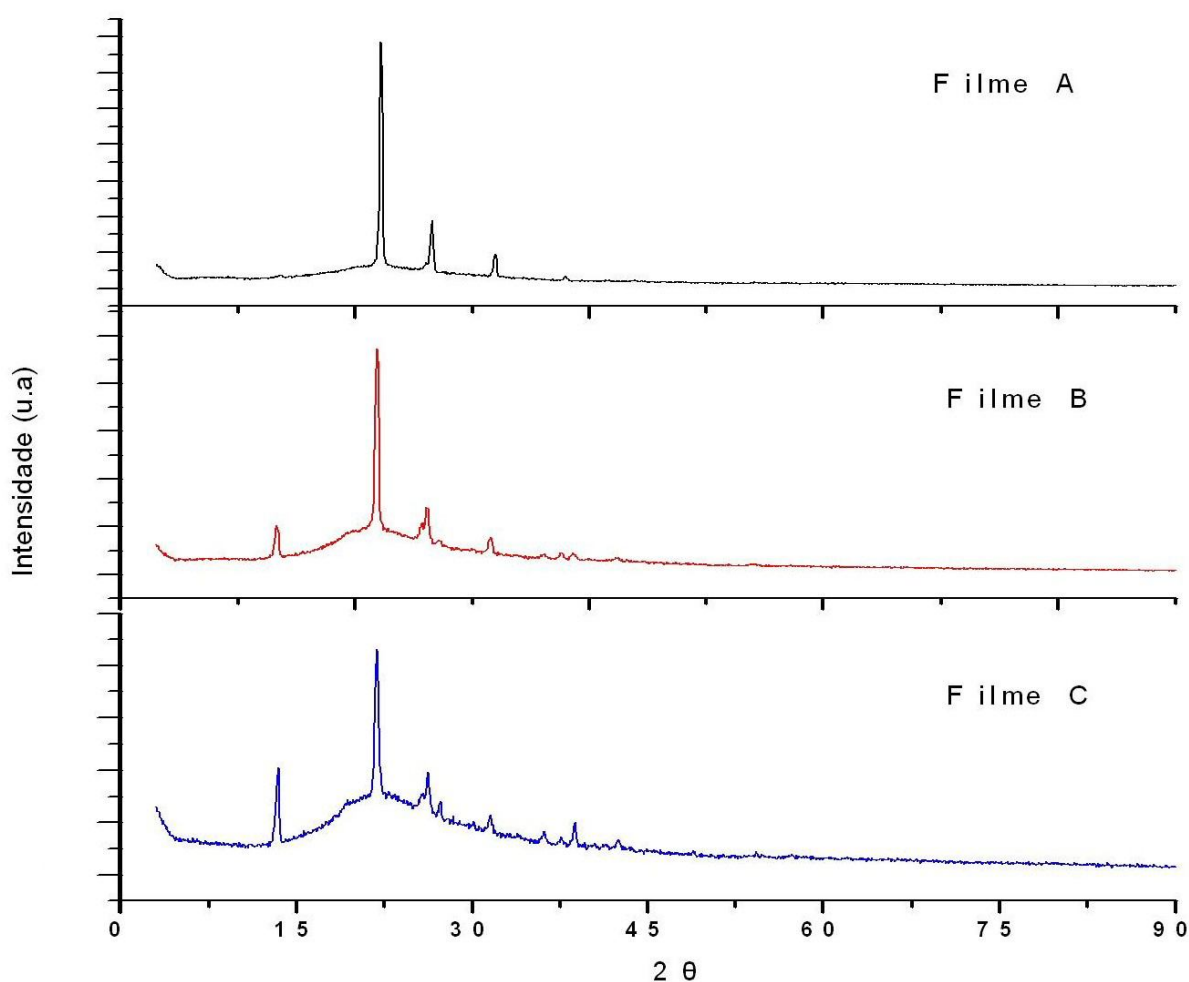


Figura 20 – Difratograma dos filmes de Quitosana e ácido adípico com Filme A 0,00%, Filme B 0,06% e Filme C 0,11% de EDAC, obtidas por DRX.

Em relação a cristalinidade dos filmes obtidos, foi observado maior cristalinidade dos mesmos em relação a da quitosana pura. Isso se deve a alta cristalinidade do ácido adípico.

No entanto, com a adição do ativador, observou-se uma diminuição significativa na cristalinidade no filme B (26%) e no filme C (23%) em comparação ao filme A (35%) provavelmente ligado ao aumento do grau de reticulação. Esse resultado era esperado, visto que com a adição do EDAC, o processo de reticulação química é favorecido em relação a reticulação iônica, apresentada naturalmente nos filmes de quitosana associada a diácidos.

5.3.5 Caracterização das propriedades mecânicas

Para os testes mecânicos foram utilizadas amostras não lavadas que apresentavam espessura média de $(78\mu\text{m} \pm 15\mu\text{m})$, a temperatura durante o ensaio foi de 28°C . A Tabela 11 apresenta os valores médios dos resultados obtidos nos ensaios de resistência mecânica a tração. A figura 21 (pagina 64) apresenta os gráficos de tração com as curvas dos filmes A (a), filme B (b) e filme C (c) respectivamente. A análise estatística (ANOVA) realizada sobre o conjunto de valores obtidos apresentou resultados significativos ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Valores de Tenacidade, Tensão de ruptura e Módulo de elasticidade com seus respectivos valores de desvio padrão.

Valores dos ensaios mecânicos e desvios padrão (MPa)						
	Tenacidade		Tensão de Ruptura		Módulo de Elasticidade	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
Filme A	1,78	0,001	17,08	1,24	131,56	0,25
Filme B	0,56	0,095	6,25	1,03	108,86	0,25
Filme C	0,44	0,049	5,36	0,58	97,35	0,006

O módulo de elasticidade (módulo de Young) é o dado que está diretamente relacionado com a rigidez de um material, quanto mais rígido o material, maior será o seu módulo de elasticidade. Quando trata-se de materiais semi-cristalinos, quanto mais estruturas cristalinas formadas no material, maior a densidade, maior a rigidez do mesmo, porém maior também a tendência de formação de concentradores de tensão na matriz, aumentando com isso a possibilidade de fragilização do material. A tensão de ruptura aumentará também com o aumento do grau de cristalinidade, bem como a tenacidade do material (CANEVAROLO, 2002).

O processo de reticulação tende a diminuir a cristalinidade do material, já que as moléculas do polímero passam a não obter a mobilidade necessária para a organização durante o processo de cristalização. Por meio da análise dos dados é possível observar que o

comportamento apresentado pelos filmes endossa essas informações (CANEVAROLO, 2002).

É possível observar que o filme A apresentou os maiores valores de tenacidade, módulo de elasticidade e tensão máxima de tração (tensão de ruptura), isso devido a seu maior grau de cristalinidade, comprovado pelo DRX realizado do material. O filme B já demonstra a diminuição nesses valores, relativo ao processo de reticulação ao qual foi submetido, em que foi reduzida a cristalinidade, mas aumentada a imobilidade das cadeias poliméricas. Em sequência o filme C, possuidor da maior densidade de reticulações apresentou, como consequência, os menores valores dentro do ensaio realizado. Esses padrões foram observados também nos estudos de Costa Jr e Mansur (2008, p. 64) com o uso do reticulante glutaraldeído e de Bispo e Mansur (2009, p.85) com o uso de Genipin como reticulante. Esse comportamento se deve a menor mobilidade das cadeias reticuladas, com isso a força aplicada não é suficiente para aumentar essa movimentação das cadeias levando a maior fragilidade dos filmes e ao seu rompimento com tensões menores (BISPO, 2009).

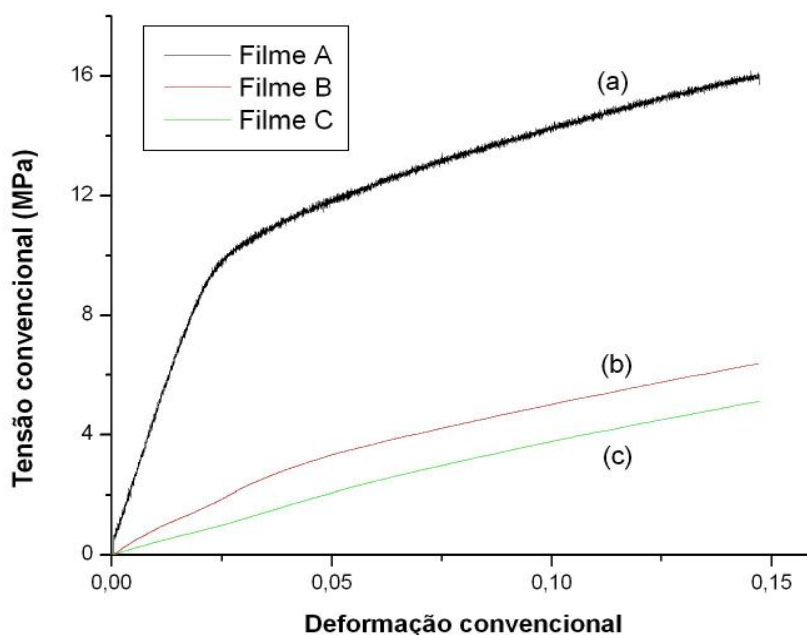


Figura 21 – Gráfico de Tensão x Deformação apresentando as curvas (a), (b) e (c) respectivamente dos filmes A 00,%, filme B 0,6% e filme C 0,11% de EDAC.

Tendo em vista os objetivos do estudo desse material, os valores obtidos de suas propriedades mecânicas são compatíveis com sua utilização como biomaterial direcionado ao tratamento de lesões cutâneas, pois a pele possui valores típicos de tensão de tração na faixa de 2,5–16MPa (CERVERA, 2004).

5.3.6 Medida do grau de intumescimento (GI)

Para o estudo de hidrogéis, principalmente para a finalidade pretendida nesse estudo, a análise do grau de intumescimento é de extrema importância. Fatores como a disponibilidade de grupos hidrofílicos, densidade de reticulação, a temperatura, variações do pH do meio podem alterar o grau de intumescimento de um filme (SADAHIRA, 2007; AOUADA, 2005).

A figura 22 demonstra as curvas relativas ao grau de intumescimento dos filmes em solução tampão de pH 4 e a figura 23 (página 66) demonstra o grau de intumescimento dos filmes em solução tampão de pH7.

O processo de intumescimento segue 3 passos principais: 1) difusão das moléculas do solvente para a rede polimérica; 2) Relaxação das cadeias dos polímeros devido ao processo de hidratação; 3) Expansão da rede polimérica e o intumescimento da matriz (SADAHIRA, 2007).

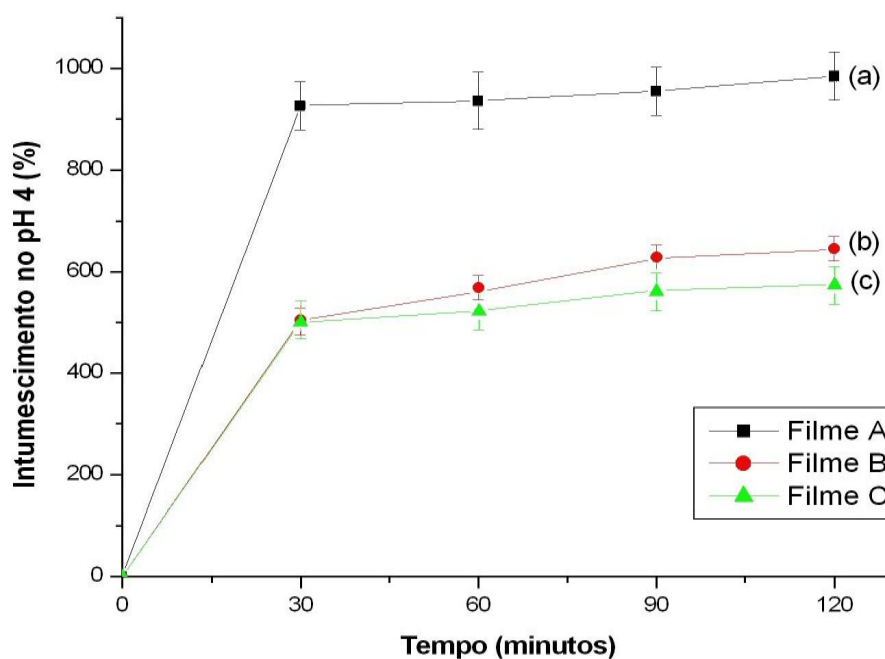


Figura 22 – Perfil de intumescimento dos filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) no pH 4.

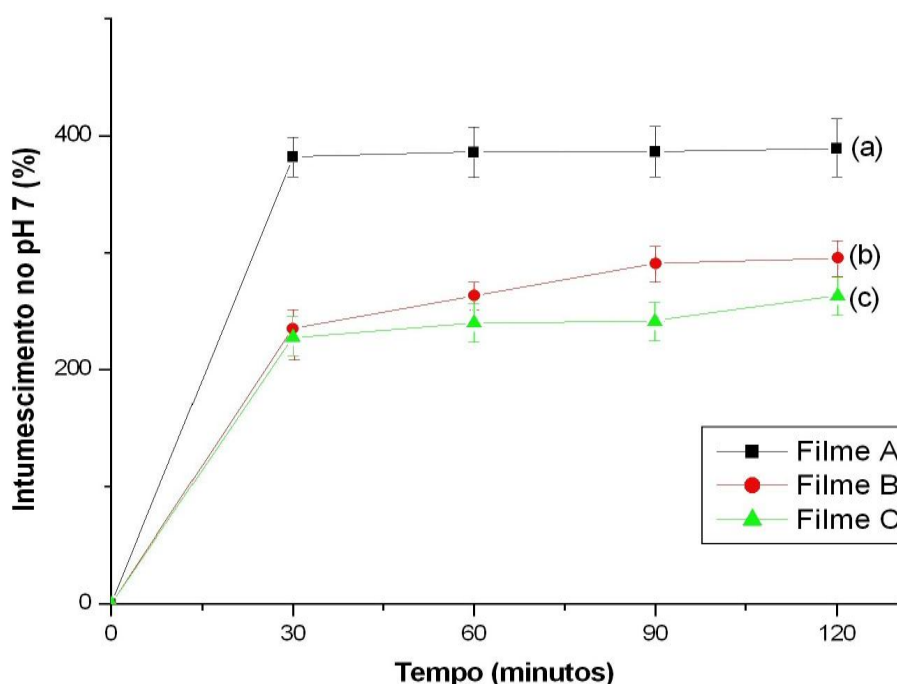


Figura 23 – Perfil de intumescimento dos filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) no pH 7.

É possível observar por meio dos gráficos que o filme A possui o maior grau de intumescimento, seguido respectivamente do filme B e finalmente o filme C. Isso ocorre devido ao fato dos materiais com maior grau de reticulação, que possuem menos grupos hidrofílicos expostos, são menos capazes de permitir que a água se difunda através da rede do polímero. O resultado obtido é uma redução do grau de intumescimento dos filmes B e C em comparação com o observado no filme A, nos dois pHs testados (SADAHIRA, 2007).

É possível observar também que o intumescimento é maior no pH 4 do que no pH 7, isso ocorre uma vez que dentro da faixa de pH 3-6, os grupos amino das cadeias do polímero estão protonados, isto leva a repulsão entre as cadeias e, conseqüentemente, maior solvatação, por conseguinte, os filmes passam a ter mais grupos hidrofílicos expostos e disponíveis para interações do tipo ligação de hidrogênio e íon-dipólo com a água, levando a maior intumescimento dos hidrogéis de quitosana no pH4 (RINALDO, 2006).

5.3.7 Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)

A figura 24 (página 67) apresenta o esquema utilizado para as análises de Transmissão de Vapor D'água ($n=3$), bem como imagens relativas ao ensaio. Os resultados representados na tabela 12 demonstram a TVA encontrada para os 3 materiais ($28,3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5$) produzidos e que esta foi afetada pela presença e proporção de reticulações nos mesmos. A análise

estatística (ANOVA) realizada sobre o conjunto de valores obtidos apresentou resultados significativos ($p < 0,05$), variando de acordo com a concentração de EDAC adicionado ao material.

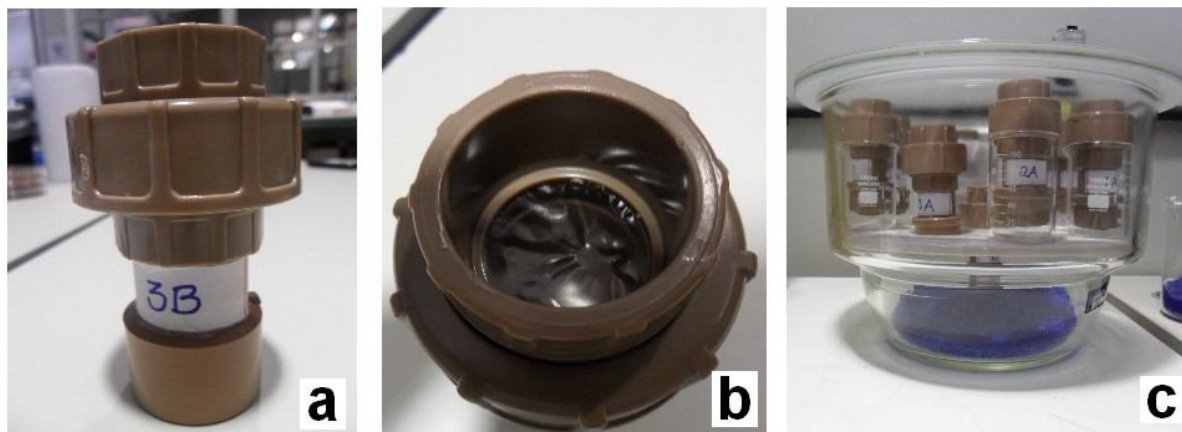


Figura 24 – Esquema do sistema utilizado para as análises de Transmissão de Vapor D'água: (a) Copo de Paddington modificado, (b) Filme preso ao copo de Paddington modificado e (c) Sistemas montados no dessecador (BELISÁRIO et al., 2012).

Tabela 12 – Valores de perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água dos filmes.

Valores de perda de peso e taxa de transmissão de vapor d'água e desvios padrão				
	Perda de Peso g/120h		TVA (g / m ² . 24h)	
	média	d.p.	média	d.p.
Filme A	1,1249	0,025	467,516	11,98
Filme B	1,1592	0,024	478,362	11,19
Filme C	1,1953	0,096	483,071	27,21

O filme A (0,0% EDAC) apresentou a menor taxa de transmissão de vapor d'água, que pode ser observada pela menor perda de massa durante as 120 horas de análise, pelo dispositivo que o continha (Figura 25, página 68). Ao mesmo tempo é possível observar os maiores valores de perda de massa seguiram do filme B (0,06% EDAC) ao filme C (0,11% EDAC) respectivamente. O fenômeno apresentado deve-se ao fato de que o filme do tipo A possuem maior quantidade de grupos hidrofílicos disponível, o que confere a ele maior afinidade pela água, com a qual faz ligações de hidrogênio. Os filmes dos Tipos B e C possuem reticulações do tipo covalentes que limitam a quantidade de grupos hidrofílicos a disposição para interação com a água, apresentando, portanto, maiores valores de perda total de massa e maiores taxas de transmissão de vapore d'água, sendo o filme B com menor número de reticulações possuidor de valores de transmissão ligeiramente menores

do que o filme C com maior número de reticulações e portanto, detentor dos maiores valores (ROSINA; BARONI; CAVALCANTI, 2004)

Lesões cutâneas, em principal as queimaduras e as úlceras, tem a capacidade de destruir a conservação fluidica normal do local lesionado e essa função de conservação é mais deteriorada a medida que a lesão aumenta. A manutenção da umidade no leito da ferida, bem como seu controle é muito importante para um boa cicatrização, por tal motivo, tanto a perda excessiva de líquidos pelo leito da ferida, que pode levar a abertura das bordas da ferida, quanto sua retenção por trás dos curativos, que pode levar a masseração do tecido em formação trazendo dor e desconforto ao paciente, são problemas muito significativos referentes ao tratamento, principalmente de pacientes com lesões por queimaduras graves (WU et al., 1996; QUEEN et al., 1987).

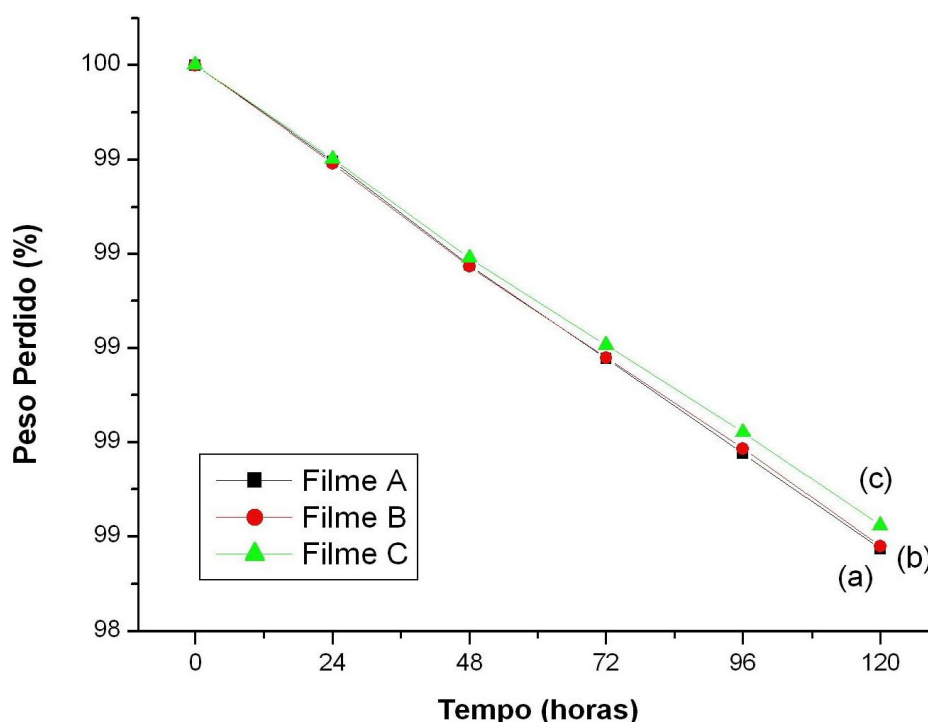


Figura 25 – Perda de peso dos sistemas com os filmes A (a) (EDAC 0,00%), B (b) (EDAC 0,06%) e C (c) (EDAC 0,11%) em função do tempo.

Devido a esses fatores um curativo ideal seria aquele que consegue manter o leito da ferida com umidade satisfatória, mas sem reter completamente o exudato, ou seja, um curativo que se aproxime o máximo possível da manutenção exercida pela pele integra (QUEEN et al., 1987). Os estudos de Lamke e seus colaboradores (1977) indicaram que a perda de água por evaporação em algumas condições do tecido epitelial, como demonstra a tabela 13 (página 69). Porém entendendo as diferenças na perda de água apresentadas pelos tecidos em relação a gravidade da lesão, Wong (1980), sugeriu que a perda de líquido através de

um curativo destinado a queimaduras deveria ser em torno de $2000 - 2500 \text{ g/m}^2 \cdot 24\text{h}$, ou seja, aproximadamente metade do valor da liberação de líquido do tecido de granulação que por sua vez trata-se da condição do tecido lesado que promove a maior perda de água por evaporação. Esse valor de TVA seria suficiente para manutenção da umidade adequada a boa cicatrização do leito da ferida.

Uma TVA muito baixa em relação aos valores mencionados pode acarretar em 3 circunstâncias clinicamente indesejáveis a um curativo: Aumento da pressão no local da lesão, provocada pela oclusão e resistência do material a saída do vapor d'água, o que pode causar dor ao paciente; Estravazamento de líquido pelas bordas do curativo com possível maceração do tecido lesado, o que também causaria dor ao paciente; Elevação do curativo nas extremidades resultando em exposição das bordas da ferida e consequentemente abertura a entrada de microorganismos (QUEEN et al., 1987).

Tabela 13 – Valores da perda de água por evaporação encontrados por Lamke et al.(1977) em seus estudos para determinadas condições do tecido epitelial.

Condições do tecido	Taxa da perda de água por evaporação (g/ m². 24h)	Temperatura do tecido epitelial
Pele integra	$204,0 \pm 12$	$35,8 \pm 0,2$
Queimadura de 1° grau	$278,4 \pm 26$	$35,3 \pm 0,1$
Queimadura de 2° grau	$4274,4 \pm 132$	$35,3 \pm 0,4$
Queimadura de 3° grau	$3436,8 \pm 108$	$34,5 \pm 0,4$
Tecido de granulação	$5138,4 \pm 201$	$34,7 \pm 0,2$

De acordo com os resultados obtidos, os materiais testados seriam oclusivos se destinados a queimaduras de profundidade igual ou superior ao segundo grau. A justificativa para os baixos valores de TVA apresentados está associado a provável baixa porosidade dos filmes obtidos. Apesar da espessura relativamente pequena ($38 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$) os filmes produzidos são densos e possuem considerável cristalinidade, comprovada pela análise de DRX. Tais motivos levam a necessidade de maiores pesquisas para aumentar a porosidade relativa desses materiais e com isso sua TVA, acarretando assim uma provável melhoria na performance como possível curativo dérmico.

5.3.8 Análise do comportamento térmico dos filmes

A figura 26 (página 71), mostra a curva de DSC para os filmes A (EDAC 0,00%), B (EDAC 0,06%) e C (EDAC 0,11%) sob atmosfera de N_2 na faixa de temperatura de 30 a 300°C, para todos os materiais foram observadas a ocorrência de três picos. Um pico endotérmico, cujo ápice denota a temperatura de 66°C e de maior intensidade para o filme A, 64°C para o filme B com pico de média intensidade em relação aos picos de A e do filme C, pico de menor intensidade e de ápice em 48°C. Esses três picos seriam correspondentes ao processo de desidratação dos materiais. Os valores apresentados pelo processo de desidratação vão decrescendo de acordo com o grau de reticulação apresentado pelo material testado, sendo que o material A que não apresentou reticulações covalentes possui a maior temperatura de desidratação, isso deve-se provavelmente a maior disponibilidade de grupos hidrofílicos presentes em sua estrutura, levando a interações intermoleculares mais intensas com a água e portanto a necessidade de uma maior temperatura para liberação da umidade presente nesse material, além disso é provavelmente que maior quantidade de água estivesse presa ao mesmo, tendo em vista as informações obtidas na análise de intumescimento realizada nos filmes, que teve o filme A como o material de maior grau de intumescimento de todos os testados.

Um segundo pico, agora exotérmico, apresentou ápice em 148°C para o Filme A, 138°C para o Filme B e um pico de maior intensidade na temperatura de 125°C para o Filme C. Esse pico é provavelmente correspondente ao processo de cristalização dos materiais analisados. Esse fenômeno ocorre por meio da formação de núcleos de cristalização e seu crescimento. Através das fotomicrografias realizadas em microscópio óptico já foi possível visualizar os núcleos dos cristais que já haviam se formado no material. Os núcleos são os pontos a partir dos quais nascem e crescem os cristais em temperaturas de cristalização (T_c) acima da transição vítrea (T_g) e abaixo do ponto de fusão (T_m), esse processo acarreta em decréscimo da energia livre do sistema, ou seja, em um fenômeno exotérmico. Porém a velocidade em que essa fase cristalina surge depende de dois fatores: velocidade de nucleação e da velocidade de crescimento (AKCELRUD, 2007). Com a submissão dos materiais a altas temperaturas, sem o resfriamento durante a análise de DSC é possível que mais núcleos tenham sido formados e esses tenham se cristalizado ainda durante o aquecimento. Esse fenômeno de cristalização também foi observado por Sun e seus colaboradores (2007, p. 1569) que através da associação de quitosana, PEG e PNIPAAm constataram o surgimento de um terceiro pico em relação a curva de DSC da quitosana pura, e também constataram ser relativo ao processo de cristalização do material com ápice em aproximadamente 168°C. Essa capacidade da quitosana cristalizar na presença de

ácido adípico sem e com a adição do ativador EDAC, reitera os resultados obtidos na análise de DRX onde ambos os materiais, mesmo que em proporções diferentes apresentaram cristalização maior que a da QUI pura. Além disso, foi realizada análise de DRX comparativa entre um filme C que foi submetido a secagem por 2 horas sob temperatura de 50°C e um filme C submetido a secagem por 2 horas a 100°C e foi observado aumento da cristalinidade de 23% para 30%, o que evidencia que os materiais produzidos neste estudo tem sua cristalinidade aumentada quando submetidos a temperaturas elevadas.

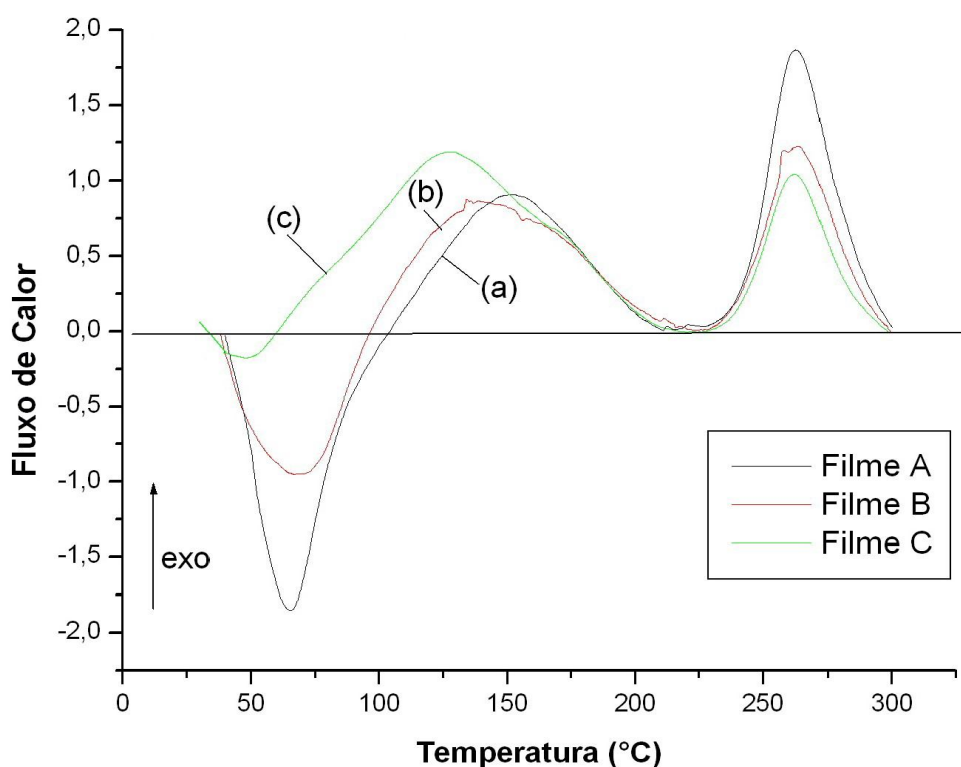


Figura 26 – Curvas de DSC das amostras dos filmes A com 0,00% (a) de EDAC, filmes B com 0,06% de EDAC (b) e filmes C com 0,11% de EDAC sob atmosfera de N_2 (30 a 300°C).

Além disso é possível observar as diferenças nas temperaturas inicial e final do processo de cristalização dos três materiais, sendo para o filme A, que já possui maior cristalização e apenas reticulações iônicas, ocorre uma maior velocidade no processo de cristalização, com menor fluxo de calor envolvido no processo em um menor intervalo de temperatura (103 – 213°C). O filme B, apresentou um intervalo de T_c intermediário entre o material A e o material C (95 – 223°C) e como esperado, o filme C apresentou o maior intervalo de T_c (58 – 215°C) e o maior fluxo de calor envolvido no fenômeno observado, isso devido ao maior número de reticulações presentes e menor mobilidade e maior distanciamento das cadeias poliméricas da quitosana, levando portanto, a um maior intervalo de temperatura para

ocorrência da organização necessária ao processo de cristalização.

Os polissacarídeos tendem a não apresentar a Temperatura de fusão (T_m), de acordo com Sun e colaboradores (2007, p.1569) isso é devido a grande quantidade de grupos -OH presentes nestes polímeros, levando-os a degradação antes que ocorra essa transição térmica. Devido a esse fator é possível observar um segundo pico exotérmico para todos os materiais estudados, ambos com ápice na temperatura de 262°C. A esse pico foi atribuído o fenômeno de degradação e carbonização, comprovada a partir da observação das amostras pós análise. O valor para essa decomposição foi menor para os filmes em comparação com a carbonização da quitosana pura (304°C), fenômeno esse que se repetiu na análise termogravimétrica.

Na figura 27 (página 73) é possível observar a curva de TGA e suas derivadas para as amostra dos três filmes em estudo. É possível observar dois eventos térmicos, o primeiro relativo a desidratação dos materiais analisados e o segundo referente a carbonização do material. Os valores dos intervalos de temperatura referentes aos eventos térmicos observados na análise de TGA são comparáveis aos observados na análise de DSC e assim como nesta análise, a degradação dos materiais ocorreu em temperaturas inferiores ao da quitosana pura, ou seja, possuem menor estabilidade térmica que a mesma.

A diminuição da estabilidade térmica dos filmes produzidos também foi observada nos estudos de Horn (2012, p. 109) em blendas de quitosana/amido e sorbitol e nos estudos de Vans (2010, p. 45) para blendas de quitosana/PVA na presença de ZnO e clorofilina cúprica de sódio, onde ambos atribuíram essa ocorrência a redução das interações intermoleculares existentes primariamente entre as cadeias da quitosana, redução essa provocada pelo distanciamento das moléculas devido a associação destes compostos a sua matriz.

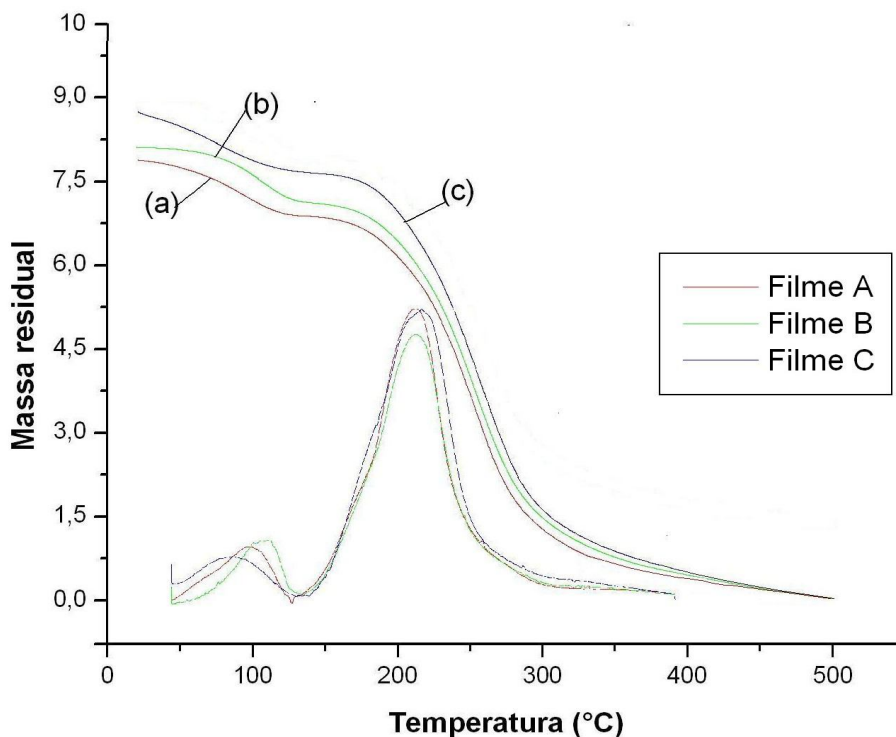


Figura 27 – Curvas de TGA das amostras dos filmes A com 0,00% (a) de EDAC, filmes B com 0,06% de EDAC (b) e filmes C com 0,11% de EDAC sob atmosfera de N_2 (25 a 500°C).

As variações de massa e os intervalos de temperatura dos ensaios podem ser verificados na tabela 14 juntamente e comparativamente aos valores dos picos de DSC.

Tabela 14 – Resumo dos resultados de TGA e DSC para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) das amostras dos filmes de QUI/Ácido adípico sem e com adição do ativador EDAC sob atmosfera de nitrogênio.

Evento térmico	TGA		DSC
	Intervalo de temperatura / °C	Perda de massa / %	Picos / °C
A.nH ₂ O → A + nH ₂ O	58 – 132	18,6	66 (endo)
A cristalizado → RC	172 – 497	81,4	262 (exo)
B.nH ₂ O → B + nH ₂ O	52 – 130	14,8	64 (endo)
B cristalizado → RC	173 – 497	85,2	262 (exo)
C.nH ₂ O → C + nH ₂ O	21 – 122	13,4	48 (endo)
C cristalizado → RC	171 – 497	86,6	262 (exo)

5.4 Caracterização Biológica dos filmes de hidrogel por metodologia *In Vitro*

5.4.1 Análise da viabilidade celular por MTT

Uma vasta gama de métodos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de materiais destinados ao uso biomédico foram padronizados por meio de uso de culturas celulares. O ensaio de redução do MTT é um deles, pois permite de forma simples que seja quantificado o metabolismo deste sal pelas células cultivadas sob o material testado e assim verificar a viabilidade da cultura empregada no estudo. Essa quantificação é possível pois o MTT, quando metabolizado pelas células, tem seus derivados metabólicos acumulados em forma de cristais de tetrazólio e formazana. Esses cristais, quando levados a um espectrofotômetro podem ser quantificados e com isso a a viabilidade celular da cultura empregada na análise pode ser mensurada em porcentagem, ou seja, quanto maior a leitura, maior a viabilidade (MANSUR; PEREIRA; ORÉFICE, 2005; COSTA Jr., 2008).

Na figura 28 (página 75) estão os registros fotográficos realizados após 2 horas de incubação com microscópio óptico e onde é possível visualizar as células viáveis em meio aos cristais tetrazólio e formazana. Os gráficos da viabilidade das células VERO (figura 29, página 76) e da viabilidade das células BHK-21 (figura 30, página 76) demonstram que porcentagem de viabilidade da células VERO variou de 104% a 113% e das células BHK-21 de 82% a 96%, utilizando como comparação o controle de células das duas culturas, células cultivadas no meio sem o material, como 100% de viabilidade respectivamente e o controle negativo, células postas no meio de cultura com adição de Triton, substância citotóxica. Com esses resultados podemos dizer que os filmes produzidos são biocompatíveis, uma vez que a viabilidade mínima é de 50% e por tal motivo possuem potencial para utilização como biomateriais, sendo propícios a ensaios *in vivo*. Além disso eles induziram a proliferação celular das células VERO, esse fator é de suma importância, pois é um indicativo que os estes materiais podem potencializar o mecanismo de cicatrização.

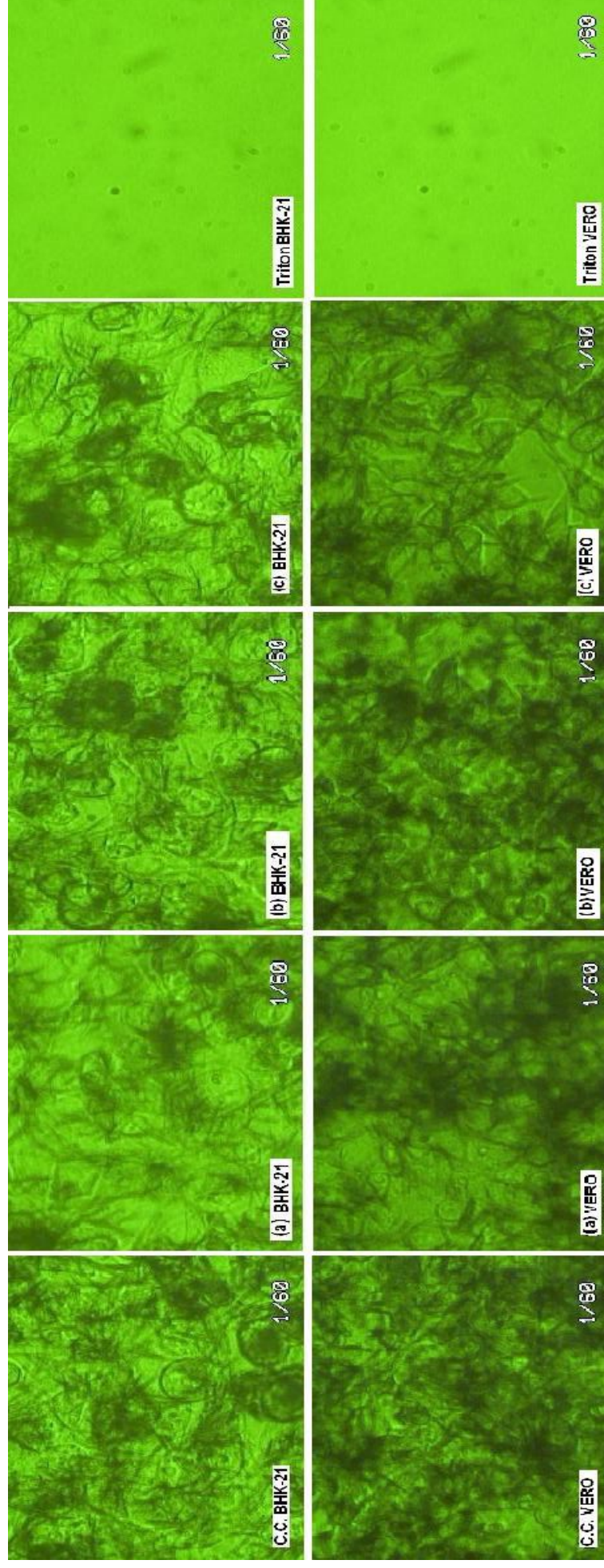


Figura 28 – Imagens feitas por MO dos filmes (a) 0,00%, (b) 0,06% e (c) 0,11% de EDAC após 24 do cultivo das células BHK-21 e VERO respectivamente e 2 horas após a incubação com MTT.

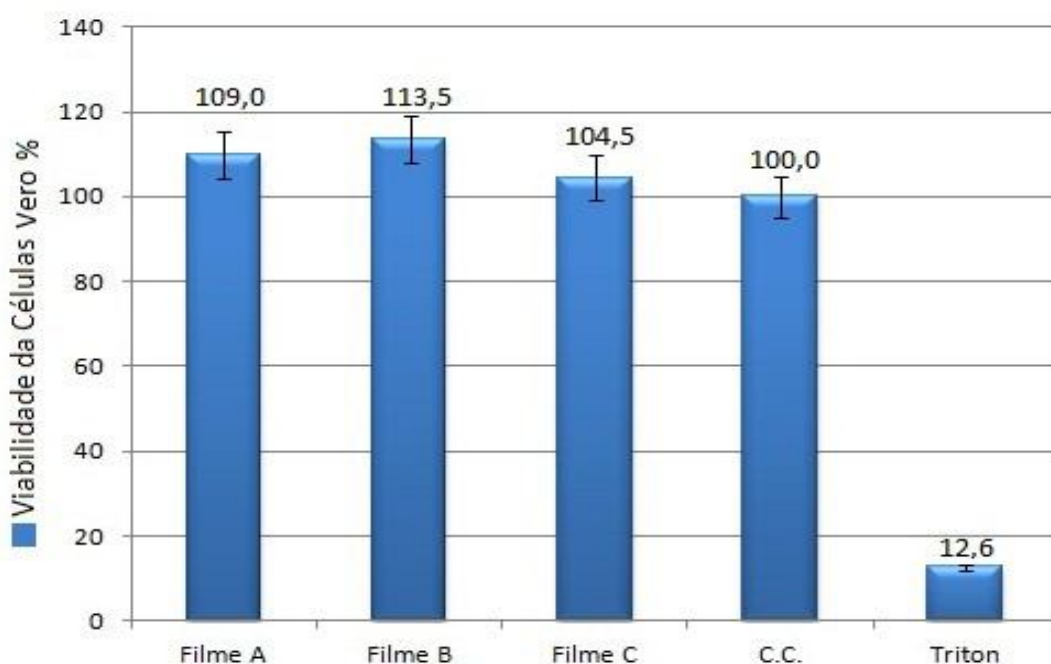


Figura 29 – Viabilidade de células VERO analisadas com a metodologia de MTT.

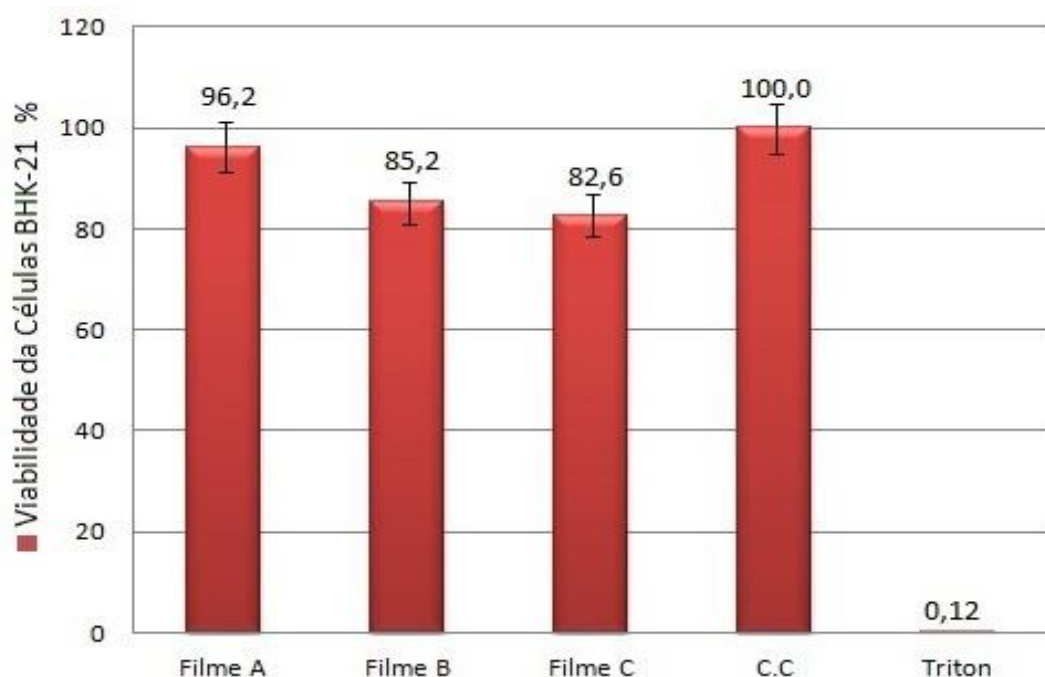


Figura 30 – Viabilidade de células BHK-21 analisadas com a metodologia de MTT.

5.4.2 Análise da Adesão celular

As figuras 31 e 32 (página 78 e 79) apresentam as imagens feitas por MEV da superfície dos filmes cultivados com células VERO e BHK-21. A adesão celular é o processo que permite que as células mantenham-se unidas nos tecidos e em conexão com o

citoesqueleto interno, tendo para isso uma variedade de mecanismos de adesão. A adesão a matriz extracelular é o que mantém a integridade dos tecidos, sua regeneração quando lesionados, onde as células se ligam a componentes da matriz de colagénio intersticial ou à membrana basal (GUMBINER, 1996).

A liberação dessa matriz extracelular é responsabilidade das próprias células, que devem além de secretá-la, organizá-la e degradá-la. Essa matriz, além de permitir a adesão e proliferação das células a ela aderidas, exerce também influências sobre essas células através de proteínas transmembranares de adesão celular que atuam como receptores de matriz, que por sua vez, possuem um papel importante nas células epiteliais, pois atuam na mediação das interações destas células com a lâmina basal. (ALBERTS, 2004).

O que se espera de um biomaterial destinado ao tratamento tópico de lesões é que as células semeadas nas matrizes apresentem boa aderência e espalhamento. Que a morfologia das células apresentem-se regulares para a linhagem fibroblástica e assim permita que a qualidade desta fase leve a proliferação e diferenciação celular e a adequada cicatrização do tecido lesado (BISPO, 2009).

Nas figura 31 e figura 32 estão as imagens que mostram as células BHK-21 e VERO, respectivamente, com morfologia característica. As imagens evidenciam a presença da matriz de adesão celular e a viabilidade das células cultivadas que se mantem proliferando e cobrindo o substrato, ou seja, continuaram biologicamente ativas. Estas características puderam ser observadas em todos os filmes cultivados e em vários campos avaliados.

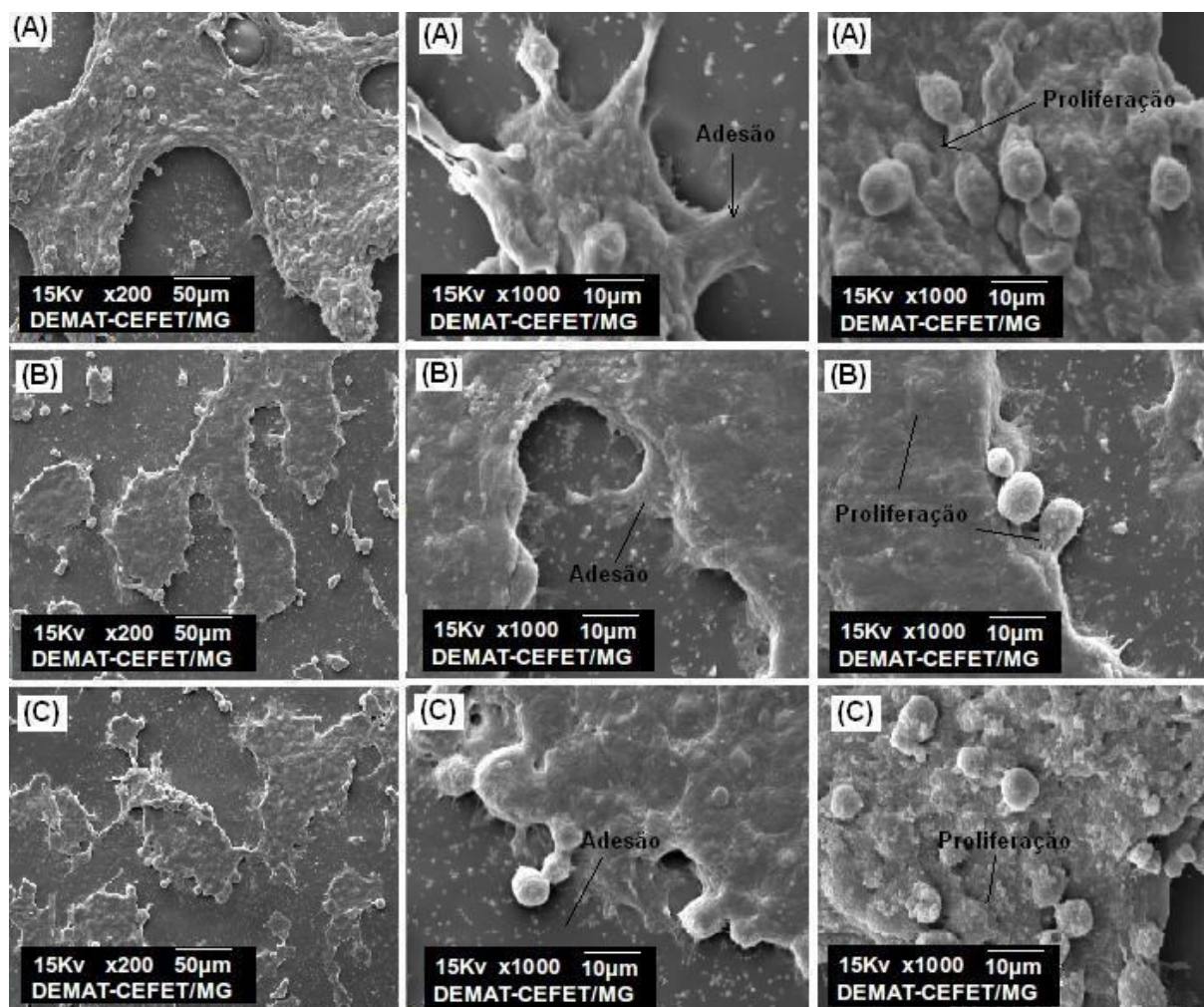


Figura 31 – Imagens de MEV para os filmes A, B e C respectivamente, evidenciando morfologia, adesão e proliferação das células BHK-21.

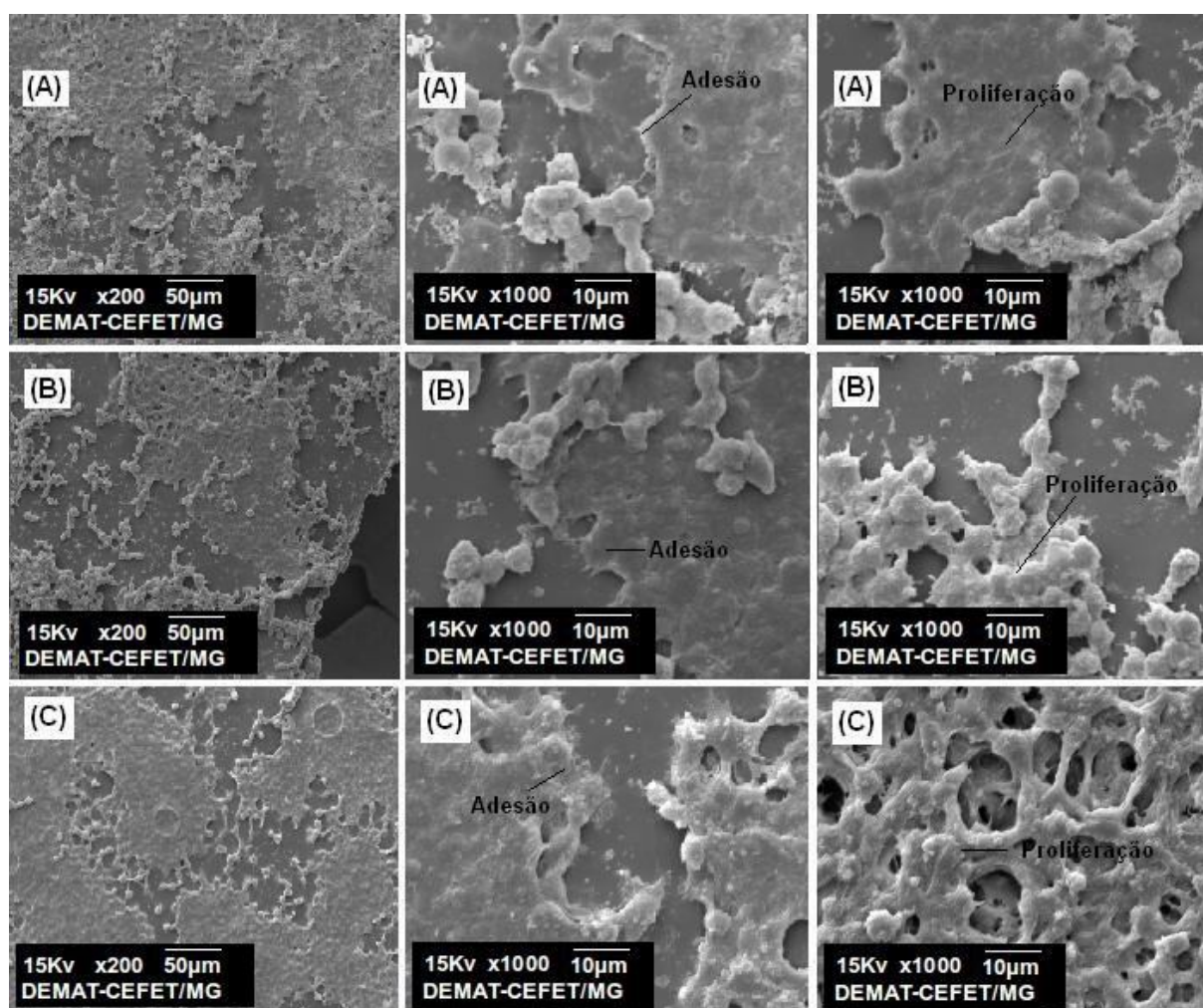


Figura 32 – Imagens de MEV para os filmes A, B e C respectivamente, evidenciando morfologia, adesão e proliferação das células VERO.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidos filmes de Quitosana e ácido adípico sem e com adição de um ativador do ácido, uma carbodiimida solúvel em água. A caracterização da matéria-prima além de comprovar a composição química do material utilizado, deu subsídio para análises e comparações com os filmes obtidos.

Os filmes por sua vez foram extensamente estudados no intuito de se obter suas características físicas, químicas, mecânicas e biológicas com vistas a utilização como biomaterial para utilização potencial como biomaterial no tratamento de lesões cutâneas.

A técnica de espectroscopia de infravermelho evidenciou que os filmes ao qual foi adicionado o ativador EDAC apresentaram bandas características da reticulação do ácido adípico pela amina da quitosana a partir da formação do grupamento $(C=O)NH_2$.

Os resultados mostraram que as diferentes proporções do ativador EDAC são capazes de modular as propriedades dos filmes de hidrogel no que diz respeito, principalmente a cristalinidade, ao intumescimento, as propriedades térmicas, propriedades mecânicas e biológicas.

Em relação a cristalinidade, o aumento do grau de reticulações covalentes levou a diminuição da mesma em relação aos filmes de hidrogel produzidos sem o ativador, ou seja, reticulados ionicamente. O aumento da proporção de reticulação modulou o comportamento de intumescimento e transmissão de vapor d'água. Da mesma forma, o gradual aumento da reticulação covalente levou a diminuição da tenacidade, módulo de elasticidade e tensão de ruptura do filmes, isso devido a diminuição gradual da cristalinidade dos mesmos.

Tendo-se proposto como objetivo para este trabalho o desenvolvimento e caracterização de hidrogéis a base de quitosana reticulados com ácido adípico, os hidrogéis obtidos apresentaram características que os habilitam a estudos adicionais visando sua utilização em fins biomédicos, como curativos ou como um componente em sistema de liberação de fármacos. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para permitir a continuidade no estudo desses materiais afim de aprofundar o conhecimento sobre esse sistema de modo a se criar um material para ser usado como curativo destinado ao tratamento de lesões dérmicas, auxiliando no conforto e melhoria do tratamento de pacientes com esse tipo de enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABA – American Burn Association. **National burn repository: 2011 report**. Disponível sem: <<http://www.ameriburn.org/2011NBRAAnnualReport.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2012.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1133 p.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 10 de abr. 2012.
- ARENAS, R. **Atlas de dermatologia: diagnóstico e tratamento**. 3. ed. McGrawRill, 2005.
- AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos Polímeros**. Barueri: Editora Manole, 2007. 270 p.
- AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL. **ASTM D882/02**: standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. New York, 2002.
- AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL. **ASTM E96/10**: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Pennsylvania, 2010.
- ANDRADE, M. N. B.; SEWARD, R.; MELO, J. R. C. Curativos. **Revista Médica de Minas Gerais**, 1992.
- AOUADA, F. A. **Síntese e caracterização óptica, morfológica e mecânica de hidrogéis de poliacrilamida com material eletro-óptico confinado: polímero condutor e cristais líquidos**. 2005. 134 f. Dissertação (Mestrado em química) – CCE-DQI, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- ARAÚJO, A. **Seu trabalho seguro: queimaduras**. 2009. Disponível em: <<http://seutrabalhoseguro.blogspot.com.br/2009/12/slides-sobre-queimaduras.html>>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 28, p. 409-412, 2010.
- BELISÁRIO, A. L. B. et al. Permeação microbiana e propriedades de barreira de filmes de quitosana. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BIOMATERIAIS E ORGÃOS ARTIFICIAIS S, 7., 2012, Natal. **Anais eletrônicos...** Natal: UFRN, 2012. Disponível em: <<http://colaob.com.br/anais>>. Acesso em: 09 out. 2012.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 9, n. 4, p. 163-169, out. 1999.
- BERGER, J. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57 p. 19–34, 2004.

BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. 206 f. Tese (Doutorado em ciência e engenharia de materiais) – Engenharia Metalúrgica e de Minas, CPGEM-EEUFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BODINI, R. B. **desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado ciência da engenharia de alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Belo Horizonte.

BOLGIANI, A. N.; SERRA, M. C. V. F. Atualização no tratamento local das queimaduras. **Revista brasileira de queimaduras**, Buenos Aires, v. 2, n. 9, p. 38-44, 2010.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J. F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of Controlled Release**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.) **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw, 2006.

CANDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: SENAC, 2001, 282 p.

CANEVAROLO, S. V. **Ciências dos Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Editora Líber, 2002.

CARNEIRO, G. **Lipossomas contendo paromomicina: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeação cutânea *in vitro***. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, PPGCF, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CAVALCANTI, O. A.; CÍCERE, L. Material de acondicionamento e embalagem primária: avaliação da permeabilidade ao vapor d'água. **Arquivos de ciência e saúde da Unipar**, v. 1, n. 6, p. 57-60, 2002.

CERVERA, M. F. et al. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized polyols. **AAPS Pharmaceutical Science e Technology Today**, v. 5, n. 1, 2004.

CHATELET, C. et al. Influence of degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.

CHEN, P. et al. Use of dicarboxylic acids to improve and diversify the material properties of porous chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 9015-9021, 2008.

COSTA JR., E. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 151 f. Tese (Doutorado em ciência e engenharia de materiais) – Engenharia Metalúrgica e de Minas, CPGEM-EEUFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA JR., E. S. MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, set. 2008.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. 2. ed. São Paulos: Atheneu, 2001.

DON, T. et al. Preparation and characterization of chitosan-g-poly (vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, Taipei, n. 63, p. 331–339, 2006.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientificand Industrial Research**, Allahabad, v. 63, p. 20-31, Jan. 2004.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2. ed. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2002.

FIGURA 1 - **Anatomia e fisiologia humanas: a pele e o sentido do tato**. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

FIORUCCI, A. R.; Soares, M. H. F. B.; Cavaleiro, E. T. G. **Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano**. Química Nova na Escola, n. 15, p. 6-10, 2002.

FITZPATRICK, T. B. et al. **In Color atlas and synopsis of clinical dermatology**. 5. ed. Massachusetts : Mc Graw Hill, 1997.

FRANÇA, L. H. G.; TAVARES, V. Insuficiência venosa crônica. Uma atualização. **Jornal vascular brasileiro**, Curitiba, v. 2, n. 4, p. 318-328, 2003.

GABRIEL, V. Hypertrophic scar. **Physical Medicine e Rehabilitation Clinics of North America**, v. 22, p. 301-310, 2011.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

GIMENES, G. A. et al. Estudo epidemiológico de pacientes internados no Centro de Tratamento de Queimados do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. **Revista brasileira de queimaduras**, Sorocaba, v. 1, n. 8, p. 14-07, 2009.

GOMES, D. R.; SERRA, M. C.; MACIEIRA JR., L. **Condutas atuais em queimaduras**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GOOSEN, M. F. A. (ed.). **Application of Chitin and Chitosan**. Switzerland: Technomic Publishing AG. 1997.

GUMBINER, B. M. Cell Adhesion: Review The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. **Cell Press**, v. 84, p. 345–357, 1996.

HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. V. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 13–36, 2002.

HEIN, S. et al. Selection of a Practical Assay for the Determination of the Entire Range of Acetyl Content in Chitin and Chitosan: UV Spectrophotometry With Phosphoric Acid as

Solvent. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 86, p. 558–568, 2008.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 201-204, 2010.

HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em química analítica e inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

KAWAI, F.; HU, X. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Kyoto, v. 84, p. 227-237, jul. 2009.

KOTZÉ, A. F. et al. **Mucoadhesive and absorption enhancing properties of N-trimethyl chitosan chloride**. Grottammare: Atec, 2002.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, Tokyo, v.8, p. 203–226, mar. 2006.

LAMKE, L. O. et al. The evaporative water loss from burns and the water permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. **Burns**, v. 3, n. 3, p. 159-165, mar. 1977.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry”: Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MANUAL MERCK. **Queimaduras - Seção 24: acidentes e lesões**. Disponível em: <<http://www.manualmerck.net/?id=303>>. Acesso em: 05 Jan. 2012.

MOURA, C. et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto, **Vetor**, Rio Grande, v. 16, p. 37-45, 2006.

MUTSAERS, S. E. et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. ROCHETTI, R. Determination of the degree of acetylation of chitosan by first derivative ultraviolet spectrophotometry, **Carbohydrate Polymers**, Ancona, v. 5, p. 461–472, 1985.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, **Carbohydrate Polymers**, Ancona, v. 87, p. 995-1012, 2012.

NERY, A. L. V. et al. Nova abordagem no tratamento de lesões complexas: uso de matriz de regeneração dérmica. **Revista brasileira de queimaduras**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 10, p. 66-70, 2011.

- O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Materials today**, Dublin, v. 14, n. 3, p. 88-95, mar. 2011.
- OGAWA, K. et al. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p.1-8, 2004.
- OKUYAMA, K. et al. Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 285-293, 2000.
- OREFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. 1. ed.** Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 2006.
- PEPPAS, N. A, et. al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.
- PORTER, J. M.; MONETA, G. L. Reporting standards in venous disease: an update. international consensus committee on chronic venous disease. **Journal of vascular surgery**, v. 4, n. 21, p. 635-645, 1995.
- QUEEN, D. et al. The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressing. **Biomaterials**, Glasgow, v. 8, 1987.
- RABEA, I. E. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale: farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Elsevier, 2008.
- REMPEL, L. C. T. et al. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Revista brasileira de queimaduras**, Boqueirão, v. 1, n. 10, p. 03-09, 2010.
- REICHERT, W. M. et al. 2010 Panel on the Biomaterials Grand Challenges. **Journal of Biomedical Materials Research A**, Durham, v. 96, p. 275-287, nov. 2010.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and application. **Prog. Polym. Sci.**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- RNIAJ, J. et al. Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes. **Tissue engineering: part B**, Sydney, v.17, n. 2, p. 81-91, 2011.
- RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. **Caracterização de materiais III: análises térmicas.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Disponível em: <<http://www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5733/Apostila.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2011.
- ROSINA, C. R.; BARONI, S.; CAVALCANTI, O. A. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 425-431, 2004.
- SADAHIRA, C. M. **Caracterização e avaliação do perfil de liberação *in vitro* de hidrogéis de álcool polivinílico pH sensíveis processados por métodos físico-químicos.** 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Metalúrgica e de Minas, CPGEM-EEUFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, J. E. **Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Química analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SBQ-REGIONAL SP. **Informações sobre queimaduras**, 2008. Disponível em: <<http://www.sbqregionalsaopaulo.com.br/informacoes-sobre-queimaduras.php>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

SELLMER, D. **Sistema de informação para a sistematização da terapia tópica de úlceras venosas**. Paraná: PUC/PR, 2008. Disponível em: <<http://www.sbis.org.br/cbis11/arquivos/1051.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 8, n. 4, p. 63-68, out. 1998.

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

SILVERSTEIN, R. M., et.al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

SHIMAO, M. Biodegradation of plastics. **Environmental biotechnology**, Tottori, v. 12, p. 242-247, 2001.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYLHE, C. B. **Química Orgânica**, 9. ed., v. 1. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

SOUZA, V. M. **Ativos dermatológicos**: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação, para médicos e farmacêuticos. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SUN, G. et al. Formulation and characterization of chitosan-based hydrogel films having both temperature and pH sensitivity. **The Journal of Materials Science**, v. 18, p. 1563–1577, 2007.

TAN, S.C. et al. The degree of deacetylation of quitosana: advocating the fist derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713-719, 1997.

THANOU, M. et al. Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a poluampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 90, p. 38-46, jan. 2000.

TIKHONOV, V. E.; RADIGINA, L. A.; YAMSKOV, Y. A. Metal-chelating chitin derivates via reaction of chitosan with nitrilotriacetic acid. **Carbohydrate Research**, Moscow, v. 290, p. 33-41, mar. 1996.

TORRES, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

VANS, G. **Preparação e caracterização de filmes de blenas de quitosana/poli(álcool vinílico) incorporados com clorofila cúprica de sódio**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

YUI, K.; OGAWA, A. S. Molecular and crystal structure of konjac glucomannan in the mannan II polymorphic form. **Carbohydrate Research**. v. 1, n. 229, p. 41–55, 1992.

WANG, T., et. al. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer Internacional**, v. 53, p. 911-918, 2004.

WASHINGTON, N.; WASHINGTON, C.; WILSON, C. **Physiological pharmaceuticals barriers to drug absorption**. 2. ed. London: Taylor and Francis, 2001.

WONG. P. Physical Evaluation of a Hydrogel as a Bum Wound Dressing, **MSc Thesis**, University of Strathclyde. 1980.

WU, P. et al. Water vapour transmission rates in burns and chronic leg ulcers: influen of wound dressings and comparison with *in vitro* evaluation. **Biomoterials**, Edinburgh, v. 17, n. 14, p. 1373-1377, 1996.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p. 575-579, 2004.