

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

Winicius Ruis de Souza

**MODIFICAÇÃO DE QUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO E SUA BLENDAS
COM COLÁGENO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

SOROCABA

2019

Winicius Ruis de Souza

**MODIFICAÇÃO DE QUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO E SUA
BLENDAS COM COLÁGENO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

Orientador: Eliana Ap. de Rezende Duek
Co-orientador: Daniel Komatsu

SOROCABA
2019

Ruis de Souza, Winicius

Modificação de Quitosana com Ácido Hialurônico e sua Blenda com Colágeno para Aplicação Biomédica / Winicius Ruis de Souza. -- 2019.
81 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca examinadora: Maira de Lourdes Rezende Komatsu, Walter Ruggeri Waldman

Bibliografia

1. Quitosana. 2. Colágeno. 3. Ácido Hialurônico. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Winicius Ruis de Souza, realizada em 08/03/2019:

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek
PUC-SP

Profa. Dra. Máira de Lourdes Rezende Komatsu
Fatec-SO

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman
UFSCar



DEDICATÓRIA

À toda minha família, especialmente minha mãe Cristiane que sempre lutou para me dar o melhor, incentivando a não desistir dos sonhos e me acompanhando em todos os meus passos estando sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter dado a graça de chegar longe e ter me abençoado com boas pessoas ao longo de minha vida.

À minha orientadora Eliana Duek, que me motivou a perseverar sempre, auxiliando-me nos momentos difíceis, me aconselhando da melhor forma possível.

Ao meu co-orientador Daniel Komatsu que tive o privilégio de ter como meu professor na graduação, e que me auxiliou inúmeras vezes durante o trabalho, sempre pró-ativo e disposto a ajudar.

A todos os amigos do labiomat sempre alegres, dispostos a me auxiliar, o qual tive a oportunidade de compartilhar meu tempo e boas conversas, em especial, agradeço ao Lucas Camargo que prontamente me auxiliou nos processos de modificação da quitosana.

Às empresa TA INSTRUMENTS por ter realizado as análises térmicas das amostras e NOVAPROM por ter doado o colágeno Bovino utilizado neste trabalho.

Ao laboratório de Plasma da Unesp Sorocaba, que realizou as microscopias eletrônicas de varredura.

À PUC-SP, campus Sorocaba, por ter disponibilizado toda infraestrutura e suporte para que esse trabalho acontecesse, juntamente com os órgãos fomentadores de pesquisa.

Aos meus amigos da UFSCar-SO, em especial à Joelen Osmari e Maria Angélica Menck que sempre me ajudaram a não desistir em meio às dificuldades, com muito bom humor e sempre alegres, posso dizer que são grandes amigas.

Aos professores da UFSCar, bons profissionais e grande comprometimento para com seus alunos.

Por fim faço um agradecimento especial aos professores da FATEC-SO, em especial a professora Maira Rezende, que ao final da graduação acreditaram no meu potencial para seguir carreira no meio acadêmico.

.

Esperai no senhor com toda a confiança. Ele se
inclinou para mim, ouviu meus brados.
(Salmos 39)

RESUMO

SOUZA, W. R. **Modificação de quitosana com ácido hialurônico e sua blenda com colágeno para aplicação biomédica**. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

Palavras-chave: modificação química, quitosana, ácido hialurônico, blenda, colágeno.

Assim como em outras áreas de aplicações, os pesquisadores da área de biomateriais têm buscado por materiais de fontes naturais para obtenção de dispositivos implantáveis ou curativos, nesse sentido, a quitosana vem sendo muito estudada. Apesar das propriedades que favorecem sua aplicação, a solubilização da mesma requer a utilização do ácido acético, cujo resquício, na estrutura do arcabouço, pode prejudicar a interação deste com as células hospedeiras. A fim de minimizar este problema, o presente trabalho teve como objetivo a modificação química da quitosana com ácido hialurônico (AH) e a obtenção de sua blenda com colágeno. Assim, a vantagem é que a modificação química da quitosana (Qm) a torna solúvel em água e, além disso, proporciona ao arcabouço a presença de AH, uma glicosaminoglicana, sendo o maior componente da pele, estando envolvido nos processos de reparação tecidual. As modificações da quitosana com o AH foram verificadas através da técnica de FTIR, onde ficou evidente a interação química do AH com os grupos reativos das moléculas de quitosana. O ensaio de solubilidade demonstrou que a modificação com AH, foi efetiva ao deixar a quitosana solúvel em água. Os arcabouços, obtidos pelo método de liofilização, apresentaram morfologia porosa e dependente da concentração de Qm, sendo as concentrações de 9% e 17% as que apresentaram maior porosidade. O ensaio de intumescimento em solução tampão fosfato-salino (PBS) mostrou que o arcabouço com menor concentração de Qm (9%) foi o que apresentou a maior taxa de intumescimento. Por sua vez, o ensaio de termogravimetria mostrou que a presença de Qm diminuiu a estabilidade térmica do colágeno. E, por fim, o ensaio de DSC mostrou a miscibilidade da blenda colágeno-Qm, uma vez que foi observado apenas uma única temperatura de transição vítrea (T_g). Esses dados permitiram verificar a viabilidade

do uso de uma nova blenda com propriedades únicas com capacidade de formar um arcabouço poroso que efetivamente poderá ser aplicado como curativo cutâneo.

ABSTRACT

SOUZA, W. R. **Modification of chitosan with hyaluronic acid and its blend with collagen for biomedical application.** 2019. 79 f. Dissertation (Master of Science in Materials) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2019.

Keywords: chemical modification, chitosan, hyaluronic acid, blend, collagen.

As in other areas of application, researchers in the field of biomaterials have been looking for materials from natural sources for the installation of implantable or curative devices, in this sense, a chitosan has been much studied. In spite of the properties that favor its application, its solubilization requires the use of acetic acid, whose result, in the structure of the scaffold, can impair an interaction as the host cells. In order to minimize this problem, the present work aimed to chemistry of chitosan with hyaluronic acid (HA) and to obtain its blend with collagen. Thus, the advantage is the following chitosan (Qm) chemistry to become useful in water and, in addition, provides a scaffold for the presence of AH, a glycosaminoglycan, a major component of the skin, to engage in tissue payment processes. The chitosan and AH changes were verified through the FTIR technique, where a chemical interaction with the reactive groups of the chitosan molecules was evidenced. The solubility test demonstrated great success with the water-soluble chitosan solution. The scaffolds, obtained by the lyophilization method, are the porous morphology and depend on the concentration of Qm, with concentrations of 9% and 17% of the highest porosity. The swelling test in phosphate-saline solution (PBS) showed that the scaffold with lower concentration of Qm (9%) was the one with the highest swelling rate. In turn, the thermogravimetry assay resulted in the presence of Qm decreased the thermal stability of the collagen. Finally, the DSC assay showed the miscibility of the collagen-Qm blend since it was subjected to a single vitreous transition temperature (T_g). These data allow us to verify the feasibility of using a new blend based on properties capable of forming a porous scaffold that can be used as a cutaneous dressing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de obtenção da Quitina e Quitosana.....	21
Figura 2: Estrutura química do AH	23
Figura 3: Representação de uma unidade básica de tropocolágeno	25
Figura 4: Etapa 1 do processo de modificação da quitosana	29
Figura 5: Etapa 2 do processo de modificação da quitosana	30
Figura 6: Modelo de placa contendo os moldes plásticos do arcabouço para processo de liofilização	31
Figura 7: Configuração da caixa térmica para os moldes plásticos.....	32
Figura 8: Aplicação do FTIR nas diferentes etapas.....	33
Figura 9: Representação do teste de solubilidade	34
Figura 10: Fotografia de amostras de quitosana, (A) Qp – Antes de modificação química; (B) – Qm – Após modificação com AH	36
Figura 11: Espectro de infravermelho da Qp.....	37
Figura 12: Espectro de infravermelho do AH.....	37
Figura 13: Espectro de infravermelho da Qp e da Qm com AH	39
Figura 14: FTIR da Qm x Ácido Acético (AA)	40
Figura 15: Curvas termogravimétricas da Qp e Qm	42
Figura 16: Curva de DSC para as amostras de Qp e Qm	44
Figura 17: Arcabouços obtidos a partir da blenda Colágeno-Qm	45
Figura 18: Espectro de infravermelho do colágeno	46
Figura 19: FTIR dos Arcabouços obtidos através das blendas Qm-Colágeno	46
Figura 20: FTIR dos Arcabouços obtidos através das blendas Qm-Colágeno na faixa de 2250 cm ⁻¹ a 500 cm ⁻¹	47
Figura 21: Imagens da Superfície Porosa dos arcabouços nas diferentes porcentagens de Qm.....	48
Figura 22: Imagem da região de corte com bisturi submetida a congelamento com nitrogênio líquido	50
Figura 23: Intumescimento dos arcabouços em PBS.....	51
Figura 24: Intumescimento dos arcabouços em PBS até 220s.....	53
Figura 25: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço de colágeno.....	53
Figura 26: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl. 9%.....	54
Figura 27: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl. 17%.....	54
Figura 28: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl. 23%.....	55
Figura 29: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl 33%.....	55
Figura 30: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl. 41%.....	56
Figura 31: Valores das taxas de Intumescimento (g/s)	57
Figura 32: Termograma de todos Arcabouços	58
Figura 33: Curva de DSC para o arcabouço de colágeno e os arcabouços das blendas colágeno-Qm	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das blendas de colágeno e quitosana modificada com AH (Qm)	31
Tabela 2: Valores de massa (g) do corpo de fundo obtidos experimentalmente	41
Tabela 3: Valores de perda de massa, em porcentagem, nas temperaturas de 75°C e 275°C	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DSC	Calorimetria exploratória Diferencial
TGA	Análise Termogravimétrica
AA	Ácido Acético
AH	Ácido Hialurônico
Qp	Quitosana Pura
Qm	Quitosana Modificada
Bl	Blenda
Col	Colágeno
mi	Massa Inicial
mf	Massa Final
t	Tempo
Eq	Equação
BDO	butanodiol
Tonset	Temperatura Inicial de Degradação Extrapolada
T _g	Temperatura de Transição Vítrea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Biomateriais	17
3.2	Blendas Poliméricas.....	19
3.3	Quitosana	20
3.4	Ácido Hialurônico (AH).....	23
3.5	Colágeno.....	24
3.6	Arcabouço (<i>Scaffold</i>)	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Materiais	28
4.2	Métodos	28
4.2.1	Modificação química da quitosana	28
4.2.2	Obtenção da blenda quitosana modificada - colágeno.....	30
4.2.3	Obtenção do Arcabouço.....	31
4.2.4	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32
4.2.5	Teste de solubilidade.....	33
4.2.9	Ensaio de intumescimento	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Modificação química da quitosana	35
5.1.1	Modificação química da quitosana com AH.....	35
5.1.2	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	36
5.1.3	Teste de solubilidade da quitosana modificada com AH em água	41
5.1.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	42
5.1.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	43
5.2	Arcabouço a partir da Blenda de colágeno-Qm.....	45
5.2.1	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
5.2.3	Ensaio de intumescimento	51

5.2.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	57
5.2.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	59
6	CONCLUSÃO.....	61
8	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Tanto os polímeros sintéticos quanto os naturais vêm ganhando destaque no que diz respeito às suas propriedades e aplicações, principalmente na área de biomateriais. Entretanto, nem todos os polímeros podem ser utilizados nessa área, pois tais aplicações requerem que o material seja, no mínimo, biocompatível. Outras características exigidas para tal finalidade, como, por exemplo, propriedade mecânica, hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, entre outras, são de grande importância na seleção do material. Dessa maneira, a maior parte dos polímeros não atende às necessidades exigidas para uma aplicação específica, seja para um dispositivo temporário ou permanente. Nesse caso, muitas vezes a solução é encontrada realizando-se a modificação química da superfície do material, por meio da obtenção de compósitos, blendas e também, através da copolimerização [1,2].

Na busca por materiais alternativos e de fontes renováveis, a quitosana ganhou grande importância no desenvolvimento de materiais biomédicos, podendo ainda sofrer modificações químicas para melhor atender as diversas aplicações. Sua obtenção é proveniente da reação de desacetilação da quitina em meio alcalino, podendo ser extraída de crustáceos e de alguns fungos. A quitosana é insolúvel em água, entretanto em meio ácido orgânico fraco ela se torna carregada devido à protonação do grupamento amina, tornando-se solúvel. Porém, para aplicações biomédicas, a presença do ácido acético, mesmo após a lavagem, pode prejudicar a interação entre o arcabouço e o sistema hospedeiro, uma vez que o ácido acético (AA) penetra em células de mamíferos causando polimerização da citoqueratina em células epiteliais e desacetilação das histonas nucleares, causando a densificação da cromatina no núcleo das células [3], alterações cromossômicas gerando clastogênese pela acidificação do pH nuclear [4]. Além disso leva à diminuição da viabilidade celular *in vitro*, mesmo em concentrações inferiores a 0,5% no meio [5]. Um estudo *in vitro*, com hepatócitos bovinos demonstrou que os mesmos metabolizam o ácido acético em Acetil-CoA no ciclo de Krebs, diminuindo a capacidade do fígado em sintetizar ácidos graxos. No entanto, a capacidade de metabolização do AA em hepatócitos humanos é muito reduzida quando comparado às células de bovinos [6]. Dessa forma, a modificação química da quitosana com ácido hialurônico (AH), pode ser uma alternativa para solucionar ou amenizar este

problema, tornando-a solúvel em água, sem a necessidade de utilização de um meio aquoso ácido.

O AH é um polímero de origem natural, componente da matriz extracelular que favorece a cicatrização e controla a deposição excessiva de colágeno nas cicatrizes, além de melhorar a atividade dos neutrófilos e aumentar a mobilidade celular, estimula a angiogênese e a proliferação celular. Além disso, é biocompatível, biodegradável, atóxico e carregado negativamente devido aos grupos hidroxilas, radicais carboxila e N – acetil na cadeia. Assim como os outros glicosaminoglicanos, é um excelente absorvedor de água e, devido à capacidade de absorção de água, apresenta excelente viscoelasticidade, propriedade que o torna promissor para constituição de arcabouços cujas aplicações envolvem células ósseas, cartilaginosas e cutâneas [7].

O colágeno possui excelentes propriedades mecânicas e em muitos estudos é utilizado em blendas [8] juntamente com a quitosana, devido à característica de prover suporte mecânico. A desvantagem do uso de colágeno como biomaterial é principalmente sua rápida biodegradação. Portanto, o objetivo do trabalho é a obtenção de uma blenda a base de colágeno com quitosana modificada com ácido hialurônico, livre de ácido acético, para aplicação na engenharia tecidual em curativos cutâneos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar o arcabouço a partir da blenda de colágeno e quitosana modificada com ácido hialurônico para aplicação em curativos cutâneos.

2.2 Objetivos Específicos

- Modificar quimicamente a quitosana com ácido hialurônico (AH);
- Obter a blenda a partir de diferentes concentrações de quitosana modificada com ácido hialurônico misturando-a ao colágeno;
- Caracterizar física, química e termicamente a quitosana modificada e a blenda com colágeno;
- Obter arcabouço poroso pelo processo de liofilização a partir da blenda;
- Avaliar o intumescimento do arcabouço da blenda de Quitosana Modificada (Qm) e colágeno;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biomateriais

Os biomateriais surgiram para atender às necessidades dos seres humanos frente a perda parcial ou total de um órgão ou tecido, devido a acidentes e traumas ou mesmo pelo aumento da expectativa de vida da população.

A utilização dos biomateriais apesar de ser um conceito recente proporciona um olhar ao passado, onde já se tinha indícios do uso destes materiais mesmo de maneira arcaica. Retrocedendo no tempo surge a sutura para fechamento de ferimentos que têm origem no antigo Egito cerca de 3.500 a.C., apropriando-se principalmente do linho e ouro na constituição do fio [9]. Muitas evidências arqueológicas da civilização Maia, datadas em 600 a.C., demonstram, por exemplo, a utilização de dentes implantados constituídos de nácar, uma pedra dura produzida por alguns moluscos. Outras civilizações relatam o uso de ferro e ouro na reposição de dentes, na idade média o uso da madeira na substituição óssea já havia sido realizada com boa osteointegração do implante [10].

Observa-se que inicialmente a busca por materiais que fossem bioinertes ou que provocassem respostas mínimas do corpo eram o foco de estudo, sendo o objetivo substituir tecidos lesionados pelo implante. Após algum tempo surgiu a necessidade de aumentar a vida útil do implante o que levou a observar não apenas o material em si mas, contudo, sua interação com o tecido hospedeiro, e mais especificamente como o implante poderia contribuir para a regeneração e participar ativamente dos processos biológicos do mesmo [11].

Dentre as definições, a que mais contempla a função de um biomaterial é a de Williams, D.F, 2009, o qual define: “Um biomaterial é destinado a fazer interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo” [12]. Como dito anteriormente, nesta nova fase de desenvolvimento dos biomateriais os dispositivos biomédicos passam a participar ativamente dos processos biológicos integrando o tecido atingido [13].

Outro conceito importante a ser abordado é o de biocompatibilidade, que numa abordagem mais recente consiste em um material atóxico, não podendo ser alergênico, carcinogênico, mutagênico e que não exerça nenhum tipo de efeito na fertilidade do indivíduo [14].

São inúmeras as fontes das quais os biomateriais podem ser fabricados sendo os metais uma delas, muito utilizado devido suas excelentes propriedades mecânicas, resistência a tensão de compressão e tração. É considerado um material muito versátil, suas características variam de acordo com as ligas utilizadas sendo o aço inoxidável, ligas a base de cobalto e materiais nobres como o ouro e a platina os mais utilizados, seja para: fabricar ferramentas externas cirúrgicas, implantes onde deseja-se fixar fraturas ou outros traumas. A resistência a corrosão que essa classe apresenta se faz de suma importância, uma vez que esses materiais estarão em contato constante com os fluídos corporais, sendo assim suscetíveis a processos de corrosão podendo liberar íons metálicos extremamente prejudiciais aos tecidos em contato com o implante desencadeando processos inflamatórios, o que pode gerar uma série de complicações [15]. Muitos estudos são realizados no tratamento da superfície do metal, principalmente com hidroxiapatita, onde uma camada bioativa é deposta na superfície do metal, melhorando a área de interface osso e implante [16].

As cerâmicas também são bem estabelecidas dentro dos biomateriais, possuem excelente resistência a corrosão, resistem a esforços de compressão e boa biocompatibilidade, no entanto, como desvantagem podemos citar baixa resistência mecânica, baixa resistência a tração, além de possuir alta densidade. A alumina é um exemplo de biocerâmica utilizada em implantes ósseos, devido às características citadas anteriormente, também, são utilizadas na composição de dentes artificiais [17]. A hidroxiapatita é muito empregada em tratamentos de recobrimento de superfície juntamente com metais, também existem estudos utilizando-a em matrizes porosas para tratamentos de braquiterapia [18]. A literatura registra também pesquisa da zircônia na utilização como biomaterial em aplicações do tecido ósseo [19].

Dando sequência aos materiais empregados na área biomédica temos os poliméricos, que em relação a todos os outros citados anteriormente são os que apresentam maior facilidade de síntese e processamento, grande diversidade de formas e com a possibilidade de serem fabricados de inúmeras matérias-primas com propriedades específicas para as diferentes aplicações. Por definição um polímero é um material podendo ser orgânico ou inorgânico de alta massa molar, com estruturas repetitivas denominadas “meros”, formando uma enorme cadeia composta de ligações covalentes [20]. São divididos em termoplásticos com capacidade de moldagem e possibilidade de serem reprocessados, diferentemente

dos termorrígidos que passam por processos de retificação ou cura, promovidas pelas ligações de hidrogênio, e sendo um processo irreversível, produz materiais com excelentes propriedades mecânicas [21]. Especialmente na engenharia tecidual os polímeros biodegradáveis são preferencialmente utilizados, sendo, o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) alguns representantes desta classe que têm sido estudados atualmente [22]. Alguns destes polímeros provêm de fontes naturais, como é o caso da quitosana, colágeno, elastina, ácido hialurônico e muitos outros. Nem todos os polímeros atendem completamente todas as necessidades de uma determinada aplicação, nesse caso, a obtenção de blendas do mesmos é uma alternativa para se obter propriedades específicas combinando-se 2 ou mais materiais poliméricos [23].

3.2 Blendas Poliméricas

As blendas poliméricas de uma forma geral oferecem uma saída comercialmente viável no que se refere a economia de custos, uma vez que o desenvolvimento de novos polímeros constitui um projeto relativamente mais caro em relação a combinação dos mesmos. Como foi introduzido anteriormente por definição tem-se que: uma blenda é a combinação de dois ou mais polímeros com propriedades distintas a fim de alcançar um material único, com propriedades intermediárias aos seus constituintes [24].

Um fator determinante na escolha dos polímeros que serão utilizados para a produção da blenda é a miscibilidade, sendo que a presença de uma afinidade química intermolecular (ligação de hidrogênio, interações dipolo-dipolo) produz uma blenda de fase única e, neste caso, diz-se que a blenda é miscível, um grupo minoritário em relação às blendas parcialmente miscíveis ou imiscíveis que apresentam duas ou mais fases devido à ausência ou pouca afinidade química intermolecular [25].

Para que a blenda seja miscível ela deve obedecer a seguinte relação de energia livre de Gibbs, conforme equação 1:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \cdot \Delta S_m < 0$$

Equação 1

A equação 1 é válida na condição de temperatura e pressão constantes, em que: ΔG_m , ΔH_m e ΔS_m significam respectivamente; a variação da: energia de Gibbs, entalpia e entropia da mistura. Quando a energia de Gibbs for negativa, portanto, tem-se uma blenda miscível [26].

A miscibilidade dos constituintes afeta diretamente as propriedades finais do material, sendo observadas propriedades superiores para as blendas com afinidade intermolecular e inferiores para as parcialmente ou imiscíveis. Isso fica evidente quando, por exemplo, têm-se a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros envolvidos na blenda. No caso de uma blenda miscível observa-se uma única transição vítrea da blenda final, entretanto, no caso de miscibilidade parcial verifica-se duas transições vítreas com valores intermediários aos polímeros puros e, por fim, na situação de imiscibilidade além de ser verificado duas transições, seus valores são iguais aos dos constituintes puros [27].

Devido a essa grande problemática foram elaborados métodos a fim de promover a melhoria de propriedades das blendas. Uma possibilidade é o uso dos agentes compatibilizantes, os quais atuam promovendo uma melhor afinidade intermolecular entre os constituintes, resultando numa melhoria das propriedades das blendas, mesmo que a mesma seja imiscível. Isso pode ser feito através do processamento reativo dos constituintes (extrusão reativa) ou pela adição de um terceiro elemento que apresente afinidade com os outros constituintes da blenda polimérica [28].

3.3 Quitosana

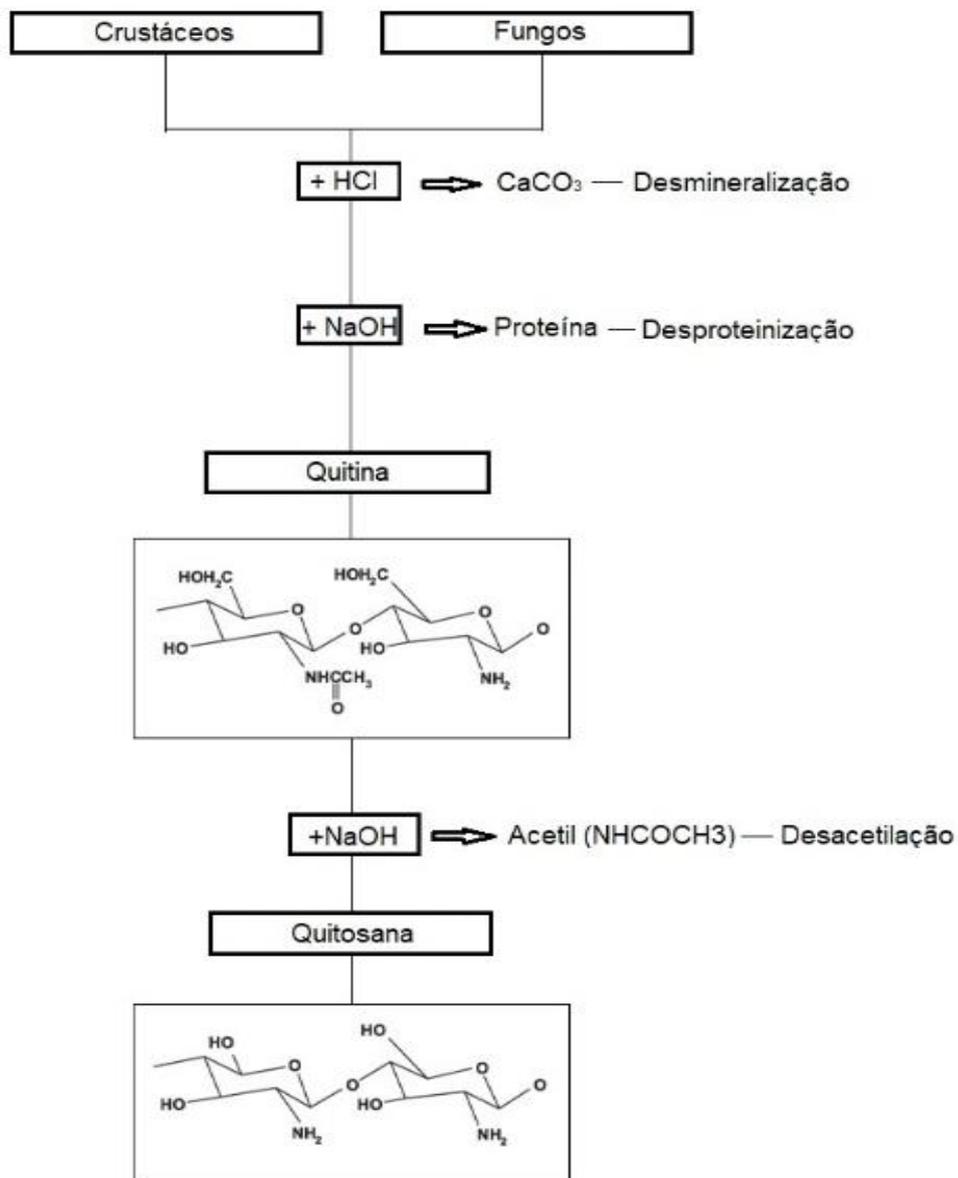
A quitosana é obtida através da quitina, sendo esta última um polímero natural em abundância na natureza, proveniente da classe dos polissacarídeos. É encontrada principalmente em crustáceos, insetos com carapaças e alguns fungos, sendo assim uma fonte renovável. Segundo dados do IBGE estima-se que no ano de 2017 tenham sido produzidas em torno de 41 mil toneladas de camarão, o que de fato representa um produto que pode ser amplamente aproveitado para a extração da quitina [29].

A estrutura química da quitina é constituída, respectivamente, pelos monômeros β - (1-4) - β - 2-amino- 2-desoxi-D-glicose e β -(1-4) - 2-acetamida- 2-Desoxi- D-glicose. Sua obtenção passa por uma série de processos como a

desmineralização, desproteíntização e descoloração, realizadas através de soluções ácidas e básicas [30].

A quitosana é oriunda da reação de desacetilação da quitina, em meio alcalino, normalmente realizada em solução de NaOH e possui propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e ação antimicrobiana. Na Figura 1 encontra-se um diagrama simplificado do processo de obtenção da quitosana a partir da quitina.

Figura 1: Diagrama de obtenção da Quitina e Quitosana



Fonte: Adaptado de Tharanathan R. N. [31]

A reação de desacetilação é um fator crítico e determinante para muitas de suas propriedades. Em outras palavras um bom controle dessa etapa se faz necessária a fim de garantir a extração dos grupos acetil (NHCOCH_3). Parâmetros como: temperatura, tempo de reação, atmosfera da reação, tamanho das partículas de quitina, entre outros, são previstos para que a reação ocorra de forma eficiente [32].

Muitos são os trabalhos citados na literatura, nos quais são realizadas modificações químicas na estrutura da quitosana. Isso deve-se principalmente aos grupos reativos N-H e O-H presentes ao longo de sua estrutura. O anidrido succínico é um modificador empregado para modificações da quitosana, conferindo melhoria na propriedade de adsorção da substância azul de metileno, tornando-a superior ao carvão ativado [33].

A modificação via plasma da superfície de membranas de quitosana também é abordada na literatura usando gases de nitrogênio, oxigênio e hidrogênio como modificadores para aplicação de sistemas de liberação controlada de fármacos [34].

Estudos emergem utilizando-a no recobrimento de implantes, a fim de evitar a formação de biofilmes constituídos de células infecciosas, sendo muitas vezes procedimentos cirúrgicos para remoção, podendo até substituir os antibióticos tradicionalmente aplicados para recobrir os implantes. O recobrimento de produtos alimentícios também tem sido amplamente explorado para evitar a contaminação devido agentes externos que possam afetar a integridade do alimento [35].

Sua capacidade de formar estruturas porosas também é um aspecto muito propício ao desenvolvimento de arcações celulares para a cultura e regeneração celular servindo como suporte para o crescimento celular. A estrutura porosa pode ser obtida solubilizando a quitosana e utilizando o processo de liofilização no qual o tamanho e orientação dos poros tornam-se fundamentais nestas aplicações [36,37,38].

A quitosana pode ser usada em forma de microesferas, muito aplicada em liberação controlada de fármacos, tais como, a indometacina, um anti-inflamatório usado em tratamentos de artrite [39].

A literatura também registra alguns usos como analgésico, em tratamentos de feridas abertas. Nas fases iniciais de cicatrização, a quitosana demonstra influenciar positivamente na velocidade de infiltração de leucócitos, estes por sua vez

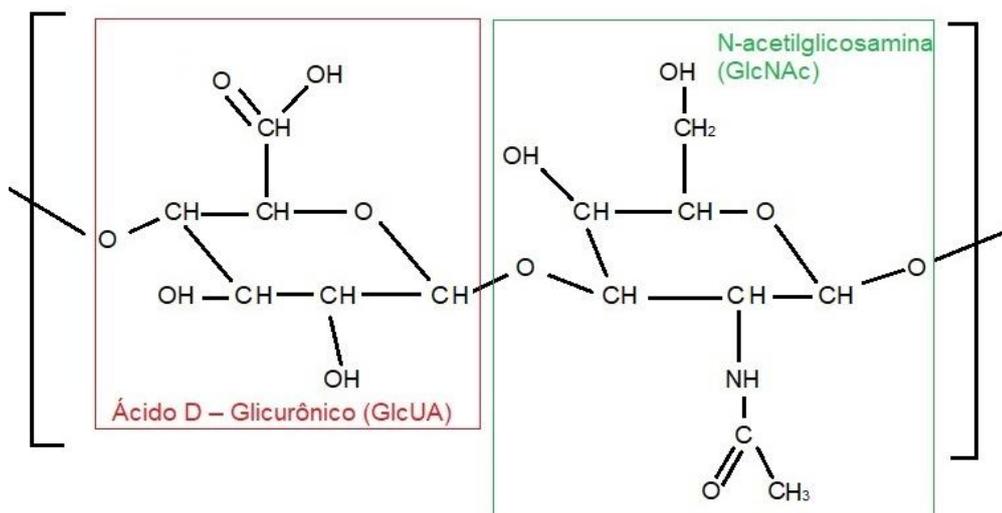
aumentam a concentração de osteopontina promovendo um aumento na ligação celular do tecido em regeneração [40,41].

A quitosana também é utilizada juntamente com ácido hialurônico, em aplicação de feridas dérmicas ou lesões cutâneas. A utilização do ácido é justificada devido principalmente à semelhança com a matriz extracelular e seus, proliferação celular e ação reparadora nos tecidos atingidos [42].

3.4 Ácido Hialurônico (AH)

O AH consiste em um polissacarídeo linear, de elevada massa molar, pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs), formado por unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D – Glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas por ligações alternadas β (1 — 3) e β (1 — 4) [43]. Existem processos químicos para obtenção comercial do mesmo [44], podendo ser extraído da crista do frango e algumas bactérias como a *Streptococcus sp* [45,46]. Na Figura 2 encontra-se representada a molécula de AH.

Figura 2: Estrutura química do AH



Fonte: Autor.

Na pele e nos tecidos cartilagosos o AH atua efetuando ligações químicas com a água, realizando a manutenção destes tecidos e preservando sua

elasticidade, isso deve-se ao fato de possuir muitas cargas negativas de seus radicais carboxila e N – acetil.

Uma característica importante que o torna um lubrificante biológico excelente, é sua viscoelasticidade quando hidratada; nesta condição esta propriedade varia de acordo com os esforços mecânicos repetitivos, ou seja, essas características justificam sua grande concentração nos fluidos sinoviais, regiões de intenso atrito e submissão de carga [47].

Com o envelhecimento, a produção do AH decai e os tecidos passam a perder sua elasticidade, podendo acarretar doenças como a artrite. Para minimizar os efeitos deste problemas são utilizados tratamentos envolvendo o AH. Sua utilização em procedimentos oftalmológicos também é bem explorada, sendo empregado para proteger o tecido ocular na operação de extração da catarata e preenchimentos entre tecidos a fim de se obter espaço para a manipulação de instrumentos sem causar danos aos mesmos [48].

Sua importância como biomaterial deve-se também pelo fato de ser compatível com a matriz extracelular presente na derme, promovendo a estabilização do tecido, auxilia a ação dos neutrófilos, estimula a proliferação celular e reparação do tecido [49,50]. Todas as características que o material apresenta tornou-o uma escolha favorável no que se refere a tratamentos relacionados a prevenção do envelhecimento de pele e produtos para cosméticos [51].

A literatura registra também seu uso em procedimentos para preenchimento facial com grande eficácia em relação às substâncias comumente utilizadas como por exemplo a Clostridium botulinum ou Botox [52].

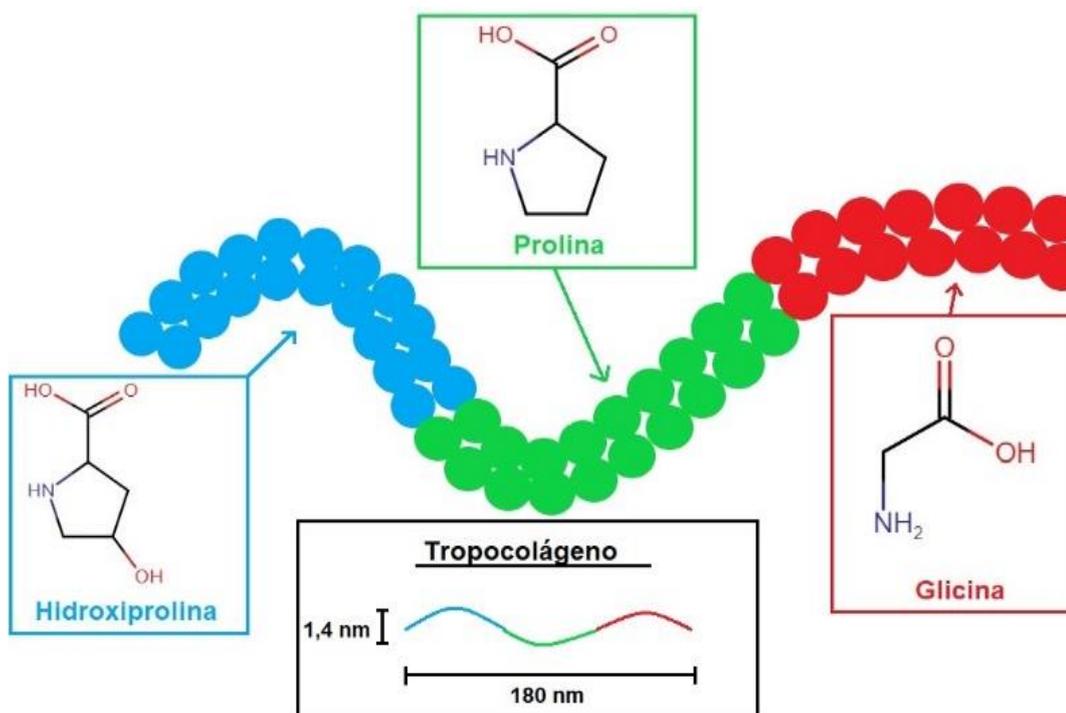
3.5 Colágeno

Proveniente de fontes naturais, o colágeno é uma proteína muito presente no corpo humano: Pele, tendões, cartilagem, ossos e muitas outras estruturas. Sendo assim seu uso em aplicações biomédicas têm sido muito explorada, sendo um material biocompatível e biodegradável suas funções no corpo humano estão relacionadas à promover suporte mecânico [53]. Apesar de ser um material com grande disponibilidade na natureza, muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de reaproveitar este material no processo de beneficiamento de peixes, produtos

cárneos, onde ao final da cadeia de produção tem-se subprodutos como: ossos, pele, escamas e carcaças [54, 55].

É difícil definir uma estrutura química básica para este material, pois, apresenta muitas isoformas, que dependerão do tipo de tecido ao qual esse material está presente, ou seja, existem várias classificações ou tipos de colágenos. No entanto de uma forma geral algumas literaturas definem a unidade básica do colágeno sendo o tropocolágeno, esta última formada por três cadeias polipeptídicas (glicina, prolina e hidroxiprolina) entrelaçadas de forma helicoidal, essa estrutura possui um padrão linear com 180 nm de comprimento, largura aproximada de 1,4 nm e massa molar 360.000 Da, como representado na Figura 3 [56, 57].

Figura 3: Representação de uma unidade básica de tropocolágeno



Fonte: Autor.

A variedade dos tipos de colágeno existentes implica de forma direta em seu processo de extração, ou seja, existem muitas variações no processo de extração do mesmo, mas, de maneira simplificada a pele, couro ou outros subprodutos são submetidas à uma hidrólise química e enzimática. A literatura registra o uso de

solução ácida para extração do colágeno da pele de tilápias, no entanto, com um baixo rendimento [58].

Algumas aplicações associam seu uso juntamente com a quitosana compondo uma blenda, devido principalmente ao fato do colágeno possuir uma alta taxa de degradação em aplicações de regeneração tecidual em contrapartida a quitosana têm uma taxa de degradação muito mais lenta em relação ao colágeno [59].

Sua utilização na produção de biofilmes também tem sido abordada com resultados satisfatórios, viabilizando seu uso comercial, tendo como origem o colágeno extraído de frangos [60].

As propriedades do colágeno podem ser aprimoradas usando vários métodos de reticulação ou pela mistura com outro polímero, obtendo-se assim um novo material a ser utilizado com sucesso na produção de implantes, curativos ou mesmo na engenharia de tecidos [61,62].

3.6 Arcabouço (*Scaffold*)

A engenharia tecidual estuda as formas nos quais os tecidos possam ser restaurados ou reparados, utilizando como ferramenta os chamados arcabouços: tratam-se de uma estrutura porosa e tridimensional cuja função é prover suporte mecânico e um ambiente favorável ao desenvolvimento e proliferação celular. Estas estruturas possuem características as quais sofrem biodegradação contínua enquanto um tecido se desenvolve ou mesmo arcabouços metálicos onde este tipo de degradação não ocorre [63,64]. Muitos fatores são relevantes a fim de criar um arcabouço estável:

- O tamanho dos poros, de acordo com o tecido no qual ele será aplicado, pois existe um tamanho de poro específico para cada célula [65];
- A existência de interconectividade entre os poros do arcabouço desde a superfície até o interior, uma vez que os poros são responsáveis pelo transporte de oxigênio e nutrientes importantes para estimular a proliferação celular [66];
- A rigidez também influencia no crescimento celular no arcabouço [67];

- A escolha dos materiais deve ser estudada, pois, afeta diretamente todas as propriedades do arcabouço, sendo que os materiais escolhidos, devem ser biocompatíveis e possibilitem a formação de poros [68];

Para a obtenção da estrutura porosa existem muitas técnicas disponíveis que podem ser utilizadas: lixiviação de partículas, separação de fases, impressão do arcabouço através de prototipagem, no entanto, um método simples e de baixo custo é o processo de liofilização. Independente da técnica escolhida esta deve garantir que não haja nenhum tipo de modificação química e nem alteração na biocompatibilidade do material, além de garantir as características em relação aos poros como citado anteriormente [69].

Na técnica de liofilização de forma simplificada tem-se: o polímero dissolvido em um solvente com uma concentração específica, na sequência a solução é congelada formando cristais de gelo em sua estrutura que serão submetidos à uma baixa pressão sofrendo sublimação, obtendo-se assim uma estrutura porosa [70].

Todos os aspectos do arcabouço devem estar alinhados da melhor forma possível para reproduzir as condições do tecido original no qual será aplicado, existem muitos registros na literatura com muitas variações de materiais e células que podem ser aplicadas neste tipo de técnica.

Arcabouços de colágeno têm sido obtidos em associação com células-tronco mesenquimais, sendo aplicadas no reparo de lesões em cartilagem articular [71].

Outras composições são relatadas usando quitosana, fibroína e polihidroxibutirato que produziram arcabouços porosos com boa estabilidade térmica, não citotóxicos e que estimularam a proliferação celular, sendo assim uma alternativa viável para aplicação na engenharia de tecidos [72].

Os arcabouços têm sido utilizados também para controlar a liberação de fármacos no organismo, utilizando a quitosana como biomaterial, no qual é inserido um agente antineoplásico no tratamento de neoplasias [73].

Diante desta revisão na literatura foi possível verificar grandes avanços da engenharia tecidual, principalmente com o uso dos arcabouços que acabaram ampliando o leque de possibilidades na regeneração tecidual. O uso de blendas têm sido intensamente explorado em diversos trabalhos uma vez que é possível a combinação de propriedades dos mesmos. O colágeno apresentou-se como um material de estrutura complexa e de difícil definição, uma vez que possui muitas formas distintas devida a combinação polipeptídica, variando de acordo com o tecido

no qual ele é encontrado, também foi possível observar sua larga utilização como biomaterial devido suas propriedades, o que reforça seu uso como um biomaterial capaz de ser aplicado em diversos tecidos principalmente a pele.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A quitosana utilizada no presente trabalho foi adquirida da empresa Polymar Indústria, Comércio, Importação e Exportação Ltda. Esta apresentava-se na forma de pó com grau de desacetilação (GD) de 98,15%.

O colágeno bovino foi doado pela empresa NovaProm e utilizado em forma de pó.

O ácido hialurônico empregado nas modificações da quitosana foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

Utilizou-se persulfato de Potássio, P.A. - A.C.S., massa molar 270,32 g/mol, adquirido da empresa *Synth* para o processo de modificação química da quitosana.

Todos os materiais foram utilizados como recebido.

4.2 Métodos

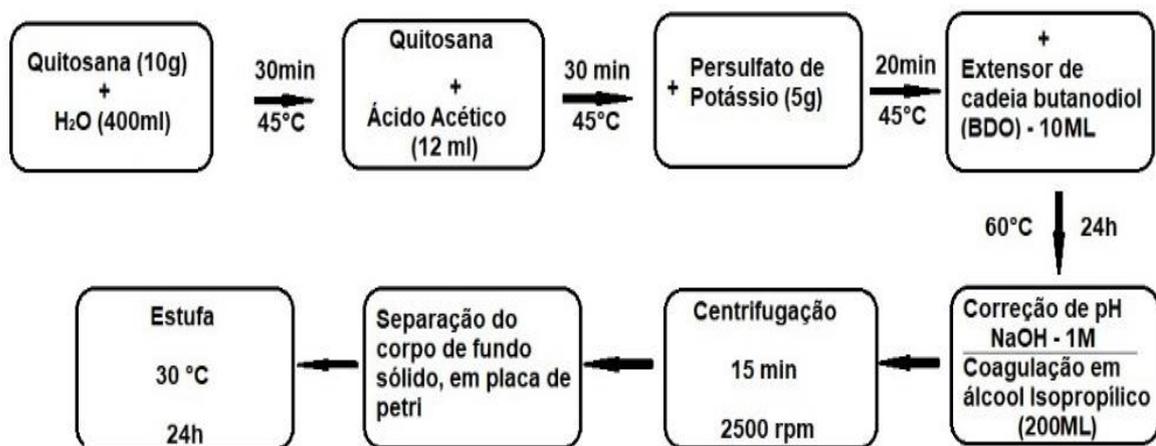
4.2.1 Modificação química da quitosana

A modificação química da quitosana foi realizada em 2 etapas, ilustradas nas figuras 4 e 5. Para a primeira etapa da modificação adicionou-se quitosana à água destilada, sob agitação e temperatura de 45°C durante 30 min. Após esse tempo, foi adicionado ácido acético glacial em grau analítico, permanecendo sob mesma temperatura e agitação por mais 30 min. Em seguida adicionou-se o persulfato de potássio (oxidante), mantendo a temperatura anterior, durante 20 min a fim de promover a reação dos grupos OH e NH reativos da quitosana. Adicionou-se o butanodiol (BDO), um extensor de cadeia à temperatura de 60°C, permanecendo sob agitação por 24h [74].

Uma solução de NaOH foi utilizada para corrigir o pH da solução para 7,0, com o auxílio de um pHmetro, e na etapa seguinte a solução foi precipitada em álcool isopropílico em grau analítico.

Para a finalização da primeira etapa separou-se a solução em tubos falcon, os quais foram centrifugados por 15 min à 2500 rpm. A fase líquida foi descartada e a fase sólida foi colocada em uma placa de petri e seca em uma estufa a 30°C por 24h. Os processos estão representados na Figura 4 e Figura 5.

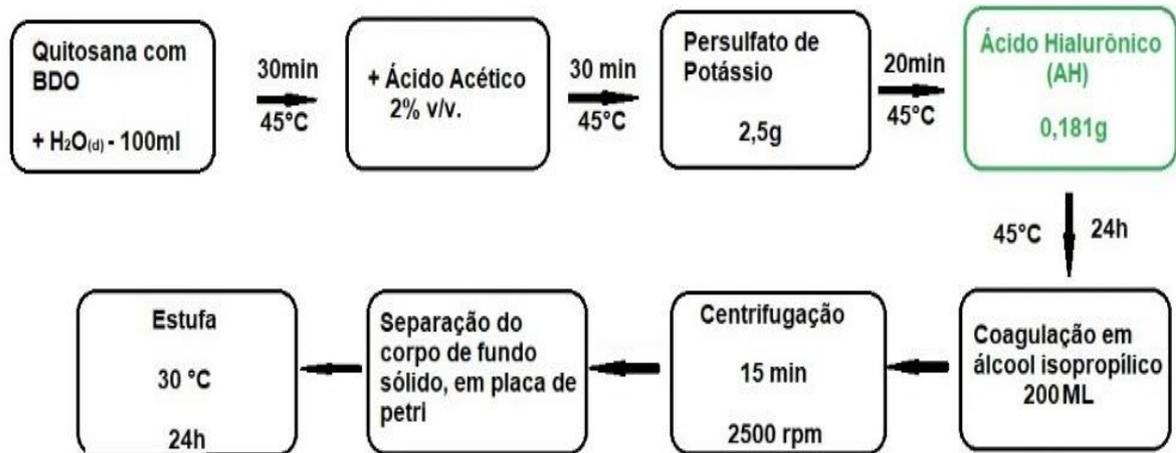
Figura 4: Etapa 1 do processo de modificação da quitosana



Fonte: Autor.

A segunda etapa consistiu na solubilização sob temperatura de 45°C, da quitosana com BDO em água destilada e adição de ácido acético 2% (v/v) sob agitação constante por 30 min. Em seguida, adicionou-se persulfato de potássio sob agitação constante por 20 min até que a reação ocorresse completamente. Finalmente adicionou-se o ácido hialurônico (AH) e manteve-se a agitação por 24h. Todas as etapas foram mantidas à temperatura de 45°C. O produto foi precipitado, centrifugado e seco em estufa nas mesmas condições utilizadas na primeira etapa [75].

Figura 5: Etapa 2 do processo de modificação da quitosana



Fonte: Autor.

4.2.2 Obtenção da blenda quitosana modificada - colágeno

Através da literatura, primeiramente foi definido a porcentagem de colágeno a ser utilizado de modo a obter arcabouços com uma estrutura homogênea, sem deformações ou irregularidades que comprometessem sua aplicação. Após testes, foi definida a concentração 3% de colágeno para a obtenção da blenda.

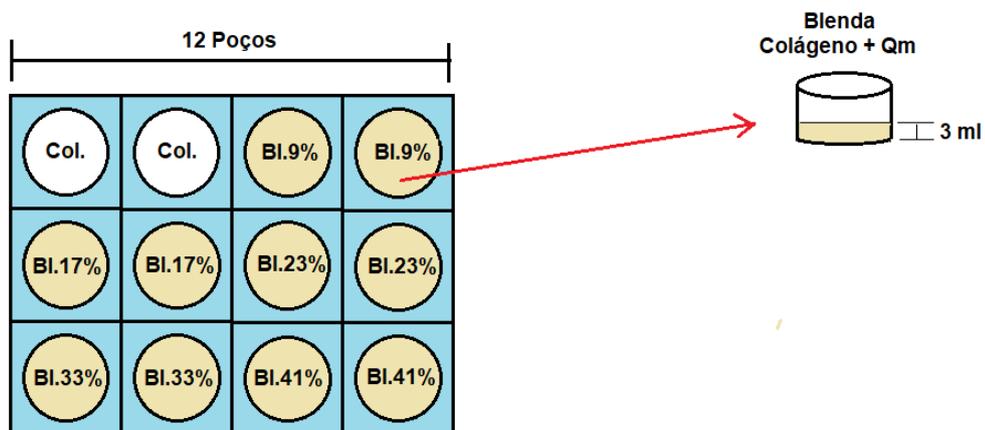
A blenda foi obtida por solução. Neste caso, a quitosana modificada foi previamente solubilizada em água, com o volume de solvente (água) fixado em 3mL, levando-se em consideração as dimensões dos moldes plásticos onde a solução foi vertida. A massa de colágeno adicionada na obtenção da blenda foi fixa e correspondeu a 3% do volume de água. Além disso, a concentração de quitosana na blenda variou em relação a massa de colágeno. As porcentagens de Qm e a massa de colágeno estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das blends de colágeno e quitosana modificada com AH (Qm)

Qm (%)	Colágeno (g)*	Qm (g)
9	0,090	0,009
17	0,090	0,018
23	0,090	0,027
33	0,090	0,045
41	0,090	0,063

* Massa de colágeno obtida dividindo-se o volume de solvente (Água) pela sua concentração (3%).

A blenda foi obtida em béqueres sob agitação constante contendo a solução Qm e adicionando-se o colágeno a temperatura ambiente (25°C). Após a completa solubilização, a solução foi vertida em moldes plásticos para obtenção dos arcabouços, conforme representado na Figura 6.

Figura 6: Modelo de placa contendo os moldes plásticos do arcabouço para processo de liofilização

Legenda: Bl = Blenda; Col = Colágeno Puro.

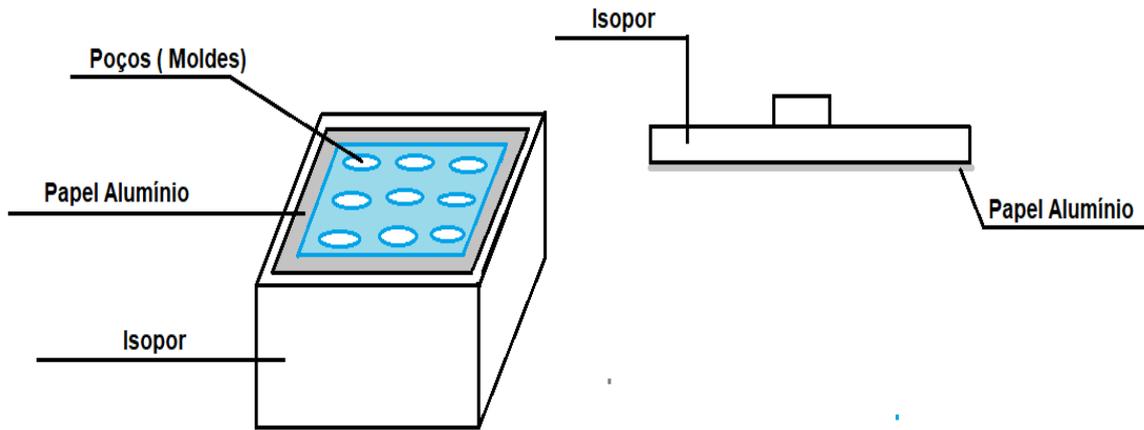
Fonte: Autor.

4.2.3 Obtenção do Arcabouço

A blenda em solução de colágeno-Qm foi vertida em moldes plásticos com 2 cm de diâmetro por 2 cm de altura. A solução foi congelada no molde, o qual foi envolto em papel alumínio e colocado dentro de uma caixa térmica de isopor sob

temperatura de -6°C por 24h [76] e posteriormente, submetida ao processo de liofilização por 24h. A Figura 7 ilustra como a caixa foi elaborada.

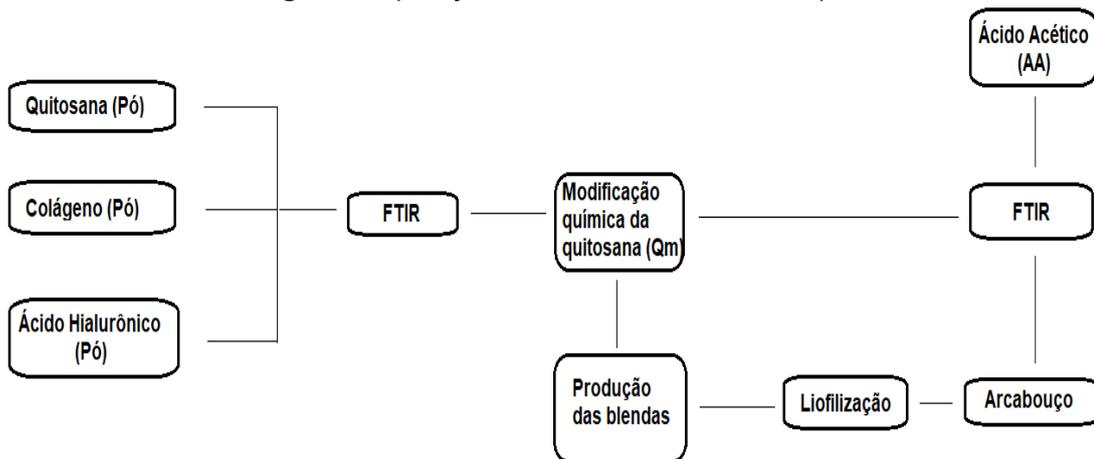
Figura 7: Configuração da caixa térmica para os moldes plásticos.



Fonte: Autor.

4.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos espectros de absorção no IR, com transformada de Fourier, em modo ATR para amostras puras de quitosana, colágeno, ácido hialurônico. Após o processo de modificação foram feitas análises da quitosana modificada com ácido hialurônico e para as blendas de colágeno e quitosana modificada, utilizando o equipamento Spectrum 65 (Perkin Elmer). Os espectros de absorção foram analisados na faixa de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans. A Figura 8 demonstra como foi aplicada a técnica em relação às etapas do estudo.

Figura 8: Aplicação do FTIR nas diferentes etapas

Fonte: Autor.

Uma última análise foi realizada a fim de conferir a existência de ácido acético na Qm, sendo realizado o FTIR da mesma para comparação dos resultados.

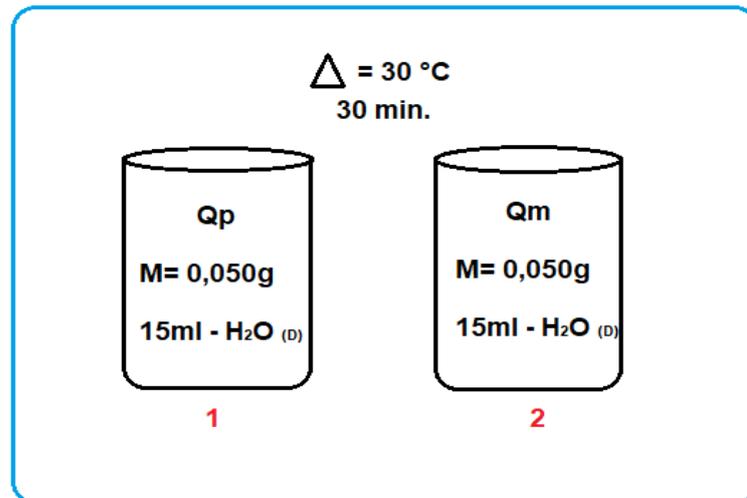
4.2.5 Teste de solubilidade

Realizou-se esse ensaio para verificar a solubilidade da quitosana modificada com o AH em água, visando comprovar a mudança na solubilidade da quitosana após a etapa da modificação química, uma vez que a solubilidade depende diretamente das interações entre soluto e solvente [77].

Para tanto, dois béqueres foram mantidos sob aquecimento à 30°C contendo 15mL de água destilada em cada, nos quais foram adicionadas 0,050g de quitosana pura (Qp) e 0,050g de quitosana modificada com AH (Qm), respectivamente, mantidos sob agitação constante durante 30 min. Essas massas foram consideradas como massa inicial (mi)

Após esse período, as amostras foram centrifugadas em tubos falcon, durante 15 minutos sob rotação de 2500 rpm. Em seguida, foram secas em estufa durante 24h e pesadas obtendo-se a massa final (mf). As condições do teste de solubilidade estão representados na Figura 9.

Figura 9: Representação do teste de solubilidade



Fonte: Autor.

Portanto, a partir disso subtraiu-se a massa inicial ($m_f - m_i$) do corpo de fundo, obtendo-se a massa de quitosana que realmente foi solubilizada em água.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície e a região de corte dos arcabouços da blenda foram avaliadas por MEV.

As amostras foram previamente preparadas em imersão de nitrogênio líquido e fratura com bisturi no centro dos arcabouços.

A morfologia foi obtida usando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6010). A superfície das amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro e paládio. A voltagem utilizada foi de 3kV.

4.2.7 Análise termogravimétrica (TGA)

A medida foi realizada em um equipamento da empresa TA Instruments, com as seguintes condições experimentais: aquecimento de 25-600°C para as amostras de Qp e Qm e 25-300°C para as blendas de Qm e colágeno, taxas de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera inerte de nitrogênio (N₂), com vazão total de gás de 100 mL/min, sendo dividido em 40 mL/min no forno e 60 mL/min na balança [78].

4.2.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada em um equipamento da TA Instruments com fluxo de gás nitrogênio (N₂) de 50mL/min; taxa de aquecimento de 10°C/min; temperatura de início do teste de 25°C e temperatura final do teste de 300°C [79].

4.2.9 Ensaio de intumescimento

Foi realizado ensaio de intumescimento a fim de avaliar o comportamento do arcabouço liofilizado em contato com a solução tampão fosfato-salino (PBS). Neste teste foram realizadas medições em intervalos de tempo pré-definidos a fim de verificar a estabilidade e inchamento do arcabouço. As medidas foram realizadas até a perda de massa do arcabouço ou a desestabilização da estrutura do mesmo. Nesses casos não foi possível prosseguir com as medições [80].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modificação química da quitosana

5.1.1 Modificação química da quitosana com AH.

Verificou-se ainda que a quitosana pura apresentou-se na forma de um pó de coloração marrom claro e, após a modificação, transforma-se em um aglomerado de cor mais escura.

A Figura 10 ilustra macroscopicamente a Qp e a Qm. O rendimento da modificação química da quitosana com AH foi de aproximadamente 69%.

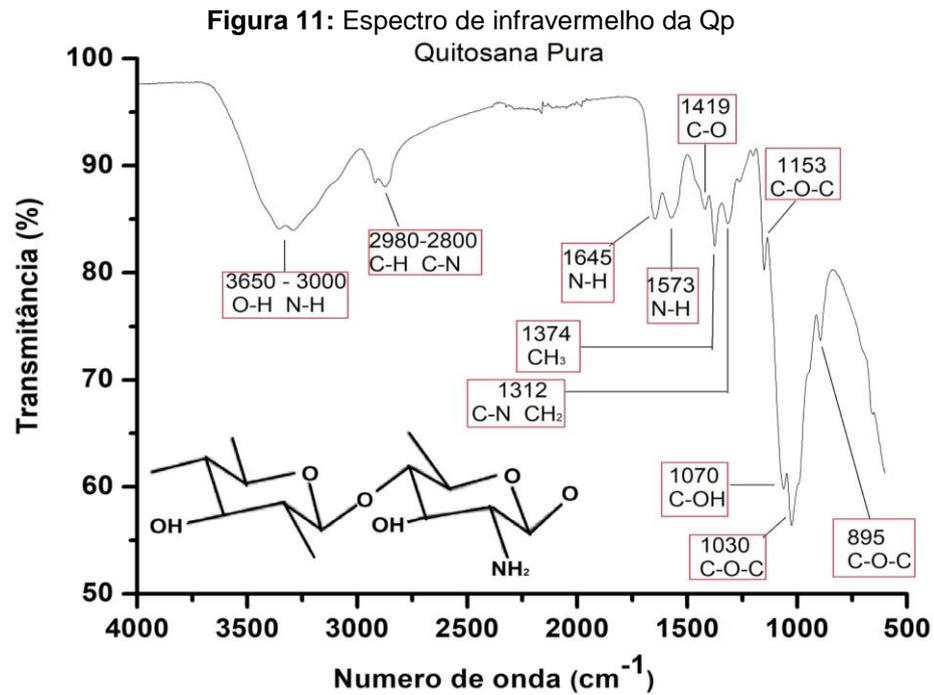
Figura 10: Fotografia de amostras de quitosana, (A) Qp – Antes de modificação química; (B) – Qm – Após modificação com AH



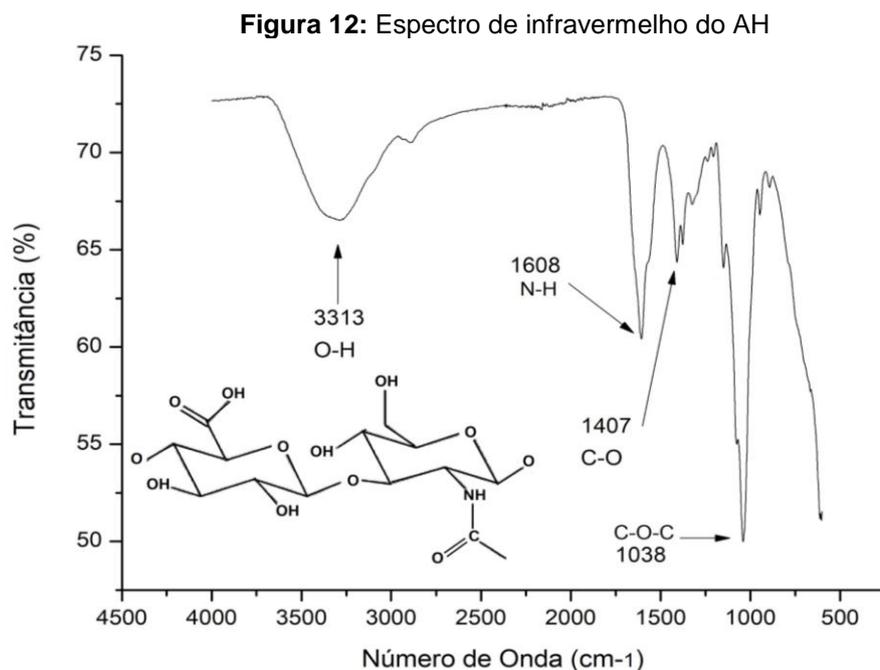
Fonte: Autor.

5.1.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Analisando o espectro de FTIR da Figura 11 é possível observar alguns grupos característicos da Qp: $3650 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ relacionado ao estiramento O-H e grupos N-H; $2980 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ estiramento C-H e deformação axial da ligação C-N; 1645 cm^{-1} corresponde à deformação angular simétrica do grupo NH_2 ; 1573 cm^{-1} ligação de NH_2 no plano; 1419 cm^{-1} ligação C-O; 1374 cm^{-1} grupos CH_3 ; 1312 cm^{-1} ligações C-N e CH_2 . Em 1070 cm^{-1} ligação de C-OH de álcool, em: 1153 cm^{-1} 1030 cm^{-1} , 895 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento C-O-C [81,82].

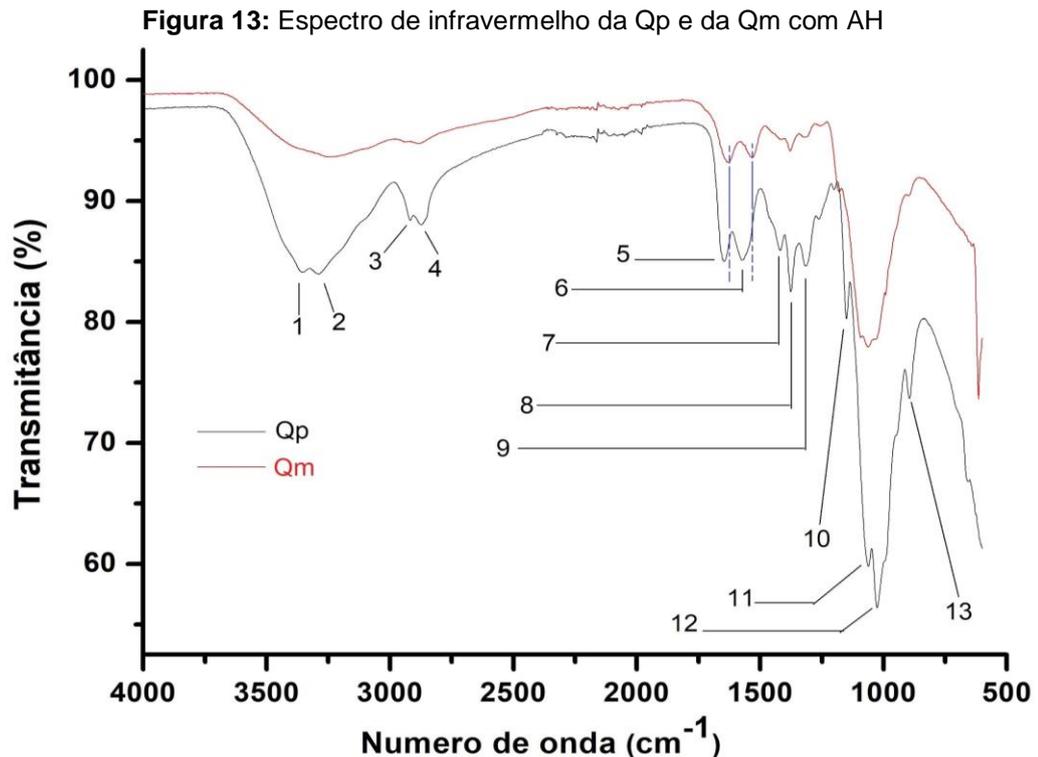


O espectro de FTIR referente ao AH, Figura 12, permite verificar algumas bandas características: 3313 cm^{-1} estiramento OH, 1608 cm^{-1} flexão da ligação N-H de amida II, 1407 cm^{-1} alongamento da ligação C-O do grupo carbonila da amida e por fim em 1038 cm^{-1} estiramento da ligação C-O-C presente ao longo da cadeia [83,84].



A Figura 13 ilustra a sobreposição dos espectros de FTIR da Qp e da Qm com AH. Foi possível observar nítidas alterações no espectro da Qp após o processo de modificação química com AH, as quais estão relacionadas a seguir:

- Redução na intensidade da banda em 3350 cm^{-1} , referente às ligações de estiramento O-H e grupos N-H (1 e 2);
- Desaparecimento da banda em 2915 cm^{-1} (3) e redução na intensidade da banda em 2865 cm^{-1} , relacionado às ligações de estiramento C-H e deformação axial da ligação C-N (4);
- Deslocamento da banda da Qp em 1650 cm^{-1} da ligação C=O de amidas N substituídas (grupos acetilamida da quitina) devido a presença de alguns grupos acetil restantes do processo de desacetilação para 1632 cm^{-1} na Qm (5);
- Deslocamento das bandas em 1573 cm^{-1} referente às ligações de NH_2 no plano da Qp para 1533 cm^{-1} na Qm (6);
- Redução na intensidade das bandas em 1419 cm^{-1} referente às ligações C-O (7), 1374 cm^{-1} , referente às deformações angulares assimétricas de CH_3 (8), em 1312 cm^{-1} ligações C-N e CH_2 (9), 1070 cm^{-1} ligação C-OH (11), 1030 cm^{-1} ligação C-O-C (12) e 895 cm^{-1} ligação C-O-C (13);
- Desaparecimento da banda em 1153 cm^{-1} na Qp referente às ligações de estiramento C-O-C (10);



Através da identificação das bandas da figura 13 algumas considerações foram feitas em relação a modificação química da quitosana. As bandas de absorção identificadas como (1) e (2), referentes aos estiramentos O-H e N-H, respectivamente, mostraram uma redução na intensidade, indicando que possivelmente ocorreu uma interação química entre o AH e esses grupos reativos que foram oxidados durante a reação de modificação. Além disso, verificou-se o desaparecimento da banda (3) e redução da (4), referentes ao estiramento das ligações C-N e C-H, respectivamente. Outras reduções de intensidades foram detectadas nas bandas (9) e (11), referentes às ligações C-H/C-N e C-OH, respectivamente.

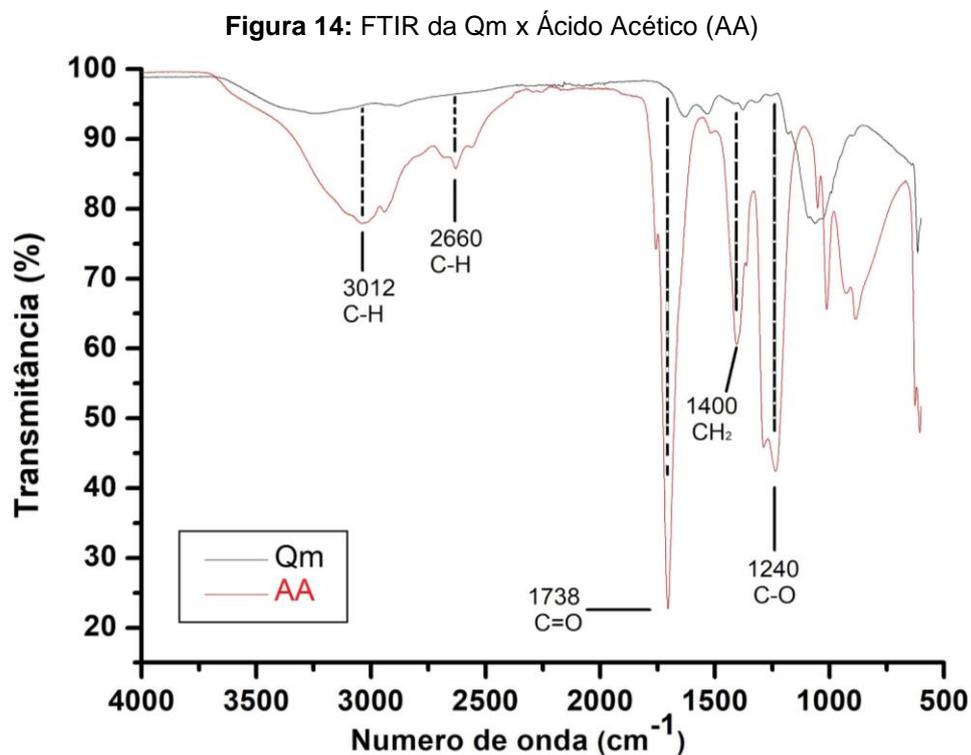
Na banda (5) verificou-se deslocamento proveniente de ligações de amidas (O processo de desacetilação incompleto resulta na presença de alguns grupos acetil ao longo da estrutura da quitosana). Na banda (6) também ocorreu deslocamento de banda sendo atribuída à ligações N-H. A princípio, os deslocamentos destas ligações sugerem interações eletrostáticas com o AH, não havendo mudanças intensas nas bandas como às descritas anteriormente.

O comparativo dos espectros sugere uma interação química do AH com os átomos de oxigênio presentes na estrutura da quitosana, verificado nos

deslocamentos das bandas (7), (12) e (13), porém, fica mais evidente com o desaparecimento da banda (10) referente ao estiramento das ligações C-O-C.

Portanto, através da análise dos espectros, ilustrados na Figura 13, é possível verificar que a modificação química da quitosana com o ácido hialurônico foi obtida com sucesso, sendo observada a interação dos mesmos nos grupos reativos -NH e -OH [85], porém interações foram verificadas com os oxigênios presentes ao longo da estrutura da quitosana.

E, por fim, um dos objetivos propostos do trabalho era: A obtenção da blenda colágeno com a quitosana modificada livre da presença de ácido acético, uma vez que a presença deste ácido, mesmo em pequena quantidade após a lavagem, pode prejudicar a interação entre o arcabouço e o sistema hospedeiro, prejudicando, assim, a aplicação biomédica do arcabouço a base de quitosana, foi realizado um comparativo entre os espectros de FTIR do ácido acético e da Qm para comprovar a ausência do ácido acético, como mostrado na Figura 14.



Foram identificadas as seguintes bandas do AA: Banda em 3012 cm⁻¹ e 2660 cm⁻¹ estiramento da ligação C-H; Banda em 1738 cm⁻¹ relativa à ligação C=O;

Ligação C-O em 1240 cm^{-1} e grupos CH_2 que são representados na banda de 1400 cm^{-1} [86]. Sobrepondo os espectros não foi encontrada nenhuma banda característica do AA na Qm. Assim através desta análise não foi verificado nenhuma evidência de AA na estrutura da Qm, condição muito importante para aplicação do mesmo em cultura celular.

5.1.3 Teste de solubilidade da quitosana modificada com AH em água

A Tabela 2 apresenta a massa final de corpo de fundo ao final do teste de solubilidade, cuja massa inicial foi de 0,050 g.

Tabela 2: Valores de massa (g) do corpo de fundo obtidos experimentalmente

Quitosana	M _i (g)	M _f (g)	Massa solubilizada (%)
Qp	0,050	0,037	27,02
Qm	0,050	0,004	91,12

Legenda: Qp= quitosana pura e Qm= quitosana modificada.

Após seguir os procedimentos descritos na metodologia para o teste de solubilidade, observa-se que houve um aumento significativo na solubilidade em água, para a Qm (91,12%) em relação a Qp (27,02%). Este resultado corrobora com os espectros de infravermelho, mostrando que houve uma mudança na estrutura inicial da quitosana após a modificação da mesma com o AH, alterando a sua solubilidade em água, uma vez que a quitosana é praticamente insolúvel neste solvente [87].

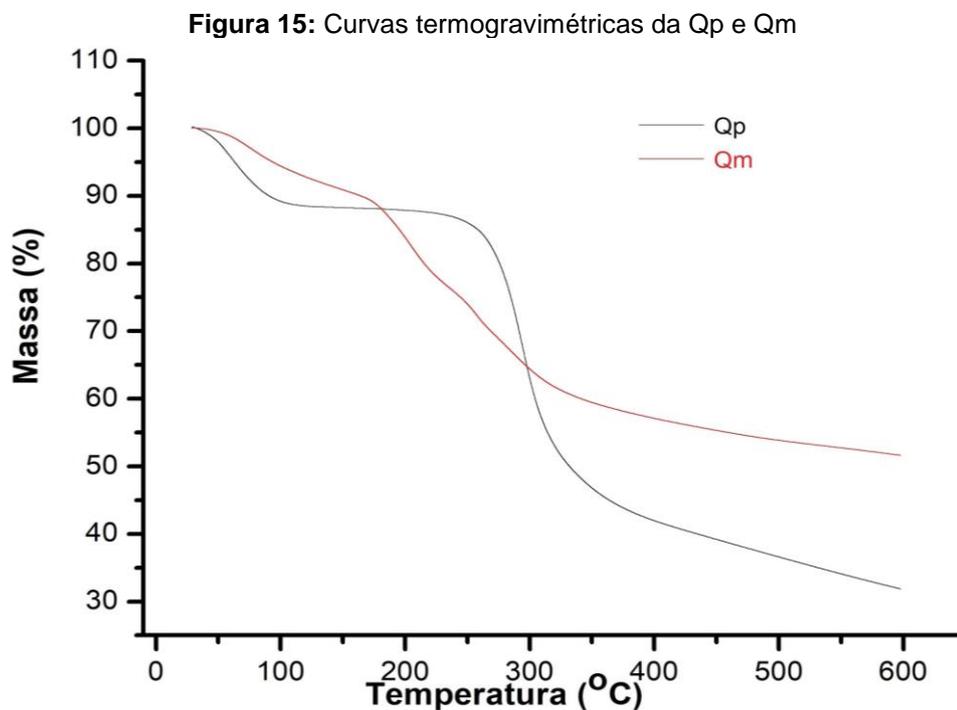
O aumento da solubilidade da quitosana em água acontece devido ao fato das moléculas de AH se ligarem aos grupos NH_2 e OH , presentes ao longo da cadeia da quitosana. Isto provoca uma redução da interação intermolecular entre as cadeias das moléculas da quitosana, devido à alta densidade de ligação de hidrogênio existente entre as mesmas [88].

Além disso, a característica de ser solúvel em água é muito importante na obtenção das blendas de colágeno e quitosana, pois evita-se o uso do ácido acético para obtenção da blanda colágeno/quitosana, uma vez que a presença desse ácido, mesmo em pequena quantidade após a lavagem, pode prejudicar a interação entre o

arcabouço e o sistema hospedeiro, prejudicando, assim, a aplicação biomédica do arcabouço desenvolvido a base de quitosana.

5.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

É possível observar na Figura 15 os resultados de TGA da Qp e Qm a fim de avaliar a estabilidade térmica da Qp e Qm.



A Qp apresenta duas etapas de perda de massa. A primeira etapa, entre 50 e 100°C, corresponde a perda de água da quitosana. A segunda etapa, entre 230 e 380°C, corresponde a degradação da mesma [89].

É possível observar que a modificação química da quitosana com AH provocou uma mudança na estabilidade térmica da mesma. Ao contrário da Qp, a Qm apresentou três etapas de perda de massa. A primeira etapa aconteceu em um intervalo maior de temperatura, entre 50 e 180°C, quando comparado a Qp. Provavelmente, esse efeito se deve a presença de grupos carboxílicos, presentes nas moléculas de AH, que após o processo de modificação química passam a estar

presentes na molécula de Qm, podendo interagir de maneira mais intensa com as moléculas de água [90]. Com isso, é necessário maior energia para remover as moléculas de água ligadas à estrutura da Qm, aumentando, assim, o intervalo de temperatura no qual esse processo acontece.

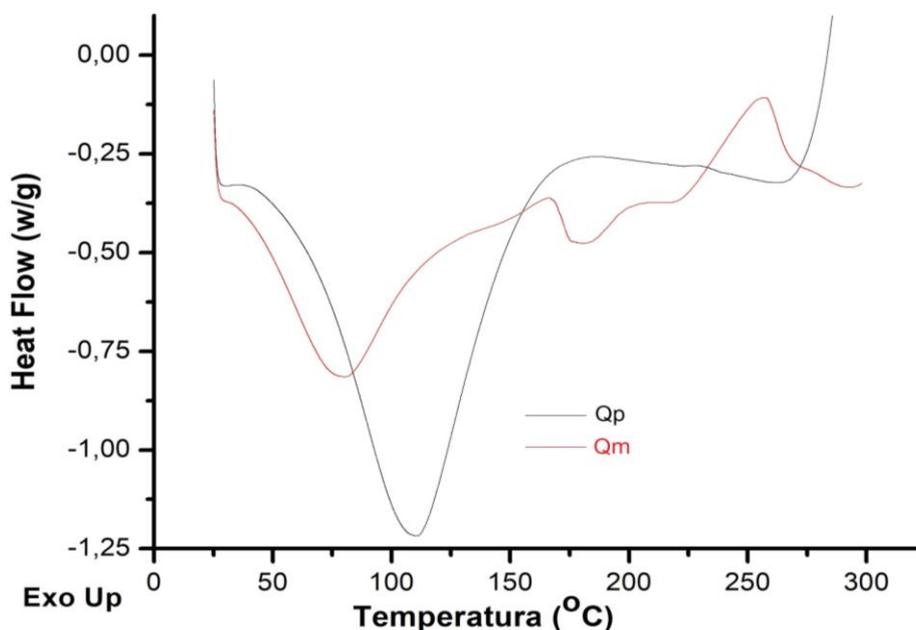
A segunda etapa, entre 180 e 250°C, e a terceira etapa, entre 250 e 380°C, correspondem a degradação da Qm. Quando comparado com a Qp (230°C), o início da degradação da Qm acontece em temperatura menor (180°C). Ou seja, o processo de modificação química diminui a estabilidade térmica da quitosana. Isso provavelmente acontece, pois as moléculas de AH se ligaram aos grupos amina e hidroxila da molécula de quitosana, diminuindo, dessa maneira, a forte interação intermolecular ali anteriormente existente. Por isso, houve a redução do início do processo de degradação das moléculas de Qm. Assim, esta diminuição das interações intermoleculares entre as moléculas de Qm, aqui analisado, corrobora com o teste de solubilidade da mesma em água. Além disso, outra explicação possível para o início da degradação da Qm acontecer em temperatura menor a observada para a Qp, se deve ao fato das moléculas de AH, presentes na Qp, apresentarem menor estabilidade térmica do que as moléculas de Qp, se degradando em aproximadamente em 275°C e reduzindo, dessa maneira, a temperatura de início de degradação.

De acordo com o trabalho de Nascimento e colaboradores, o comportamento térmico da Qm ficou muito próximo ao obtido em um material a base de quitosana e AH, com transições semelhantes ao observado no presente estudo [91].

5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 16 ilustra as curvas de DSC da quitosana pura e da quitosana modificada com AH.

Figura 16: Curva de DSC para as amostras de Qp e Qm



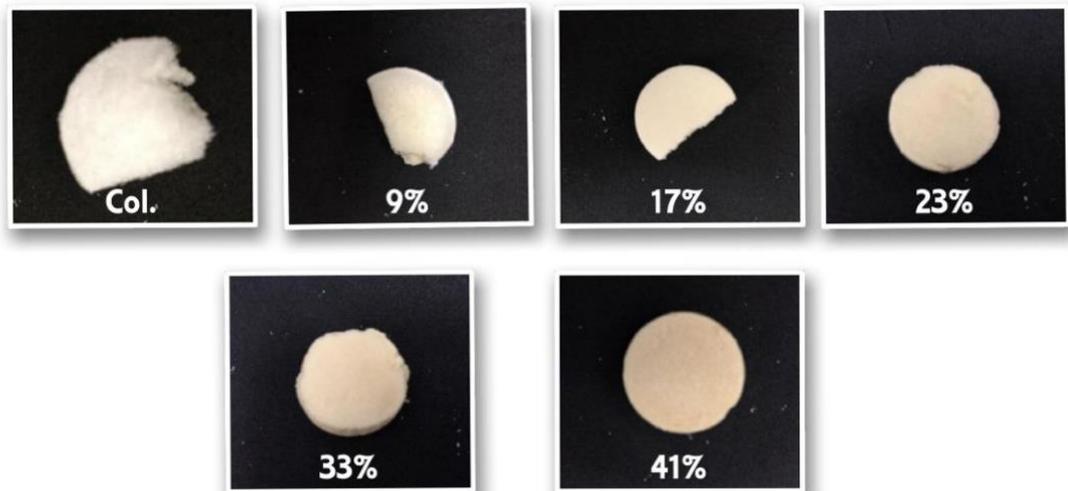
A Qp apresenta indício de mudança de linha de base, próximo a 35°C, que está relacionada a temperatura de transição vítrea da mesma. Além disso, há a presença de dois picos endotérmicos na faixa correspondente entre 25 a 300°C. O primeiro pico, próximo a 110°C, está relacionado com a perda de água presente na mesma. Por sua vez, o segundo pico, próximo a 265°C, está relacionado com a degradação da quitosana [92,93]. É possível observar, na Figura 16, que o processo de modificação química da quitosana altera as suas transições térmicas. Neste caso, diferentemente da Qp, a Qm apresenta dois picos endotérmicos e um pico exotérmico. Provavelmente, o primeiro pico endotérmico, próximo a 78°C, está relacionado com a perda de água presente na mesma, porém ligada menos intensamente a molécula de Qm. O segundo pico endotérmico, próximo a 180°C, pode estar relacionado a perda de água ligada mais intensamente a molécula de Qm, assim como discutido no ensaio de TGA (Figura 15), devido a presença do grupo carboxílico nas moléculas de Qm. Portanto, a presença dos dois picos endotérmicos mostram que a interação das moléculas de água acontecem em sítios distintos das moléculas de Qm, provavelmente devido a não modificação completa da quitosana com as moléculas de AH, corroborando com os resultados obtidos no FTIR.

E, por fim, o pico exotérmico, próximo a 256°C, pode estar relacionado a organização das moléculas de Qm antes de iniciar a degradação [94].

5.2 Arcabouço a partir da Blenda de colágeno-Qm.

A Figura 17 ilustra a estrutura macroscópica dos arcabouços obtidos a partir da blenda colágeno-Qm.

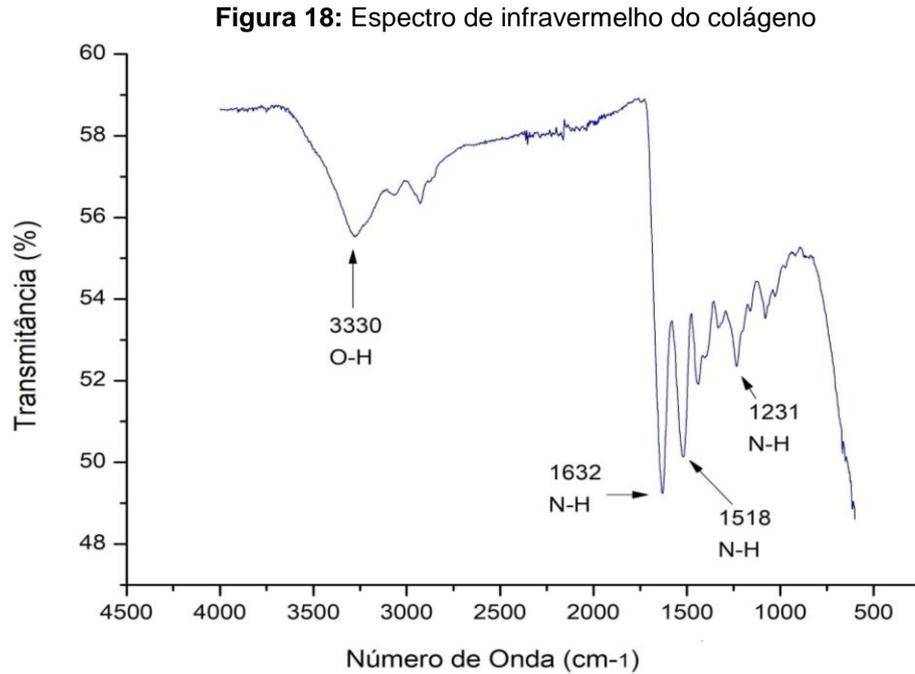
Figura 17: Arcabouços obtidos a partir da blenda Colágeno-Qm



Fonte: Autor.

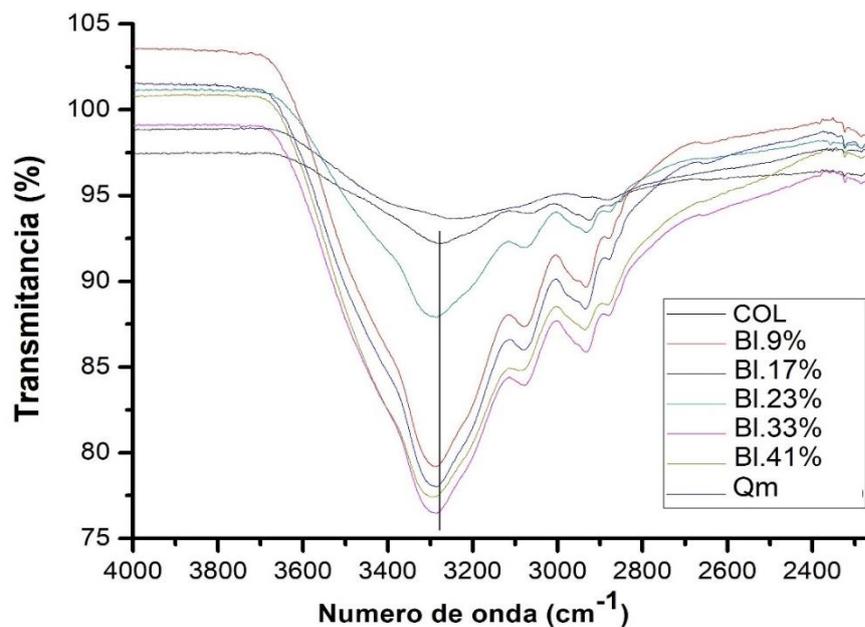
5.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Observando o espectro do colágeno na Figura 18 foram detectados os seguintes picos: 1632 cm^{-1} , 1518 cm^{-1} , 1231 cm^{-1} , os quais correspondem, respectivamente, à ligação N-H de amida I, deformação das ligações N-H de amida II e deformação angular dos grupos N-H de amida III. Na banda 3330 cm^{-1} é verificado estiramento de grupo O-H [95].



Após a produção dos arcabouços novamente foi realizado o FTIR para avaliar as possíveis interações entre as moléculas de colágeno e Qm na blenda. Os gráficos dos arcabouços das blendas foram divididos em duas partes (4000 - 2250 cm⁻¹) conforme Figura 19 e (2250 - 500 cm⁻¹) conforme Figura 20.

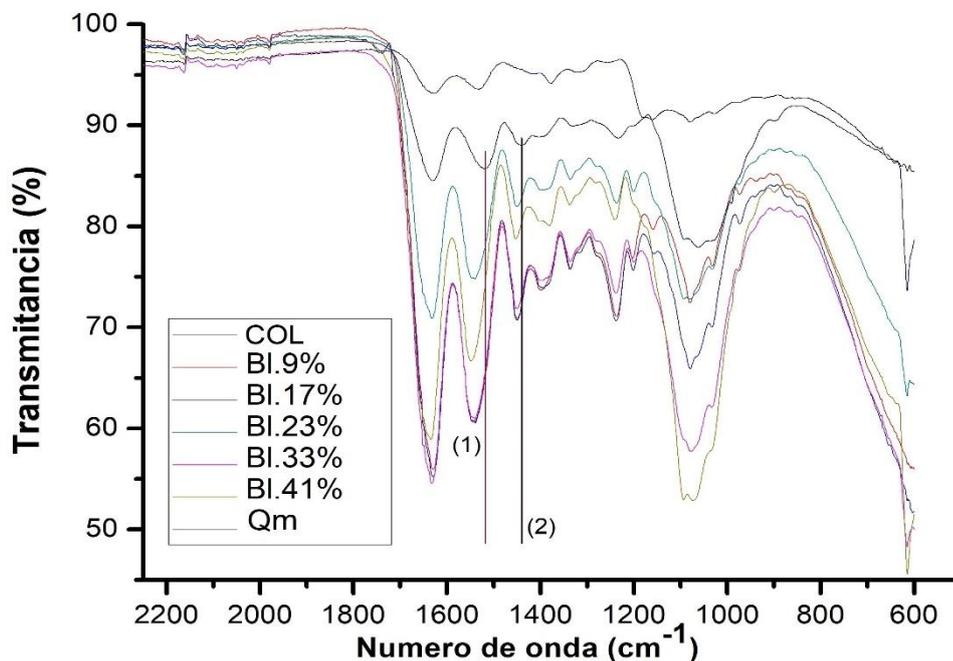
Figura 19: FTIR dos Arcabouços obtidos através das blendas Qm-Colágeno



Pode-se verificar na Figura 19 um pequeno deslocamento da banda de colágeno 3282 cm^{-1} para aproximadamente 3300 cm^{-1} em relação á todas as blendas, o que indica uma possível interação eletrostática ou até mesmo uma ligação de hidrogênio entre as moléculas de colágeno e da Qm.

A Figura 20 ilustra o espectro de FTIR na faixa de 2250 cm^{-1} à 500 cm^{-1} . Os deslocamentos seguem uma tendência para esquerda em (1) e (2), observado para todas as porcentagens da blenda em relação ao colágeno puro (Col.), sendo (1) de 1515 cm^{-1} para 1543 cm^{-1} e (2) de 1440 cm^{-1} para 1550 cm^{-1} . Novamente esses deslocamentos demonstram que não houve uma ligação química entre a Qm e o colágeno, mas uma interação puramente física ou até mesmo ligação de hidrogênio [96].

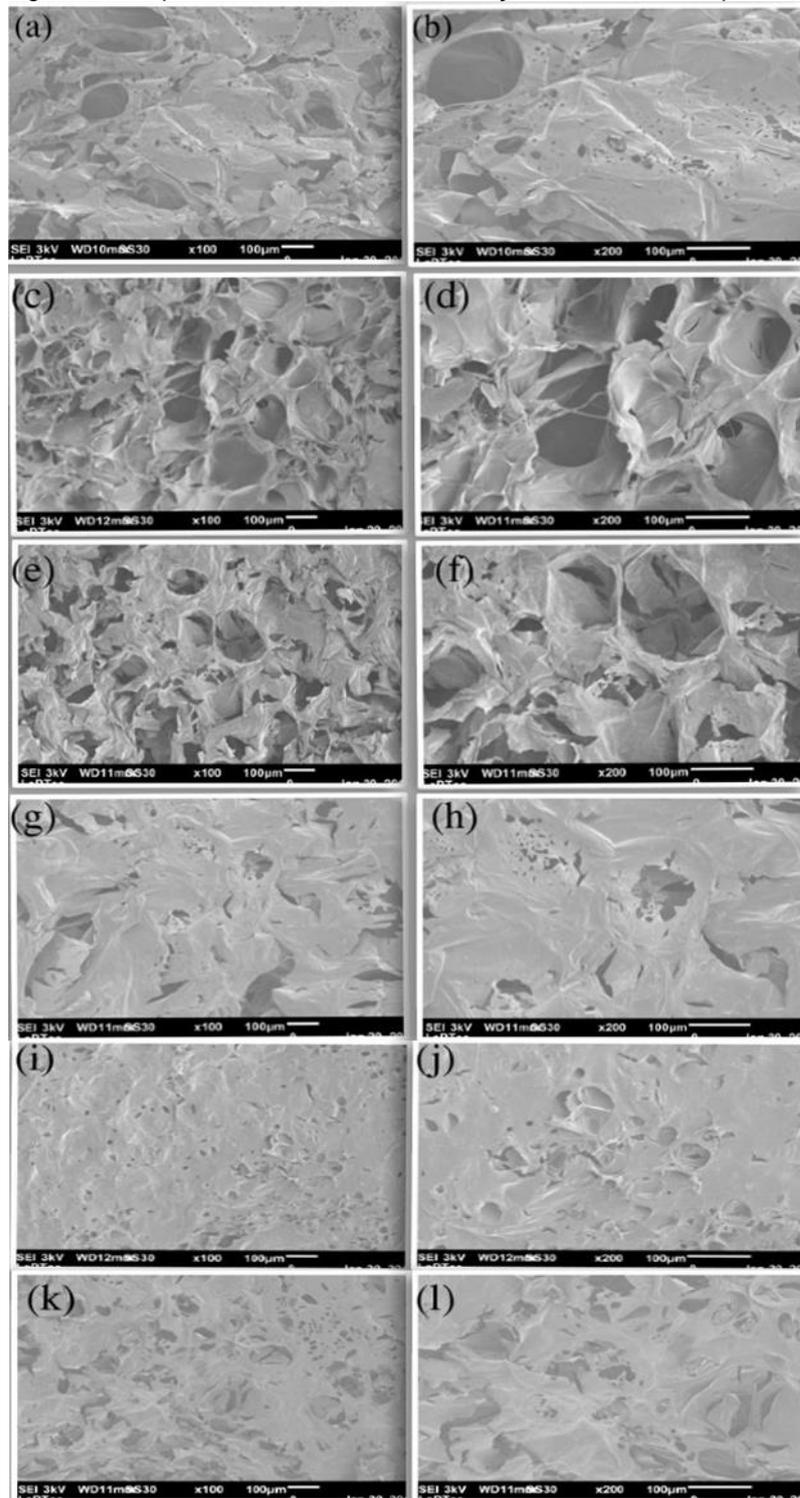
Figura 20: FTIR dos Arcabouços obtidos através das blendas Qm-Colágeno na faixa de 2250 cm^{-1} a 500 cm^{-1}



5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 21 e Figura 22 ilustram as micrografias da superfície e da superfície fraturada dos arcabouços, respectivamente, do colágeno puro, e da blenda de colágeno com diferentes concentrações de Qm.

Figura 21: Imagens da Superfície Porosa dos arcaibouços nas diferentes porcentagens de Qm



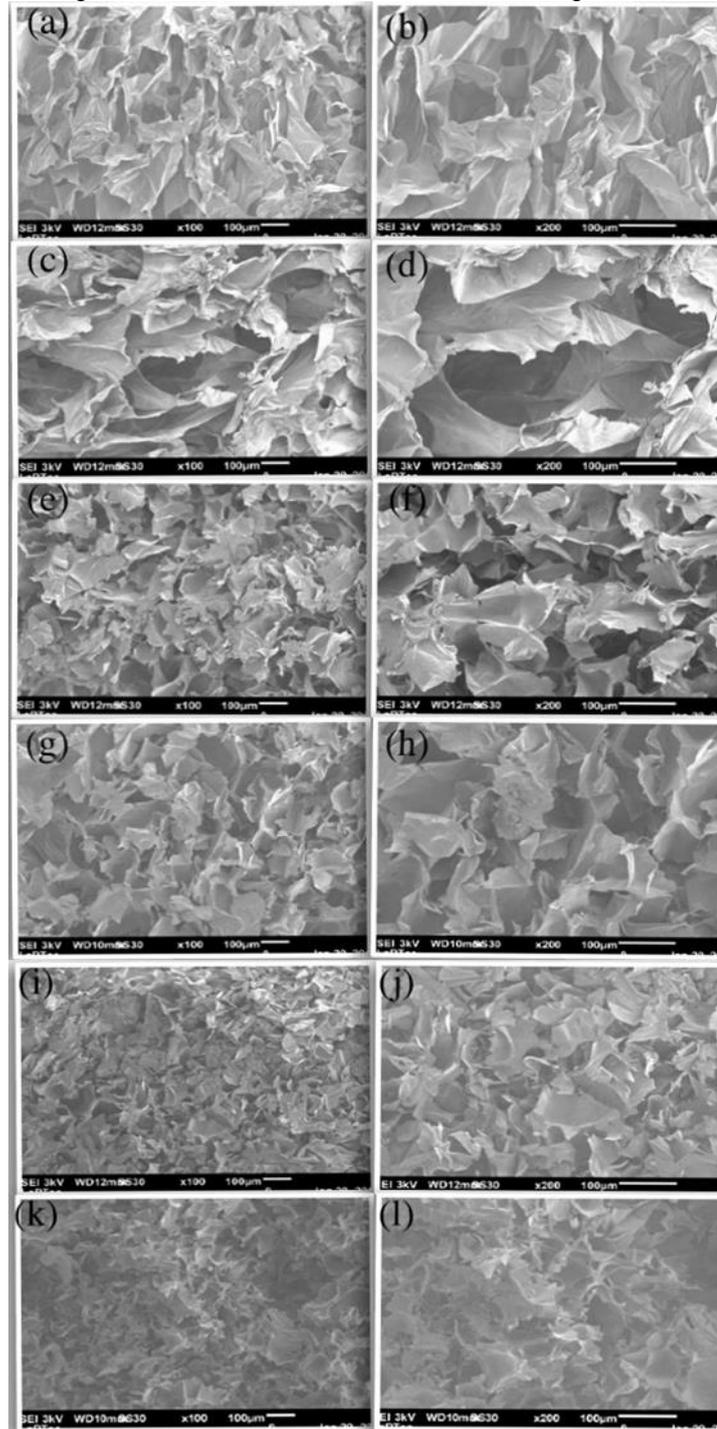
Legenda: Na coluna à esquerda ampliação dos arcaibouços em 100x e a direita 200x, sendo: (a) e (b) - Colágeno Puro; (c) e (d) - BI.9%; (e) e (f) - BI.17%; (g) e (h) - BI.23%; (i) e (j) - BI.33%; (k) e (l) - BI.41%.

É possível observar na Figura 21 que o arcabouço da blenda colágeno-Qm apresentou, após o processo de liofilização, uma superfície irregular, com presença de poros interconectados e, também, uma parte mais lisa e estriada. Entretanto, após a adição de 9% e 17% da Qm ao colágeno, a blenda apresentou uma superfície mais rugosa e porosa que o arcabouço de colágeno, perdendo a presença da parte lisa, tornando-se com aspecto de folhas. Após a adição de 23% de Qm ao colágeno, a blenda apresentou uma superfície mais lisa e estriada, com fissuras e alguns poros espalhadas pela mesma. Com a adição de 33% de Qm ao colágeno, a blenda apresentou uma superfície mais densa com a presença de crateras sobre a sua superfície e poucos poros. E por fim, a adição de 41% de Qm ao colágeno, tornou a superfície da blenda mais porosa, com algumas regiões mais lisas e estriadas, assim como o arcabouço de colágeno. Portanto, é possível observar que a porcentagem de Qm ao colágeno altera a morfologia de superfície da blenda liofilizada.

É possível observar na Figura 22 que o arcabouço de quitosana apresentou, após o processo de liofilização, uma morfologia, na região de corte, com aspecto de folhas e com poros ao longo da estrutura. A adição de 9% de Qm ao colágeno, não modificou acentuadamente a morfologia da região de corte desta blenda, a qual ficou muito próxima do arcabouço de colágeno (Figura 21 (a)). A adição de 17% e 23% de quitosana modificada com AH ao colágeno, mantém a estrutura folhada da região de corte das blendas, porém mais compacta e com poros menores do que visto no arcabouço de colágeno e na blenda com 9% de Qm. E por fim, a adição de 33% e 41% de Qm ao colágeno, compacta ainda mais a estrutura de folhas presentes na região de corte dessas blendas, deixando os poros ainda menores ao longo da estrutura.

A presença de poros interconectados é um fator importante para a confecção dos curativos cutâneos, uma vez que permitem a circulação de oxigênio o que promove a estimulação da migração celular e mitose das células nos processos de cicatrização. Diante disso os arcabouços de 9% e 17% de Qm foram os que apresentaram melhores características nesse aspecto uma vez que verificou-se a presença de muitos poros em sua superfície que estará em contato direto com a ferida do paciente [97].

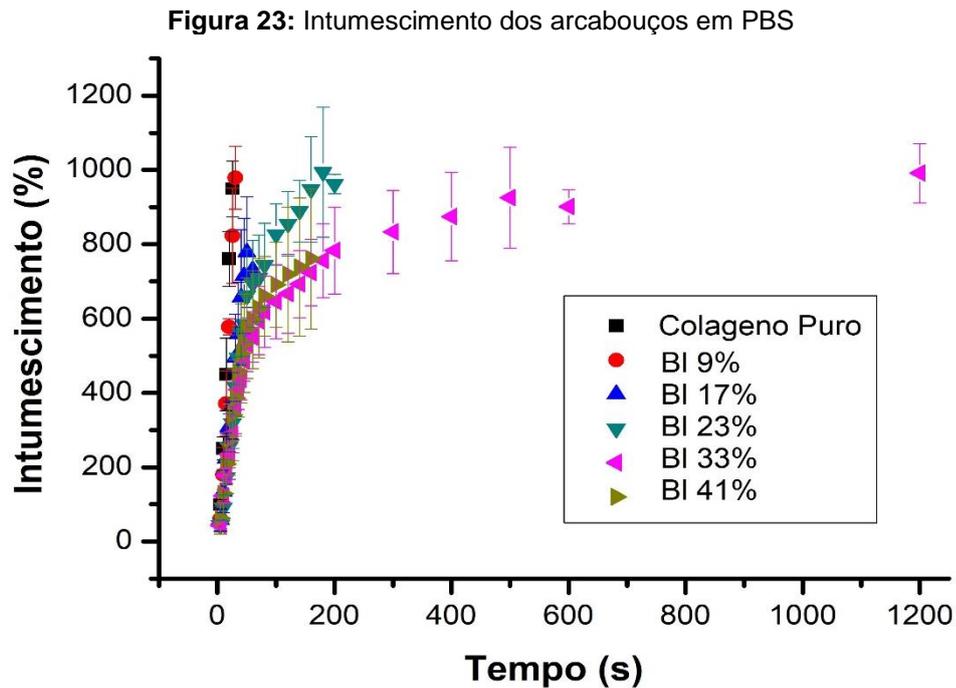
Figura 22: Imagem da região de corte com bisturi submetida a congelamento com nitrogênio líquido



Legenda: Na coluna à esquerda ampliação dos arcahouços em 100x e a direita 200x, sendo: (a) e (b) - Colágeno Puro; (c) e (d) - BI.9%; (e) e (f) - BI.17%; (g) e (h) - BI.23%; (i) e (j) - BI.33%; (k) e (l) - BI.41%.

5.2.3 Ensaio de intumescimento

Através da Figura 23 e da Figura 24 é possível observar o tempo de estabilidade da estrutura do arcabouço até sua perda de massa ou desestabilização do mesmo.



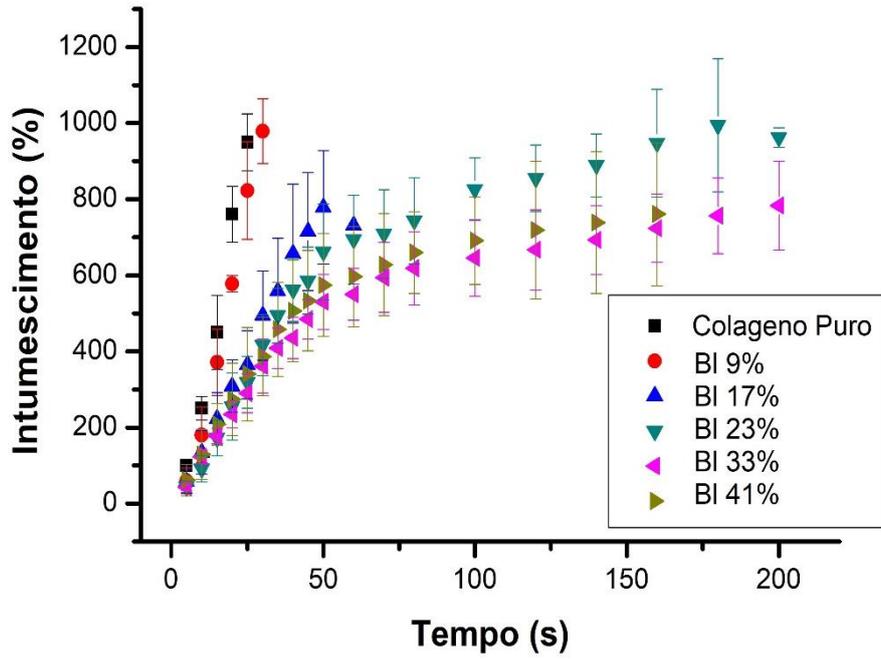
Observa-se que a concentração de Qm ao colágeno, modifica o tempo de estabilidade da estrutura do arcabouço exposto à solução de PBS. Neste caso, a ordem crescente de tempo de estabilidade foi: BI.33%>BI.23%>BI.41%>BI.17%>BI.9%~Col. A adição da Qm de uma forma geral prolongou a estabilidade do arcabouço em todas as concentrações de blenda usadas em relação ao arcabouço de colágeno, exceto para a concentração de 9% Qm. Uma possível explicação para maior estabilidade da estrutura do arcabouço após a adição de 23%, 33% e 41% de Qm ao colágeno se deve à morfologia da superfície destes arcabouços, como visto nas micrografias eletrônicas da Figura 21, a qual se apresentou menos porosa e com uma maior área lisa e estriada, quando comparado ao colágeno puro e aos arcabouços com 9% e 17% de Qm. Dessa maneira, a entrada de líquido para dentro do arcabouço é retardada, esse efeito implica diretamente na aplicação biológica do material como curativo cutâneo uma vez que a entrada de água no arcabouço causa inchamento do mesmo o que leva a

deformação dos poros podendo afetar negativamente o crescimento celular no arcabouço se a estrutura for rapidamente deformada [98]. Assim como as micrografias eletrônicas da região de superfície, as micrografias da região de corte dos arcabouços (Figura 22) corroboram com o aumento da estabilidade dos arcabouços com 23%, 33% e 41% de Qm em PBS, uma vez que a estrutura interna, na forma de folhas, dos mesmos tornaram-se mais compacta e com poros ainda menores ao longo da estrutura, quando comparado aos arcabouços de colágeno, 9% Qm e 17% Qm. Portanto, o retardamento da entrada de moléculas do líquido para dentro da estrutura do arcabouço, assim como o aumento da dificuldade de difusão das moléculas do líquido, internamente ao material, aumentam a estabilidade do arcabouço imerso em PBS.

Outro fator que poderia favorecer a estabilidade da estrutura do arcabouço quando imerso em PBS, é a possível interação entre os polímeros que constituem o mesmo. Sendo assim, conforme visto no espectro de infravermelho da Figura 20, a adição de Qm ao colágeno causa um deslocamento de alguns picos como, por exemplo, em 1450 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} , modificando o perfil de vibração dessas ligações, indicando a existência de interação física entre as moléculas do colágeno com as moléculas da Qm. Portanto, assim como o efeito de superfície, esta interação entre as moléculas que constituem a blenda, poderia desfavorecer a desintegração da estrutura do arcabouço, quando imerso em meio líquido, aumentando o tempo de estabilidade dos mesmos.

Diversos estudos utilizam agentes reticuladores para melhorar a interação entre as cadeias do colágeno e da quitosana, a fim de obter estabilidade da estrutura desta blenda em meio líquido, porém a grande problemática na utilização dos agentes reticuladores é justamente a toxicidade, prejudicando a interação do arcabouço com o tecido no qual será aplicado [99, 100, 101].

Figura 24: Intumescimento dos arcabouços em PBS até 220s



As Figura 25 a 30 ilustram o perfil de intumescimento dos arcabouços de colágeno e dos arcabouços das blendas quando imersos em solução de PBS, assim como os valores das taxas de intumescimento, representado pelo Slope da curva, para cada arcabouço.

Figura 25: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço de colágeno

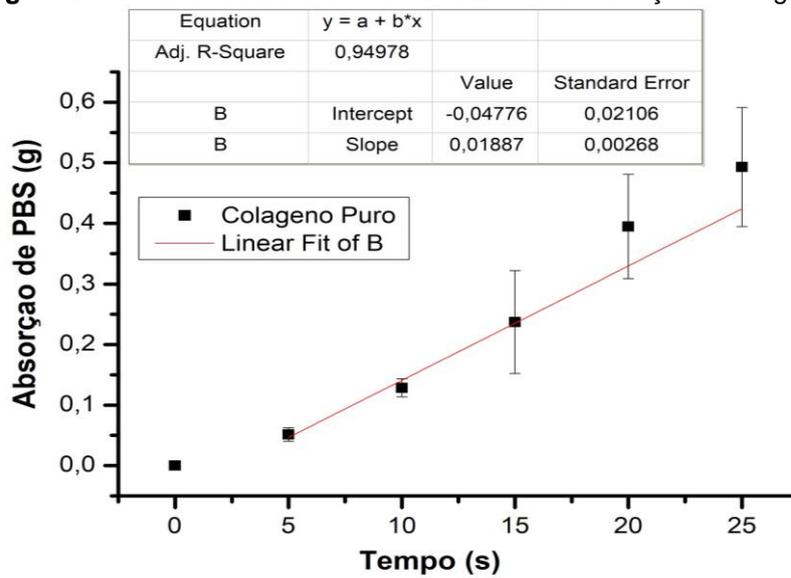


Figura 26: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço BI. 9%

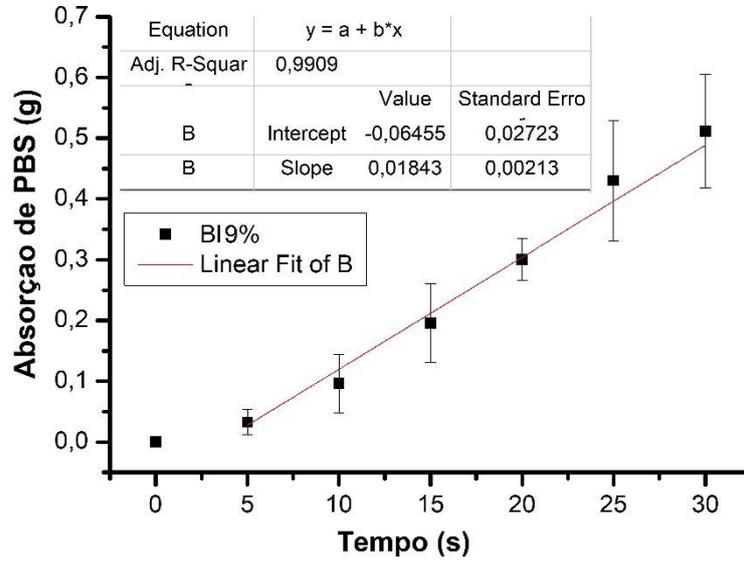


Figura 27: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço BI. 17%

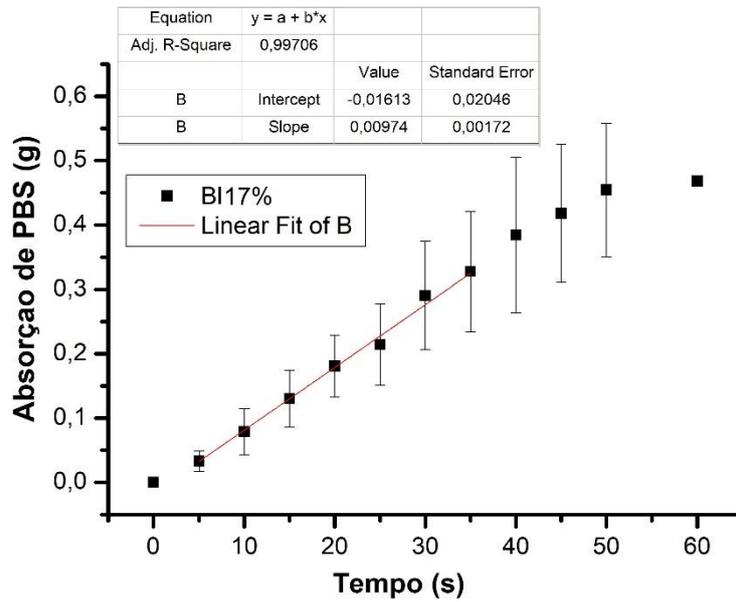


Figura 28: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço BI. 23%

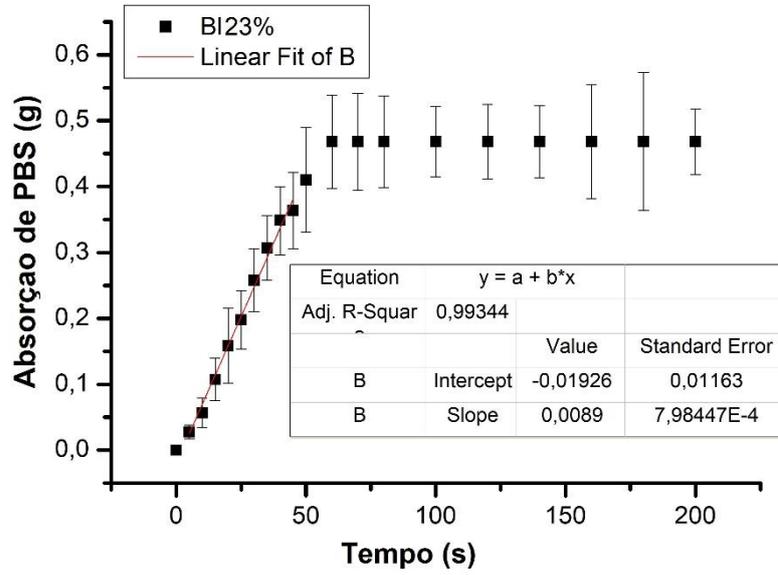


Figura 29: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço BI 33%

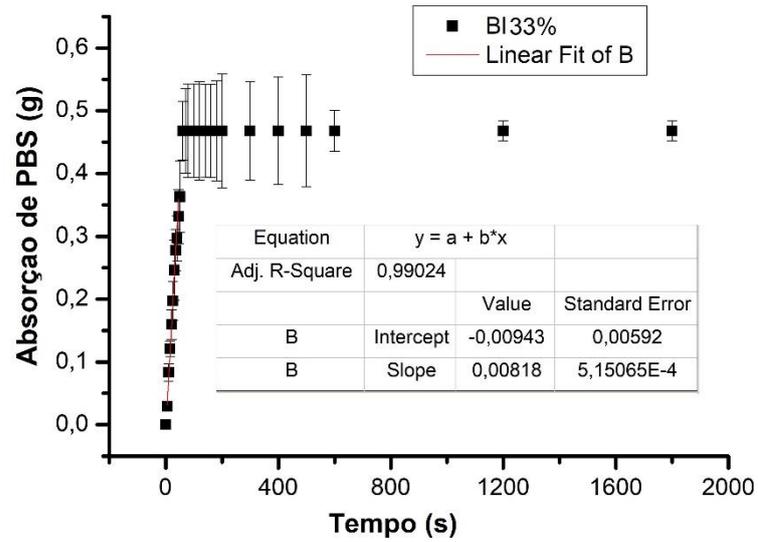
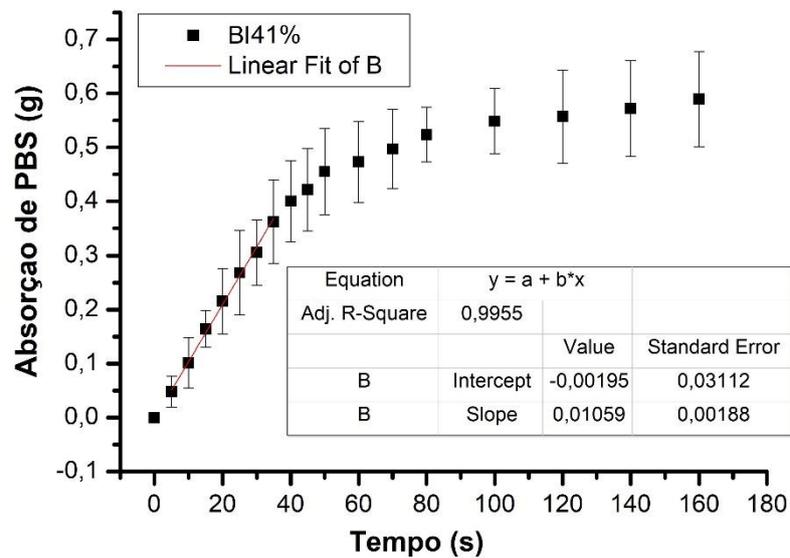
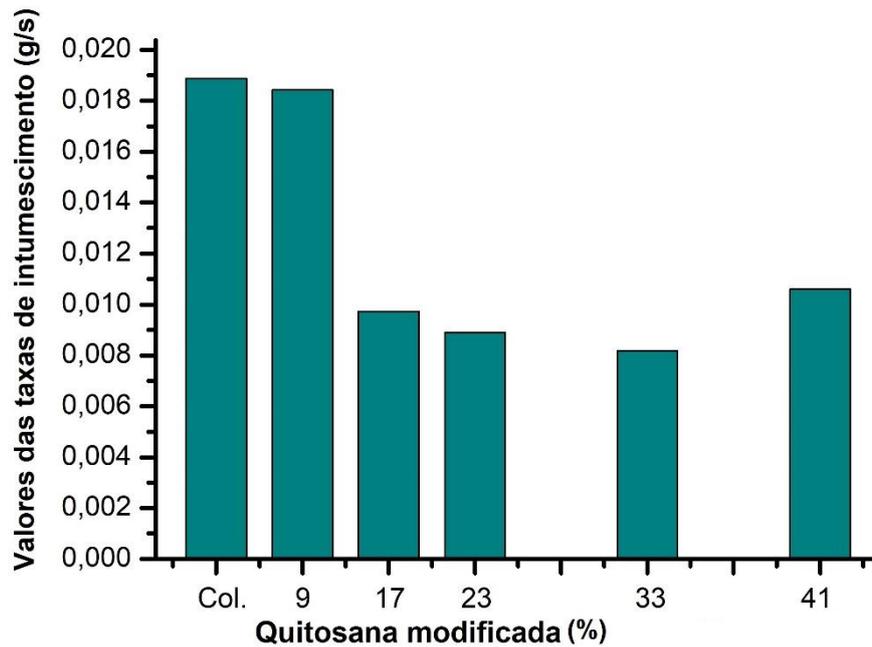


Figura 30: Perfil de Intumescimento de PBS do arcabouço Bl. 41%



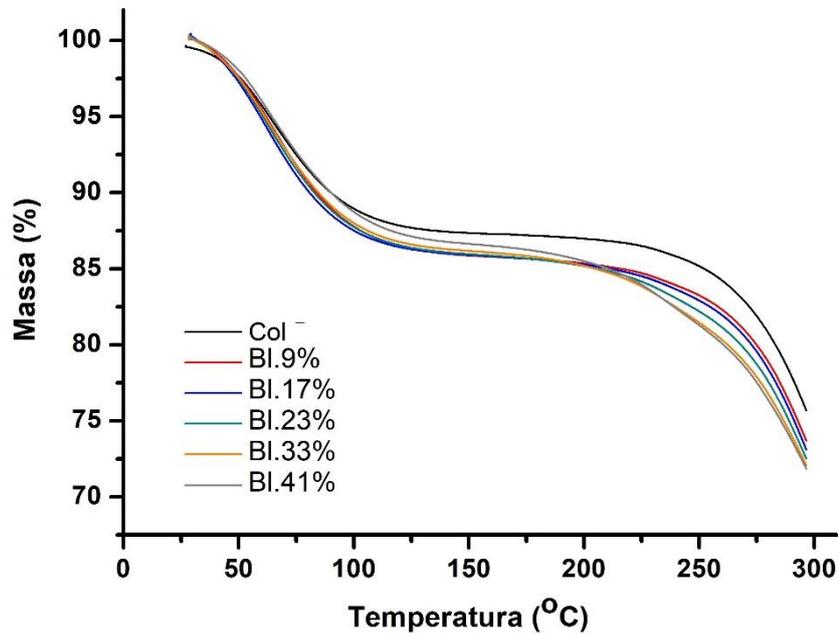
Dessa maneira, é possível observar, na Figura 31, que a adição de Qm ao colágeno diminui o valor da taxa de absorção de PBS nos arcabouços, exceto para a bl.9% Qm. Assim como foi abordado na discussão sobre a estabilidade da estrutura do arcabouço, quando em contato com a solução de PBS, o valor da taxa de intumescimento também está relacionada tanto com a característica morfológica da superfície do arcabouço, quanto com a estrutura do arcabouço. O primeiro fator influencia na entrada de líquido para dentro da estrutura do material e o segundo fator influencia o processo de difusão das moléculas deste líquido internamente ao material. Portanto, quanto menos rugosa e porosa for a superfície do arcabouço, associado a um interior mais compacto/denso e com tamanho menor de poro, menor será o valor da taxa de intumescimento [102].

Figura 31: Valores das taxas de Intumescimento (g/s)

5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 32 ilustra os termogramas dos arcabouços de colágeno e dos arcabouços das blendas.

É possível observar que todos os arcabouços apresentaram duas etapas, bem acentuadas, de perda de massa. A primeira etapa ocorreu entre 50 e 100°C, estando relacionada a perda de água do arcabouço. A segunda etapa ocorreu entre 230 e 300°C, estando relacionada a degradação das moléculas do colágeno [103].

Figura 32: Termograma de todos Arcabouços

Além das etapas de perda de massa, é possível observar no termograma a influência da concentração da Qm na estabilidade térmica dos arcabouços. Para isso, foram traçadas duas isopletras, no termograma, nas temperaturas de 75°C e 275°C, a fim de verificar os valores de perda massa, em porcentagem, dos arcabouços nestas temperaturas, os quais estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de perda de massa, em porcentagem, nas temperaturas de 75°C e 275°C

Arcabouços	Temperatura	
	75°C	275°C
Colágeno	7,5	18,1
9% Qm	8,3	20,0
17% Qm	8,9	20,5
23% Qm	8,5	21,3
33% Qm	8,2	22,2
41% Qm	7,4	22,5

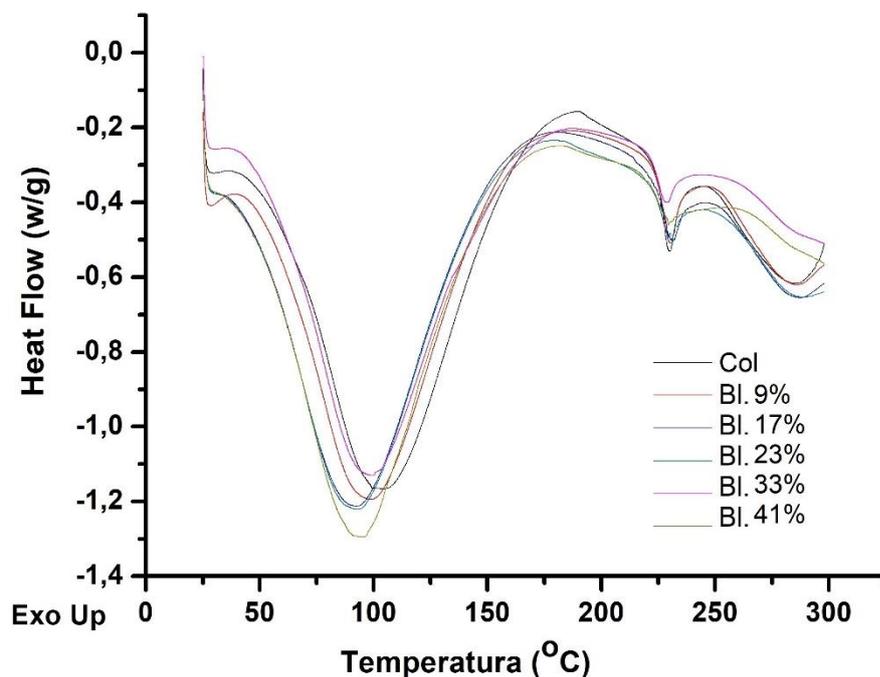
É possível observar que na primeira etapa de perda de massa, próximo a 75°C, praticamente não houve variação nestes valores quando comparado os

arcabouços com Qm, em relação ao arcabouço de colágeno. Por outro lado, em relação a segunda etapa de perda de massa, próximo a 275°C, os arcabouços com a presença de Qm mostraram um pequeno aumento nestes valores, quando comparado ao arcabouço de colágeno puro. Uma possível explicação para este comportamento, após a adição de Qm à matriz de colágeno, se deve ao fato da Qm apresentar moléculas de ácido hialurônico ligadas a sua estrutura, as quais se degradam próximo a 275°C. Portanto, isso justifica a maior perda de massa para os arcabouços com Qm do que o arcabouço apenas com colágeno [104].

5.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 33 ilustra as curvas de DSC para os arcabouços de colágeno e colágeno-Qm.

Figura 33: Curva de DSC para o arcabouço de colágeno e os arcabouços das blendas colágeno-Qm



O arcabouço de colágeno apresentou três eventos endotérmicos e um evento exotérmico. O primeiro evento, próximo a 35°C, está relacionado à transição vítrea de uma fração desordenada de colágeno, sendo originada pela desnaturação parcial do biopolímero durante o processo de mistura para a obtenção da blanda. O

segundo evento, localizado em 103°C, está relacionado a perda de água do material. O terceiro evento, localizado em 230°C, está relacionado desnaturalização das cadeias das moléculas do colágeno [105]. E por fim, o evento exotérmico observado para o arcabouço de colágeno, próximo a 280°C, está relacionado apenas ao início da formação de um pico exotérmico, o qual é atribuído a combustão das fibras do colágeno. Porém, como o ensaio foi realizado até 300°C, não foi possível observar a formação completa desse pico. [106]

Assim como o arcabouço de colágeno, os arcabouços com Qm também apresentaram 3 eventos endotérmicos e um evento exotérmico, os quais são semelhantes ao discutido para o arcabouço de colágeno.

Além disso, foi possível observar na Figura 33 que a presença de Qm no arcabouço, reduz a temperatura do primeiro evento, deslocando o pico para temperaturas menores, quando comparado com o arcabouço de colágeno. Uma possível explicação para este deslocamento se deve à modificação química da quitosana com AH, conforme visto anteriormente, a qual reduz a intensidade de interação entre as moléculas de água e as moléculas de Qm. Por outro lado, a presença de Qm no arcabouço não causou deslocamento da temperatura de desnaturalização das cadeias do colágeno, uma vez que este processo está relacionado com a perda das ligações de hidrogênio, fazendo com que a estrutura terciária do colágeno seja perdida.

Outra observação importante a ser feita na Figura 33 está relacionada a presença de uma ou mais temperatura de transição vítrea (T_g) na blenda, uma vez que isto é um indicativo da interação entre seus componentes. Neste caso, a Figura 33 mostra indícios da presença de uma única (T_g), ou seja, indicando que a blenda obtida é miscível. O estudo realizado por Lewandowska e colaboradores [107] corrobora com este resultado, mostrando que a quitosana e o colágeno apresentam excelente miscibilidade.

6 CONCLUSÃO

Os espectros de FTIR mostraram que a modificação da quitosana com o AH, o qual se ligou nos grupos reativos -NH₂ e -OH, presentes ao longo da estrutura da quitosana, foi realizado com sucesso. Além do FTIR, o teste de solubilidade corroborou para comprovar a modificação química da quitosana, uma vez que a quitosana modificada apresentou solubilidade aproximadamente 4 vezes maior que a quitosana pura. Os espectros de FTIR das blendas de colágeno com Qm mostraram que os mesmos interagem fisicamente entre eles, o que pode ser verificado através dos deslocamentos das bandas do colágeno de 3280 cm⁻¹ para 3300 cm⁻¹.

Os termogramas a partir de TGA revelaram três eventos térmicos na Qm, os quais foram alterados em relação à Qp: o primeiro foi deslocado para intervalos de temperatura maiores, o que pode ser explicado pela presença do AH ligado a quitosana, aumentando a interação com as moléculas de água. Nos outros dois foi verificado uma diminuição das temperaturas de início de degradação em relação a Qp, o que pode estar relacionado com a diminuição das forças intermoleculares ao longo da cadeia da quitosana. As análises de TGA indicaram que não houve mudanças significativas nos valores de perda de massa do arcabouço das blendas em relação ao colágeno puro.

O DSC da Qm apontou a presença de dois picos endotérmicos referentes a perda de água sendo o primeiro mais fracamente ligado ao AH na Qm, o segundo tendo interação mais intensa como reportado no TGA, onde os grupos carboxílicos do mesmo são responsáveis pela interação. Um terceiro pico exotérmico foi detectado ainda, sendo atribuído a organização das moléculas da Qm antes de ocorrer sua degradação.

A microscopia eletrônica de varredura revelou que as morfologia dos arcabouços das blendas, obtidos por liofilização, é porosa e dependente da concentração de Qm adicionada na blenda, sendo que a maior porosidade foi obtida para concentrações inferiores a 23% de Qm.

Os ensaios de intumescimento mostraram que a adição de Qm ao colágeno diminui o valor da taxa de absorção de PBS nos arcabouços, exceto para a blenda com 9% Qm, podendo ser explicada pela morfologia menos porosa e mais compacta

para concentrações maiores de Qm, dificultando a entrada de líquido para o interior do arcabouço.

Diante do exposto nota-se que foi possível realizar as modificações químicas na quitosana de forma a compor uma blenda com colágeno, com propriedades únicas, formando um arcabouço poroso com potencial para ser aplicado como curativo cutâneo.

7 SUGESTÕES DE CONTITUIDADE

Estudar os efeitos de novas taxas/temperaturas de congelamento na morfologia e porosidade dos arcabouços;

Realizar estudos a fim verificar o tamanho/distribuição de poros dos arcabouços;

Realizar ensaios in vitro de cultura celular a fim de verificar citotoxicidade.

8 REFERÊNCIAS

- [1] MARINHO, V. A. D.; et al. Aditivação e Biodegradação de Compósitos PHB/ Babaçu. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos (REMAP)**, Vol. 13, Nº 1, 37-41.2018. ISSN 1809-8797.
- [2] OLIVEIRA, Renata Souza; et al. Adsorção de Contaminantes do Biodiesel por Fibras de Bagaço Modificadas na Superfície. **Química Nova**, Vol. 41, Nº 2, 121-128. 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170164>.
- [3] MARINA OC, Sanders CK, Mourant JR. Effects of acetic acid on light scattering from cells. **Journal of Biomedical Optics**. 2012;17(8):085002. doi:10.1117/1.JBO.17.8.085002.
- [4] MORITA T, Kenzo T, Kazuo O. Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. 1990; 240(3):195-202
- [5] ISHII, S,. The use of mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic acid. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2012;76(3):523-9.
- [6] LI X, et al. Acetic Acid Activates the AMP-Activated Protein Kinase Signaling Pathway to Regulate Lipid Metabolism in Bovine Hepatocytes. Zang M, ed. PLoS ONE. 2013;8(7):e67880. doi:10.1371/journal.pone.0067880.
- [7] ARAÚJO, MHHPO; et al. Uso do Ácido Hialurônico e da Película de Biocelulose no Tratamento Tópico de Queimadura. **Rev. Brás Queimaduras**, Vol. 16, Nº 2, 135-138. 2017.
- [8] X NIU; et al. Repair of Bone Defect in Femoral Condyle Using Microencapsulated Chitosan, Nanohydroxyapatite/ Collagen and Poly(L-Lactide) – Based Microsphere-Scaffold Delivery System. **Artificial Organs**, 35 (7).2011. Doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01274.x

- [9] MEDEIROS, Aldo Cunha; FILHO, Irami Araújo; CARVALHO, Marília Daniela Ferreira. Fios de Sutura. **Journal of Surgical Clinical Research**, Natal- RN, Vol. 7, No. 2, 74-86, 2016.
- [10] RATNER, D. Buddy. **An introduction to Materials in Medicine 2º Edição**. Local: San Diego - USA, Elsevier, 2004. Pg 10-12.
- [11] PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andrea C. K.; MORAES, Ângela M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Revista Química Nova**, Campinas, Vol. 38, No. 7, 957-971, 2015. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6262. Acesso em: 24 de set. 2018.
- [12] WILLIAMS, David F. Biomaterials. **Elsevier**, Vol. 30, 5897-5909, 2009.
- [13] BORELLI, Vanessa. **Pesquisa e Desenvolvimento de Biomateriais: Estudo das Inter-Relações Científicas, Tecnológicas e Normativas**. 2011, 83 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicação), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).
- [14] WILLIAMS, D. F. Revising of The Definition of Biocompatibility. **Med Dev Technol**.V.14, 2003.
- [15] RODRIGUES, Luciano Brito. Aplicações de Biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Itapetinga - BA, Vol. 9, No. 8, 63-76, Dez. 2013.
- [16] MORAIS, Liliane Siqueira; GUIMARÃES, Glaucio Serra; ELIAS, Carlos Nelson. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá-PR, Vol. 12, No. 6, 48-53, dez. 2007.
- [17] KAWACHI, Elizabete Y., et al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química nova**, Campinas-SP, Vol.23, No. 4, 2000.
- [18] LACERDA, Kássio André; LAMEIRAS, Fernando Soares; SILVA, Viviane Viana. Avaliação da Biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Química nova**, Vol. 32, No. 5, 1216-1221, 2009.
- [19] PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. **Biomaterials**. Vol.20, 1-25. 1999.

- [20] CANEVAROLO JR., Sebastião V. **Ciências dos polímeros 3º Edição**.Local: São Paulo, Artliber, 2013.Pg 18-24.
- [21] WIEBECK, Hélio; HARADA, Júlio. **Plásticos de engenharia tecnologia e aplicações 1º Edição**.Local: São Paulo, Artliber, 2012. Pg 19-21.
- [22] MIDDLETON, John C.; TIPTON, Arthur J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**. Vol.21, 2335-2346. 2000.
- [23] LUNA, C. B. B.; et al. Desenvolvimento de Blendas Poliméricas Visando a Tenacificação dos Polímeros: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Vol. 31, Nº 1, 67-68. Jan/Jun. 2015.
- [24] COLEMAN, Michael M.; GRAF, John F. ; PAINTER, Paul C. **Specific Interations and Miscibility of Polymer Blends**. Local: Lancaster, Pennsylvania, Technomic Publishing Company, 1991. Pg 1-10.
- [25] SILVA, Raquel Nascimento. **Influência do Teor de Plastificante e da Argila Vermiculita Organolífica no Estudo da Degradação Hidrolítica da Matriz Polimérica de Polihidroxibutirato (PHB)**. 2017, 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Universidade Federal do Piauí – UFPI.
- [26] PAOLI, Marco-Aurélio. Degradação e Estabilização de Polímeros 2ª Versão Online (Revisada), 2008. Pg. 109-111.
- [27] SANTOS, Cayane Genro; et al. Uso de Blendas Poliméricas em Nano e Microencapsulação. **Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, Vol. 16, Nº 2, p. 311-323, 2015. ISSN 2176-462X.
- [28] PORTO, ARIANE SARZI. **Modificação de Blendas de Polipropileno e Politereftalato de Etileno Reciclado com Argilas Organolíficas de diferentes Polaridades**. 2018, 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas.

[29] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2017 [Online]. Disponível em:

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acesso: fev.2019.

[30] KUMAR, Majeti N. V. Ravi. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers** . Vol. 46, 1-27. 2000.

[31] THARANATHAN, RUDRAPATNAM N.; FAROOQAHMED S. Kittur. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potencial. **Food Science and Nutrition**. V. 43, No.1, 61-87. 2003

[32] MATHUR, Nawal K.; NARANG, Chander K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**. Vol. 67, No. 11. Nov. 1990.

[33] LIMA, Ilauro S.; RIBEIRO, Emerson S.; AIROLD, Claudio. O Emprego de Quitosana Quimicamente Modificada com Anidrido Succínico na Adsorção de Azul de Metileno. **Quim. Nova**, V. 29, Nº3, 501-506, 2006.

[34] MACÊDO, M. O. C.; et al. Estudo Comparativo da Modificação Superficial de Membranas de Quitosana Tratadas por Plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. **REMAP**, V. 7, Nº2, 95-103, 2012. ISSN 1809- 8797.

[35] ARAÚJO, Vânia Ribeiro. **Aplicação de Revestimento Comestível a Base de Quitosana em Brócolis Minimamente Processado**. 2015, 35 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos), Universidade Tecnológica do Paraná, Campus: Campo Mourão.

[36] RINAUDO, Marguerite. Chitin and Chitosan: Properties and Application. **Prog. Polym. Sci**. Vol. 31, 603-632. 2006.

[37] SENEL, Sevda; MCCLURE, Susan J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**. Vol. 56, 1467-1480. 2004.

- [38] KUMBAR, Sangamesh G.; SOPPIMATH, Kumaresh S.; AMINABHAVI, Tejraj M. Synthesis and characterization of polyacrylamide-Grafted Chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin. **Journal of applied Polymer Science**. Vol. 87, 1525-1536. 2003.
- [39] AZEVEDO, V. V. C., et al. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. Vol. 2, No.3, 27-34. 2007.
- [40] H. UENO; et al. Chitosan Accelerates the Production of Osteopontin from Polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**, V. 22, 1667-1673, 2001.
- [41] LARANJEIRA, Mauro C. M.; FÁVERE, Valfredo T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 672-678. 2009.
- [42] CHANDA, Amit, et al. Electrospun Chitosan/ Polycaprolactone-Hyaluronic Acid Bilayered Scaffold for Potential Wound Healing Applications. **Biological Macromolecules**. 2018.Doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099.
- [43] NASCIMENTO, Mônica Helena Monteiro; LOMBELLO Christiane Bertachini. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Revista Polímeros**, Vol. 26, No. 4. Dez. 2016.
- [44] BOERIU, Carmen G.; et al. Production Methods of Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**. Pg 14, 2013.
- [45] ROSA, Claudia Severo, et al. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, Vol. 38, No. 9, 2593-2598. Dez. 2008.
- [46] PAN, Nicole Caldas; et al. Ácido Hialurônico: Características, produção microbiana e aplicações industriais. **Biochemistry and biotechnology reports**. Vol. 2, No. 4, Pg. 45-58. 2013.
- [47] KOGAN, Grigorij; et al. Hyaluronic Acid: a natural biopolymer with broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnol Lett**, Vol. 29, 17-25. 2007.
- [48] AGOSTINI, T.; SILVA, D. Ácido hialurônico: princípio ativo de produtos cosméticos. Santa Catarina, 2010.

Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Tatiane%20Agostini.pdf>. Acesso em: fev./2019.

[49] JEONG, Seol-Ha; et al. Effective Wound Healing by Antibacterial and Bioactive Calcium – Fluoride – Containing Composite Hydrogel Dressings Prepared Using in Situ Precipitation. **ACS Biomater. Sci. Eng.**, p. 1-38, 12 maio/2018. DOI: 10.1021/acsbomaterials.8b00198.

[50] CAMERINO, TA. et al. Uso do Ácido Hialurônico para o Rejuvenescimento da Região dos Lábios: Relato de Caso. **RvAcBO**, Vol. 8, Nº 2, p. 36-41, 2018. ISSN 2316-7262.

[51] PAPAZIAN, Marta Fernandes; et al. Principais Aspectos dos Preenchedores Faciais. **Revista Faipe**, V. 8, Nº 1, P. 101-116, Jan/Jun. 2018. ISSN 2179-9660.

[52] FIGUEIRÊDO, Eugênio Santana; et al. Aplicações Oftalmológicas do ácido Hialurônico. **Arq. Bras. Oftalmol.**, Vol.73, No. 1, 92-95. 2010.

[53] CARPIO, Klaramelia Consuelo Ramón. **Extração e Caracterização de Colágeno da Pele de Pirarucu**. 2018, 58 f. Dissertação (Ciências Pesqueiras nos Trópicos), Universidade Federal do Amazonas.

[54] PRESTES, Rosa Cristina. Colágeno e seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, Vol.15, Nº 1, 65-74, 2013.

[55] LEE, Chi H.; SINGLA, Anuj; LEE, Yugyung. Biomedical Applications of Collagen. **International journal of pharmaceutics**, Vol. 221, 1-22. 2001.

[56] CRUSCA, J. S.; et al. Avaliação citotóxica de esponja de colágeno e quitosana. **Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**. 2014.

[57] CHEN, J.; et al., Release Kinetics of Tilapia Scale Collagen I Peptides During Tryptic hydrolysis, Food Hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, 2017. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.11.040.

- [58] ELLIOTT, G. F.; LOWY J. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, Vol. 219, jul. 1968.
- [59] GARDIM, Roberta Bezerra. **Análise da Viabilidade de Obtenção de um Biofilme a Partir do Colágeno de Frango**. 2018, 85 f. Dissertação (Engenharia de Produção), Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo
- [60] LEE, Jong Eun; et al. Effects of controlled released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen / chitosan / Glycosaminoglycan scaffold. **Biomaterials**, Vol. 25, 4163 - 4173. 2004.
- [61] STENZEL, Kurt H.; MIYATA, Teruo; RUBIN, Albert L. **Annu. Rev. Biophys. Bioeng**, Vol.3, 231-253. 1974.
- [62] ALINA, Sionkowska. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review, **Prog. Polym. Sci.** 36 (2011) 1254–1276.
- [63] NAKASHIMA, Misako. Bone morphogenetic protein in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Vol. 16, 369–376, 2005. Doi:10.1016/j.cytogfr.2005.02.011.
- [64] M. C. S., Fernandes; et al. Desenvolvimento de Arcabouços de Óxido de Titânio e Biosilicato para Regeneração Óssea. **Cerâmica**, Vol. 63, 263-270, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0366-69132017633662083>.
- [65] S. NUERNBEGER; et al. The influence of Scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix – associated chondrocyte transplatation grafts. **Biomaterials**, Vol. 32, 1032-1040, 2011.
- [66] VOLKMER; et al. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of bone. **Tissue Engineering**, V. 14, Nº 8, 1-10, 2008. DOI: 10.1089/ten.tea.2007.0231.
- [67] N. G. GENES; et al. Effect of Substrate Mechanics on Chondrocyte Adhesion to Modified Alginate Surfaces. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, V. 422, 161-167, 2004.

[68] 14^a Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO, 20-24 de Agosto de 2017 MARESIAS – SP, Brasil. **Scaffolds de Colágeno/ Elastina/ Resina de Jatobá: Obtenção e Caracterização.**

[69] D. PUPPI, et al. Polymeric Materials for bone Cartilage Repair. **Progress in polymer science**, V. 35, 403-440, 2010.

[70] ZENG, SHUGUANG, et al. Characterization of Silk Fibroin/ Chitosan 3D Porous Scaffold and in vitro Cytology. **PLOS ONE**, V.10, Nº. 6, 2015. DOI: 0.1371/journal.pone.0128658.

[71] SANTOS, B. P.; et al. Associação de Células Tronco Mesenquimais com Scaffold de Colágeno para Indução Condrogênica. **PECIBES**, V. 1, 13-20, 2015.

[72] MACEDO, Maria Erisfagna Ribeiro. **Arcabouços 3D (Scaffolds) à Base de Poli(hidroxiбутирато), Quitosana e Fibroína da Seda para Engenharia Tecidual.** 2017, 66 f. Dissertação (Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - SE.

[73] CRUZ, Jackson Borba, et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. **Revista Matéria**, V.21, Nº1, 129-140, 2016. ISSN 1517-7076.

[74] ZIA, Khalid Mahmood; et al. Synthesis and Molecular Characterization of Chitosan based Polyurethane elastomers using Aromatic Diisocyanate. **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 66, 26-32, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.073>.

[75] NEETHU, Mohan; et al. Chitosan-Hyaluronic Acid Hydrogel for Cartilage Repair. **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 104, 1936-1945, 2017.
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.142>

[76] TANGSADTHAKUN, Chalonglarp; et al. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, V. 16, No 1, 37-44, 2006.

[77] MARTINS, Cláudia Rocha; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson Bittencourt. Solubilidade das Substâncias Orgânicas. **Quim. Nova**, V. 36, Nº8, 1248-1255, 2013.

[78] RABIEE, Ahmad; et al. Fabrication and Characterization of Hydrothermal Cross-Linked Chitosan Porous Scaffolds for cartilage Tissue Engineering Applications. **Materials Science and Engineering**, 2017. Doi: 10.1016/j.msec.2017.03.194.

[79] KARRI, Veera Venkata Satyanarayana Reddy; et al. Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticles Impregnated into Collagen-Alginate Scaffolds for Diabetic Wound Healing. **Biological Macromolecules**, 2016.
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.038>.

[80] 18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes. “A prática interdisciplinar alimentando a ciência”. 24 a 28 de outubro de 2016, Universidade de Tiradentes, Aracaju - SE. **Desenvolvimento de Blendas Poliméricas Superabsorventes Biodegradáveis**.

[81] ARAÚJO, P. B., et al. Matrizes de Quitosana/Gelatina para liberação de Etonogestrel. **REMAP**, V.12, Nº2, 138-145, 2017. ISSN 1809-8797.

[82] MONTEIRO Jr., Oyrton Azevedo de Castro. **Preparação, Modificação Química e Calorimetria do Biopolímero Quitosana**. 1999. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

[83] SILVA, Ivana IBQ Cristina Peñuelas Silva. **Producción y Caracterización de Ácido Hialurónico por Cultivo Sumergido de Streptococcus Equi Subsp. Zooepidemicus**. 2016, 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Autónoma Metropolitana, campus: iztapalapa, cidade do México.

- [84] REDDY, K. Jagadeeswara; KARUNAKARAM, K. T. Purification and Characterization of Hyaluronic Acid Produced by Streptococcus Zooepidemicus Strain 3523-7. **J. BioSci.Biotech**, V.2, Nº3, 173-179, 2013. ISSN: 1314-6246.
- [85] KOSHELEVA, Ramonna; MITROPOULOS, Athanasios C.; KYZAS, George Z. Effect of Grafting on Chitosan Adsorbents. **Composite Nanoadsorbents**, 49-66, 2019.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814132-8.00003-4>.
- [86] ERENCIA, MARISA, et al. Electrospinning of gelatin fibers using Solutions with low Acetic Acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun and Cytotoxicity. **J. Appl. Polym. Sci.**, 2015. DOI: 10.1002/APP.42115.
- [87] PILLAI, C. K. S.; et al. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. **Progress in Polymer Science**, V.34, 641-678, 2009. Doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001
- [88] QIN, Caiqin, et al. Water Solubility of Chitosan and its Antimicrobial Activity. **Carbohydrate Polymers**, V.63, 367-374, 2006. Doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
- [89] FRICK, Julia Menegotto, et al. Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-Treatment on the Properties of Chitosan-Based Films. **Journal of Polymers and the Environment**, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1166-3>.
- [90] COLLINS, Maurice N.; BIRKINSHAW, Collin. Physical Properties of Crosslinked Hyaluronic Acid Hydrogels. **J. Mater. Sci: Mater. Med.**, V.19, 3335-3343, 2008. DOI 10.1007/s10856-008-3476-4.
- [91] NASCIMENTO, Mônica Helena Monteiro, et al. Evaluation of Cell Interaction with Polymeric Biomaterials Based on Hyaluronic Acid and Chitosan. **J. Mater. Sci: Mater. Med.**, 2017. DOI 10.1007/s10856-017-5875-x.

- [92] Tan, Dominique Jan B.; PAJARITO, Bryan B. Effect of Particle Size and Chitosan Loading on Post-Combustion Carbon Dioxide Capture of Chitosan-Coated Natural Zeolite Adsorbent. **Materials Science Forum**, V.917, 185-189, 2018. Doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.917.185.
- [93] MADELEINE-PERDRILLAT, C., et al. Effect of hydration on molecular dynamics and structure in chitosan films. **Food Hydrocolloids**, V.61, 57–65, 2016. Doi:10.1016/j.foodhyd.2016.04.035.
- [94] NETO, C. G. T. ; et al. Thermal Analyses of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, V.62, 97-103, 2005. Doi:10.1016/j.carbpol.2005.02.022.
- [95] ALVES, Admir Sendy Santos, et al. Extração e Caracterização do Pó de Colágeno Obtido a Partir de Resíduos (Pele e Nadadeiras) de Tilápia. **Revista Saúde e Ciência Online**, V.7, Nº2, 502 p., 2018. ISSN 2317-8469.
- [96] ANIRUDHAN, T. S. ; NAIR, Syam S. ; NAIR, Anoop S. Fabrication of Bioadhesive Transdermal Device from Chitosan and Hyaluronic Acid for the Controlled Release of Lidocaine. **Carbohydrate Polymers**, 2016. Doi :<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.101>.
- [97] MENAKER, G. M. Wound Dressings at the Turn of Millennium. **Currenty Problems in Dermatology**, 86-89, 2001.
- [98] HSIEH, Wen-Chuan ; CHANG, Chih-Pong ; LIN, Shang-Ming. Morphology and Characterization of 3D Micro-Porous Structured Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. **Colloids and Surfaces**, V. 57, 250-255, 2007. Doi:10.1016/j.colsurfb.2007.02.004.
- [99] RAFAT, Mehrdad, et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, V.29, 3960-3972, 2008. Doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.017.

[100] N. GOROCHOVCEVA, et al. Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) brush copolymers: Synthesis and adsorption on Silica Surface. **European Polymer Journal**, V.41, 2653-2662, 2005.

doi:10.1016/j.eurpolymj.2005.05.021.

[101] ALVES, Keyla Santos. **Obtenção de Polímeros Graftizados de Quitosana e Estudo das Propriedades Físico-Químicas para Aplicação na Indústria do Petróleo**. 2013. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

[102] HILPERT, Markus ; MILLER, Cass T. Pore-Morphology-Based Simulation of Drainage in Totally Wetting Porous Media. **Advances in Water Resources**, V.24, 243-255, 2001.

[103] N. SHANMUGASUNDARAM, et al. Collagen-Chitosan Polymeric Scaffolds for the in vitro Culture of Human Epidermoid Carcinoma Cells. **Biomaterials**, V.22, 1943-1951, 2001.

[104] SI, Leilei; et al. Thermal Degradation Behavior of Collagen from Sea Cucumber (Sthichopus Japonicus) using TG-FTIR analysis. **Thermochemica Acta**, V.659, 166-171, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2017.12.004>.

[105] SARTI, B., Scandola, M. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly (vinyl alcohol) blends. **Biomaterials**, V.16 785–792, 1995.

Doi:10.1016/0142-9612(95)99641-x

[106] MANCILLA, B. H. León, et al. Physico-Chemical Characterization of Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. **Journal of Applied Research and Technology**, V.14, 77-85, 2016.

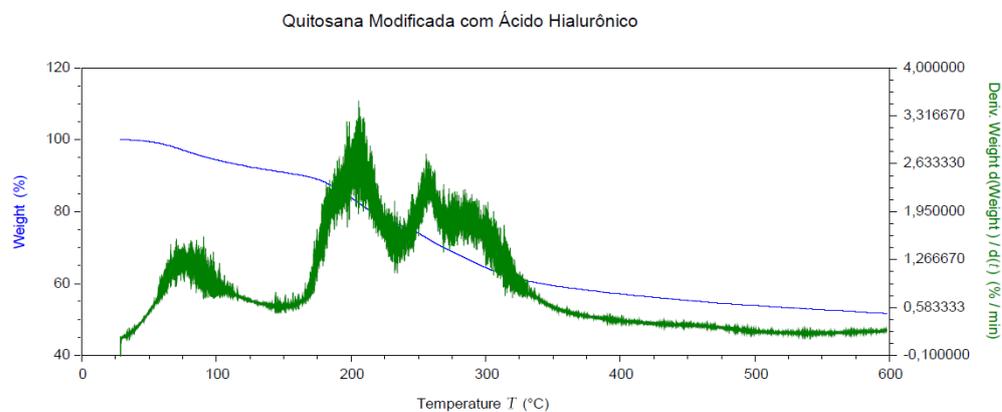
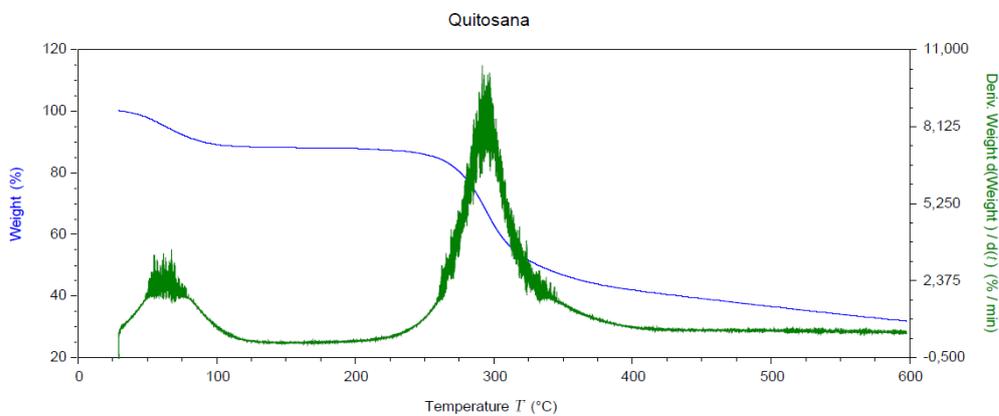
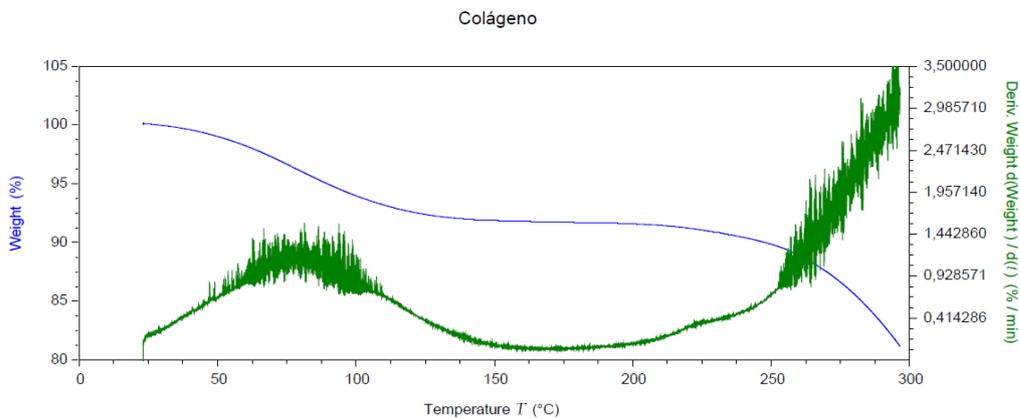
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>.

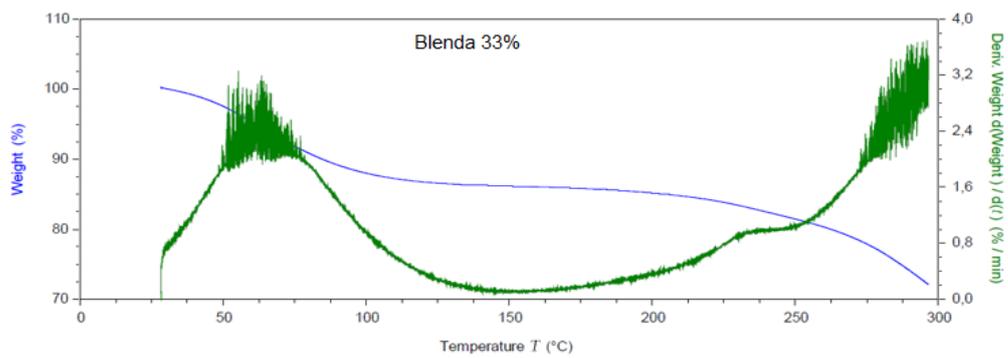
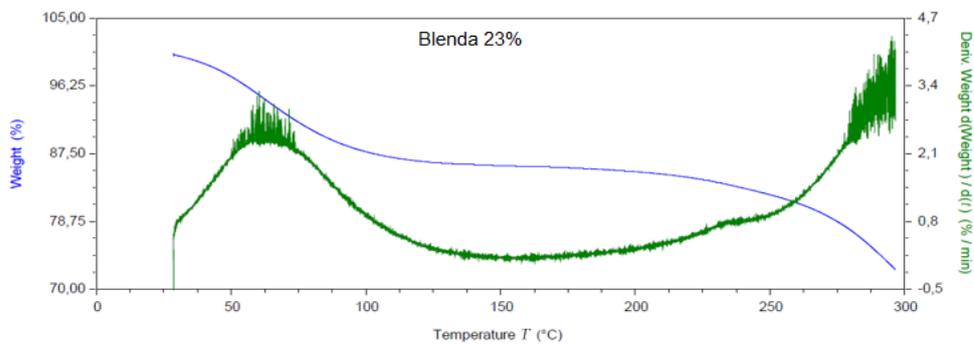
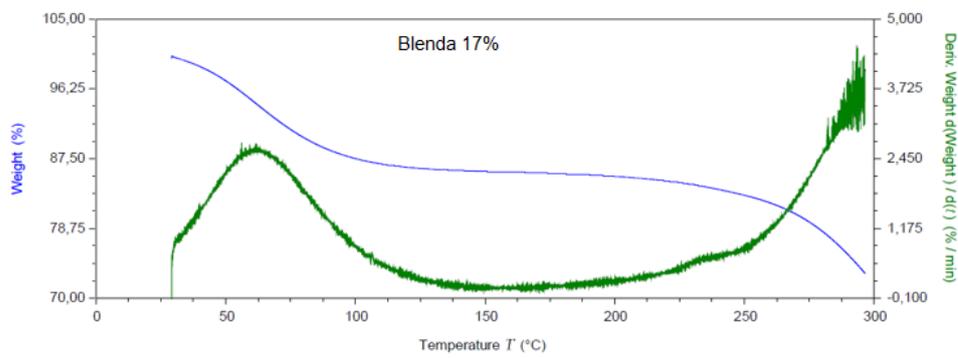
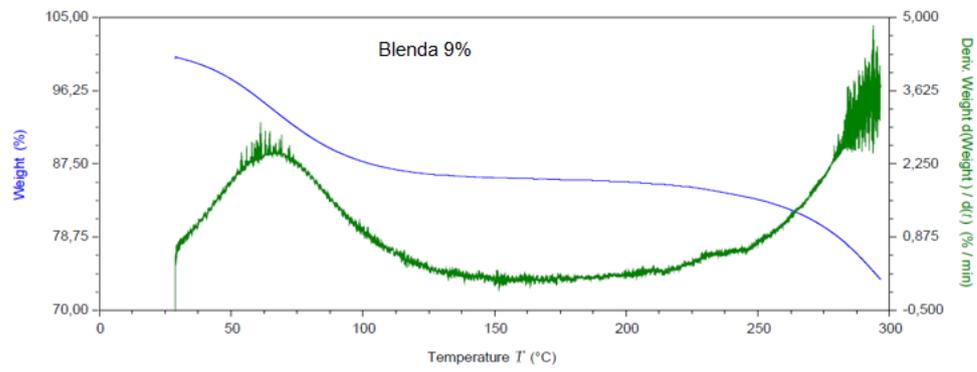
[107] LEWANDOWSKA K, et al. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids. **Journal of Molecular Liquids**, V. 220, 726–730, 2016.

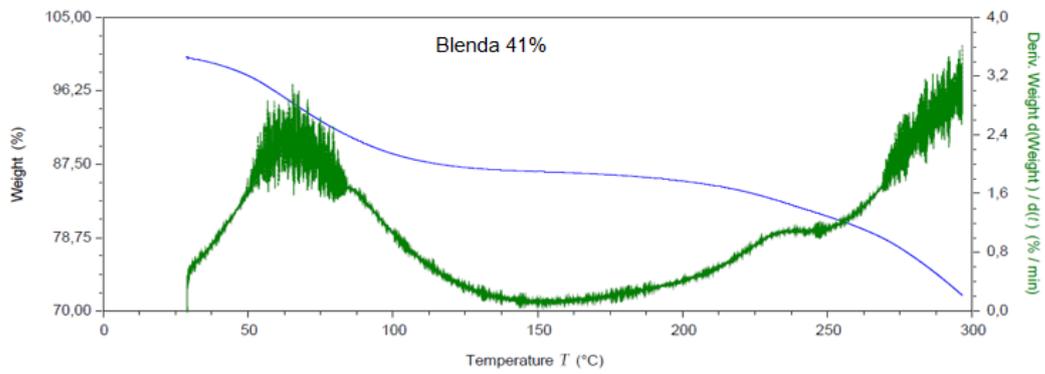
Doi:10.1016/j.molliq.2016.05.009.

ANEXOS

ANEXO A: TERMOGRAMAS DERIVADA (DTG)

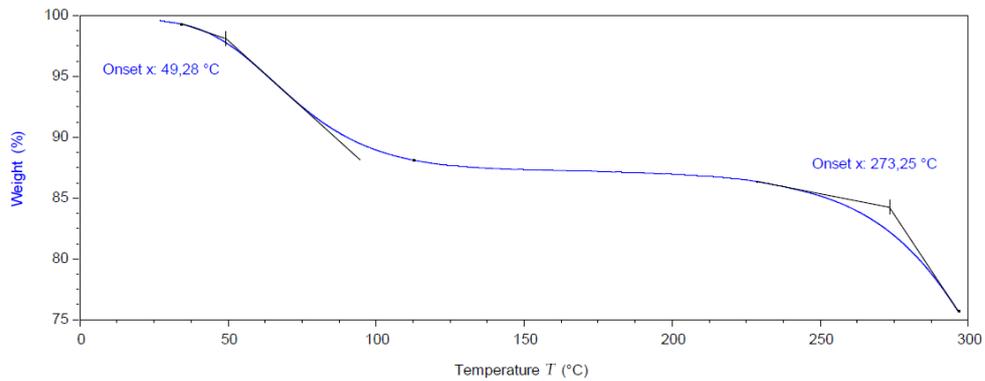




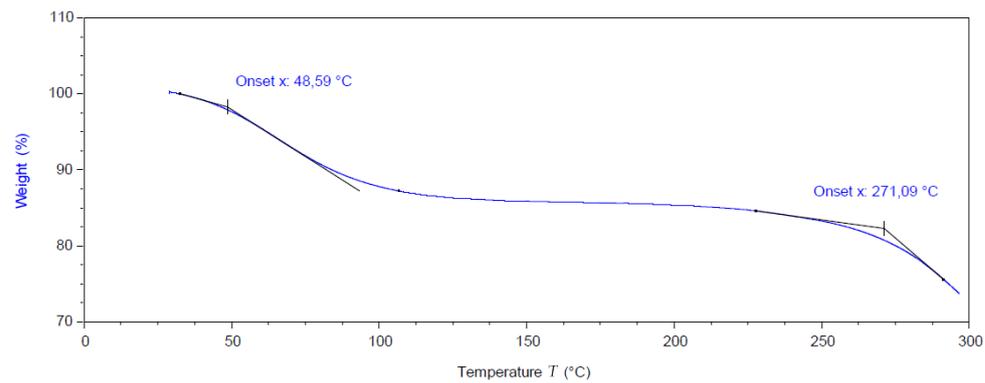


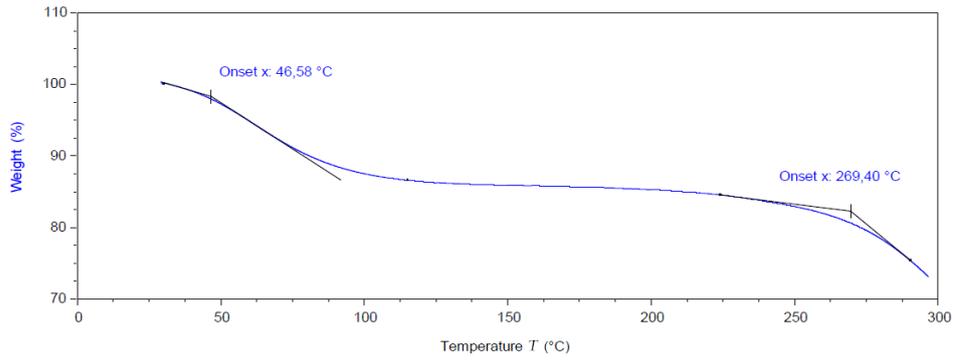
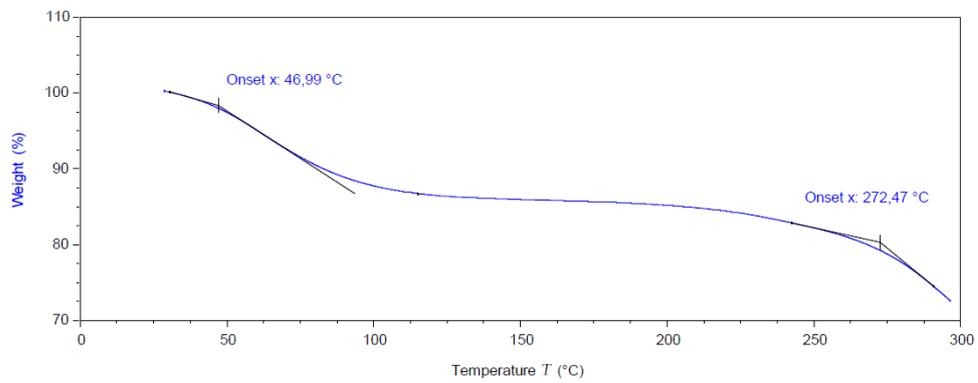
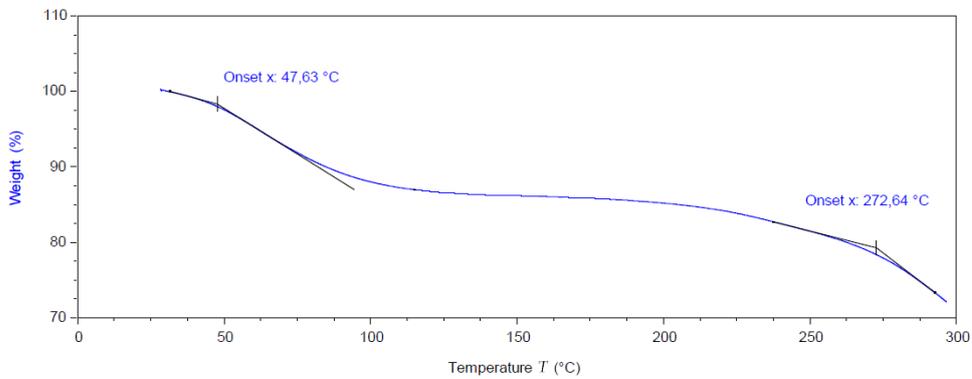
TERMOGRAMAS COM VALORES DE T_{onset}

Colágeno



Blenda 9%



Blenda 17%**Blenda 23%****Blenda 33%****Blenda 41%**