

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**OBTENÇÃO DE QUITOSANA RETICULADA POR PROCESSAMENTO
TERMOMECÂNICO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Maria Conceição Ramos da Soledade Bezerra Silva

São Carlos-SP

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**OBTENÇÃO DE QUITOSANA RETICULADA POR PROCESSAMENTO
TERMOMECÂNICO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Maria Conceição Ramos da Soledade Bezerra Silva

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia
de Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientadora: Dra. Alessandra de Almeida Lucas

São Carlos-SP
2022

DEDICATÓRIA

À minha madrinha Rosilda Maria Pompílio de Melo (*in memoriam*), à minha mãe Josefa Ramos da Soledade, meu marido Rodrigo José Ferreira da Silva e minha filha Alice Soledade Silva sem os quais este trabalho não teria sido possível.

VITAE DO CANDIDATO

Bacharel em Química Industrial pela Universidade Federal de Pernambuco (2017), Mestre em Ciência de Materiais pela Universidade Federal de Pernambuco (2011), Bacharel em Química pela Universidade Federal de Pernambuco (2008)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Maria Conceição Ramos da Soledade Bezerra Silva, realizada em 11/05/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Alessandra de Almeida Lucas (UFSCar)

Profa. Dra. Sílvia Helena Prado Bettini (UFSCar)

Prof. Dr. Juliano Marini (UFSCar)

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo (USP)

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira (UFLA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que possibilitou a execução desta pesquisa, a publicação do primeiro artigo desta tese e a escrita da tese de doutorado, me orientando, dando ânimo e coragem nos momentos de desânimo e por ter permitido que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha família que tanto me deram suporte emocional e ajudaram em todas as dificuldades. Minha mãe Josefa Ramos que foi meu braço forte nas questões domésticas e emocionais, meu marido Rodrigo que tanto me apoiou e incentivou especialmente nas questões acadêmicas com as disciplinas, discussões sobre pesquisa científica e publicações, entre tantas outras coisas, minha doce filha Alice que nos momentos mais difíceis sempre me confortava com palavras carinhosas além de sua alegria constante e à minha madrinha Rosilda Pompílio que tanto incentivou e possibilitou minha formação escolar e que sempre vibrou com minhas conquistas profissionais e acadêmicas (*in memoriam*).

Agradeço a Professora Alessandra de Almeida Lucas por ter aceitado me orientar no tema proposto, agradeço especialmente por toda ajuda e compreensão com relação às questões burocráticas e documentações exigidas pela UFPB para manutenção do meu afastamento além do auxílio em desafios inerentes ao doutorado.

Agradeço a irmandade da Igreja de Cristo em São Carlos, Recife e João Pessoa que tanto me auxiliaram em oração e palavras de incentivo.

Agradeço a todos os professores do PPGCEM que, sem exceção, contribuíram para a consolidação do conhecimento necessário para que esta tese fosse possível. De semelhante forma agradeço aos técnicos e terceirizados do DEMA e da UFSCar que auxiliaram tecnicamente durante a execução deste projeto, em especial a Marcelo Cavallaro pela presteza e cordialidade inerentes a ele.

Agradeço aos colegas da Polímeros que também auxiliaram em questões técnicas e mesmo com conversas de acordo com a experiência de cada um. Agradeço em especial ao amigo Gustavo Duarte pela parceria que possibilitou aprendizado ao trocar experiências e ideias cada um em sua área de

conhecimento. Menciono em especial a ajuda e amizade de Talita, Carmen e Daniele Ávila.

Agradeço aos seguintes professores com testes essenciais a este trabalho: Professora Sílvia Bettini por gentilmente permitir utilizar o espectrômetro de FTIR e ter aceito que eu participasse da disciplina Polímeros Biodegradáveis como aluna ouvinte; Professora Eliana Rigo pelos testes de atividade antibacteriana, por fornecer o cloridrato de tetraciclina, fármaco utilizado no ensaio de perfil de liberação de fármaco e por ter me aceitado como aluna especial na disciplina Materiais para Aplicação em Bioengenharia (EESC – USP) e por toda as alegres e produtivas conversas sobre o universo dos biomateriais.

Agradeço à minha instituição de origem, a Universidade Federal da Paraíba, o Departamento de Engenharia Química e a Professora Julice Dutra por conceder a liberação para o doutorado e à Universidade Federal de Pernambuco pela formação que me abriu o olhar e o amor à ciência, em especial à Professora Simone Gonçalves por transmitir tanto conhecimento e experiência em laboratório sempre com muita alegria.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e ao Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar pela infraestrutura necessária para execução desta pesquisa de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A baixa processabilidade da quitosana e a obtenção de materiais com baixa estabilidade estrutural constituem fortes limitações ao amplo uso da quitosana especialmente em aplicações biomédicas. Ademais a necessidade de neutralização da quitosana como biomaterial aumenta a fragilidade inerente desses materiais. Desta forma, esta tese foi desenvolvida visando a obtenção de materiais à base de quitosana com integridade estrutural no estado intumescido e propriedades mecânicas e físico químicas adequadas utilizando-se uma rota de processamento termomecânico. Para tanto uma estratégia de reticulação química com ácido cítrico foi adotada. O ácido cítrico (AC), em três concentrações diferentes, foi avaliado como agente desestruturante e agente reticulante e comparado ao material tradicionalmente processado com ácido acético. A estrutura química, capacidade de desestruturação do pó de quitosana, morfologia, propriedades físico-químicas e mecânicas indicaram a ocorrência de reticulação química, diminuição da cristalinidade, e que as propriedades físico-químicas e mecânicas aumentaram com o aumento do teor de AC. A análise morfológica indicou estruturas inéditas que foram relacionadas às propriedades mecânicas do material reticulado. Além disso, foi proposta uma rota de neutralização em meio tamponado minimizando-se possíveis reações de hidrólise em meios fortemente alcalinos. O glicerol foi reincorporado aos materiais por imersão e verificou-se que o teor absorvido é proporcional ao tempo de imersão. A flexibilidade dos materiais foi recuperada sem prejuízos na resistência mecânica e a capacidade de retenção de exsudatos foi definida para aplicação como coberturas em feridas moderadamente exsudativas. O perfil de liberação de fármaco apresentou uma capacidade de liberação controlada durante 8 dias durante o ensaio *in vitro* para o cloridrato de tetraciclina. Os resultados sugerem que um biomaterial à base de quitosana pode ser obtido pelo processamento termomecânico com estabilidade estrutural no estado intumescido e que a estratégia de neutralização e replastificação foram eficazes para prover materiais com propriedades semelhantes à dos materiais originais.

Palavras-chave: Quitosana; Ácido Cítrico; Processamento Termomecânico; Morfologia; Biomaterial.

ABSTRACT

**OBTAINING CROSS-LINKED CHITOSAN BY THERMOMECHANICAL
PROCESSING FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

The low processability of chitosan and the obtaining of materials with low structural stability constitute substantial limitations to the commercial use of chitosan, especially in biomedical applications. Furthermore, the need to neutralize chitosan as a biomaterial increases the inherent fragility of these materials. Thus, this thesis was developed to obtain chitosan-based materials with structural integrity in the swollen state and advantageous mechanical and physicochemical properties using a thermomechanical processing route. For this, the chemical crosslinking strategy with citric acid was adopted. The citric acid (CA), in three different concentrations, was evaluated as a destructuring agent and crosslinking agent and compared to material traditionally processed with acetic acid. The chemical structure, the destructuring capacity of chitosan powder, morphology, and physicochemical and mechanical properties indicated the occurrence of chemical crosslinking, decreased crystallinity, and increased physicochemical and mechanical properties with increasing CA content. Morphological analysis revealed never-before-seen structures related to the crosslinked material's mechanical properties. In addition, a neutralization route in a buffered medium was proposed, minimizing possible hydrolysis reactions in strongly alkaline media. The glycerol was reincorporated into the materials by immersion, and it was found that the absorbed content is proportional to the immersion time. The flexibility of the materials was recovered without damage to the mechanical strength, and the exudate retention capacity was defined for application as dressings in moderately exuding wounds. The drug release profile showed a controlled release capacity for eight days during the in vitro assay for tetracycline hydrochloride. The results suggest that a chitosan-based biomaterial can be obtained by thermomechanical processing with structural stability in the swollen state and that the neutralization and plasticization strategies effectively provide properties similar to the original materials.

Keywords: Chitosan; Citric Acid; Thermomechanical Processing; Morphology; Biomaterial.

PUBLICAÇÕES

- MARIA C. BEZERRA; GUSTAVO A. DUARTE; ISAAC S. TALABI; ALESSANDRA A. LUCAS. Microstructure and properties of thermomechanically processed chitosan citrate-based materials. *Carbohydrate Polymers*. p. 118984, 278, 2022.
- GUSTAVO A. DUARTE; MARIA C. BEZERRA; SÍLVIA H.P. BETTINI; ALESSANDRA A. LUCAS. Real-time monitoring of starch cross-linking with citric acid by chemorheological analysis. *Carbohydrate Polymers*, 2022 *In*: submetido.
- MARIA C. BEZERRA; GUSTAVO A. DUARTE; SÍLVIA H. P. BETTINI; ALESSANDRA A. LUCAS. Monitoring the rheological and mechanical stabilization of thermomechanically processed chitosan. *In*: processo de elaboração.
- BEZERRA, M.C.; DUARTE, G. A.; LUCAS, A.A. Strategy for neutralizing chitosan-based materials in post-processing, achieving biomaterial with adjustable mechanical properties. *In*: processo de elaboração.
- BEZERRA, M.C.; DUARTE, G. A.; LUCAS, A.A. Thermomechanically processed chitosan-Ag nanocomposites for biomedical applications. *In*: a ser escrito.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos gerais	3
1.2 Objetivos específicos	3
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA	5
2.2 Quitosana.....	6
2.2.1 Aspectos gerais.....	6
2.2.2 Processamento termomecânico.....	11
2.2.3 Comportamento mecânico da quitosana.....	22
2.3 Mecanismo de falha mecânica em materiais poliméricos	24
2.4 Propriedades Biológicas da Quitosana	29
2.4.1 Aplicações biomédicas da quitosana	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Materiais.....	39
3.2 Métodos	39
3.2.1 Parte 1: Obtenção de Placas de Quitosanas Reticuladas com ácido cítrico por Processamento Termomecânico.....	41
3.2.2 Parte 2: Neutralização do material selecionado na etapa 1 e recuperação do glicerol.....	43
3.3 Técnicas de caracterização.....	44
3.3.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	44

3.3.2	Difratometria de Raios-x (DRX).....	44
3.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.3.4	Propriedades mecânica sob tração.....	47
3.3.5	Propriedades físicas e físico-químicas.....	47
3.3.6	Análise termogravimétrica.....	49
3.3.7	Degradação <i>in vitro</i>	49
3.3.8	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	50
3.3.9	Ensaio de incorporação e liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina (CT) <i>in vitro</i>	53
3.3.10	Atividade antimicrobiana.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Obtenção da quitosana modificada com ácido cítrico	57
4.1.1	Aspecto físico.....	57
4.1.2	Espectroscopia FTIR.....	59
4.1.3	Difratometria de raios-x (DRX).....	65
4.1.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	68
4.1.5	Propriedades mecânicas.....	79
4.1.6	Propriedades físicas e físico-químicas.....	83
4.1.7	Análise termogravimétrica.....	88
4.1.8	Avaliação dos materiais obtidos.....	91
4.2	Neutralização dos materiais.....	91
4.2.1	Teor de plastificantes.....	92
4.2.2	Morfologia	95
4.2.3	Propriedades mecânicas.....	99
4.2.4	Degradação <i>in vitro</i>	103
4.2.5	Capacidade de absorção de água	104
4.2.6	Permeação ao vapor de água (PVA)	106
4.2.7	Avaliação da incorporação e liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina <i>in vitro</i>	112
4.2.8	Atividade antimicrobiana.....	117
5	CONCLUSÕES.....	121
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	125

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
APÊNDICE A.....	145
APÊNDICE B.....	147
APÊNDICE C	149
APÊNDICE D	151
APÊNDICE E.....	153
ANEXO A	155

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição e designação das amostras em relação ao teor de quitosana.....	42
Tabela 4.1 – Propriedades físicas e físico-químicas das amostras processadas com diferentes teores de AC.	83
Tabela 4.2 – Teor de água, glicerol e total de plastificantes nas amostras neutralizadas em diferentes tempos de imersão em glicerol e nas amostras originais (antes da neutralização). Valores em vermelho destacam os teores dos materiais originais e os valores em negrito destacam a composição que mais se aproximam do valor do material original de referência.....	92
Tabela 4.3 – Valores do módulo de elasticidade, resistência à tração na ruptura e alongação na ruptura de AC15 neutralizados com diferentes teores de glicerol.	102
Tabela 4.4 – Valores de Perda de massa total ao longo do ensaio, PVA e TVA estimada para placas com 700 e 200 µm de espessuras para TPC e AC15.	108
Tabela 4.5 – Perda de água em pele com diferentes injúrias [135].....	110
Tabela 4.6 – Diâmetros da zona de inibição dos materiais carregados com fármaco antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da quitina e quitosana. Fonte: própria autora.	7
Figura 2.2 Estrutura química da quitosana em conjunto com a numeração atômica. Linhas tracejadas denotam pontes de hidrogênio O3-O5. Dois ângulos diédricos (φ , ψ) definindo a conformação da corrente principal e um ângulo χ diédrico definindo a orientação O6 também são mostrados. Extraída da ref [29].	9
Figura 2.3 - Estrutura de empacotamento de quitosana hidratada projetada ao longo do eixo a (a) e ao longo do eixo c (b). Círculos preenchidos denotam átomos de nitrogênio. As esferas denotadas por W1, W2 e W3 representam moléculas de água interagindo de 3 formas distintas na estrutura cristalina da quitosana e a numeração indica a distância das diferentes ligações de hidrogênio. Extraída da ref [29].	9
Figura 2.4 – Microscopia eletrônica de varredura do domínio de quitosana não compatibilizada em matriz de polietileno (esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula de quitosana (direita). As imagens evidenciam a estrutura cristalina em camada do biopolímero. Extraídas das referências [30] e [27], respectivamente.	10
Figura 2.5 – Representação esquemática do mecanismo de desestruturação da quitosana sob ação do cisalhamento imposto durante o processamento mecânico. Imagem extraída da referência [1].	14
Figura 2.6 – Principais características do glicerol, xilitol e Sorbitol. Imagem adaptada da ref [27].	16
Figura 2.7 – Micrografia eletrônica de varredura da quitosana termomecanicamente processada (a) na ausência de plastificantes; e na presença de (b) glicerol; (c) xilitol e (d) sorbitol. Imagem extraída da ref [27]. .	17
Figura 2.8 – Representação dos diferentes níveis estruturais da quitosana com suas dimensões aproximadas de comprimento ou diâmetro (D). Fonte: própria autora.	20
Figura 2.9 – Imagens de microscopia ótica das fibras liberadas da amostra de quitosana processada termomecanicamente na presença de AL concentrado	

após inchaço em água deionizada por 48 h para duas ampliações diferentes. Extraída da ref. [1].	21
Figura 2.10 – Curvas tensão-deformação de filmes à base de quitosana GD 96% com diferentes aditivos. À esquerda: (a) Sem aditivos, (b) 5% Tween 20, (c) 20% Gly–5% Tween 20 e (d) 20% Gly [31] e à direita: curvas de tensão-deformação de filmes com diferentes teores de glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), poli(etilenoglicol) (PEG) e propilenoglicol (PG) [37].	23
Figura 2.11 – Comportamento mecânico da quitosana termomecanicamente processada apenas com ácido fórmico (X-F) e com os aditivos: glicerol (XG-F), 1-etil-3-metilimidazólio (XE-F) e triacetina (XT-F) à esquerda [51] e da quitosana termoplástica com 0, 7,5 e 15% de glicerol (curvas destacadas à direita) [56].	24
Figura 2.12 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura de uma mistura PS/PB-g-PS sob condições de impacto entalhado [65].	26
Figura 2.13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do poli(ácido l-láctico) (PLLA) (a e b) e PLLA/B-AChNF (nanofibras de quitina moídas por bola) 3% em peso (PLLA_3; c e d) na área de clareamento e superfície de fratura de corpos de prova de tração e curvas de tensão-deformação de nanocompósitos de poli (ácido l-láctico) com teores de nanofibras de quitina moídas por bola variando de 0 a 5 (e) [66].	28
Figura 2.14 – Perfis de liberação de fármaco no plasma sanguíneo para comprimidos convencionais (curvas em vermelho e azul), sistemas de liberação sustentada (curva em preto) e sistemas de liberação controlada (curva em verde). MCE significa máxima concentração efetiva e MCS significa máxima concentração segura. Imagem extraída e adaptada da ref [94].	34
Figura 3.1 - Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas nesta tese.	40
Figura 3.2 – Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade da quitosana. A linha bg significa linha de base ou background. Imagem extraída da ref [99].	45
Figura 3.3 – Figura esquemática do experimento de Meng e colaboradores com ênfase para as fibras destacadas da superfície da quitosana termomecanicamente processado (a) e do experimento de Bezerra e	

colaboradores enfatizando as estruturas fibrosas destacadas da superfície de fratura após tratamento criogênico por 10 min (b).....	46
Figura 3.4 – Imagem de uma cápsula montada para ensaio PVA contendo uma placa AC15 (superior) e uma caixa de PP no início do ensaio de PVA (inferior).	51
Figura 4.1 – a, b) Aspecto físico dos materiais com diferentes teores de AC: TPC (0 pcr), AC5 (5 pcr), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr); c) Imagem de um disco retirado de AC5; d) ampliação do disco de AC5 apresentando o pó de quitosana remanescente no pós processamento; e e) ampliação da imagem lateral do disco de AC5 apresentando alta quantidade de pó remanescente (não desestruturado).	58
Figura 4.2 – Espectros FTIR de cristais de AC, quitosana em pó e das amostras plastificadas TPC, AC5, AC10 e AC15.....	60
Figura 4.3 – Espectro de AC15 antes da etapa de cura em comparação aos espectros de AC, quitosana e AC15.	64
Figura 4.4 – Ilustração esquemática da estrutura das cadeias de quitosana reticuladas com ácido cítrico através de reação de amidação. O glicerol interage por meio de ligações de hidrogênio.....	65
Figura 4.5 – Padrões de DRX de pó de quitosana e amostras processadas com diferentes quantidades de AC: (a) TPC (0), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr) no segundo dia de armazenamento a $50 \pm 3\%$ RH e $25 \pm 2^\circ$ C e (b) TPC (0), AC5 (5 pcr), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr) após estabilização estrutural (30 dias a $50 \pm 3\%$ UR e $25 \pm 2^\circ$ C).	66
Figura 4.6 – Imagens de MEV da (a) superfície de AC15; seções transversais das amostras fraturadas após 1 h de imersão em nitrogênio líquido de (b) TPC com extensão de trinca adjacente à região cristalina da quitosana (ampliação), (c) AC10 e (d) AC15.....	69
Figura 4.7 – Superfície de fratura dúctil (após imersão em $N_2(l)$ por 10 min) de TPC em diferentes aumentos evidenciando dois níveis de estruturas hierárquicas da quitosana, os aglomerados nanofibrilares e microfibras.....	71
Figura 4.8 – Superfície de fratura dúctil (após imersão em $N_2(l)$ por 10 min) de (a) AC15, (b) ampliação de uma seção da Figura 4.10a, (c) representação	

esquemática da formação da estrutura em camadas de fibras de quitosana em AC15.	74
Figura 4.9 – Representação esquemática do possível processo de nucleação dos diferentes níveis estruturais formando estruturas superiores a partir das nanofibrilas (AC15).....	76
Figura 4.10 – Representação esquemática do possível processo de nucleação dos diferentes níveis estruturais formando estruturas superiores a partir das nanofibrilas (TPC).	76
Figura 4.11 – Superfície de fratura de AC10 (após imersão em N ₂ (l) por 10 min).	78
Figura 4.12 – (a) Curvas representativas do comportamento mecânico sob tração de TPC, AC10 e AC15 e (b) ampliação da parte inicial das curvas.	79
Figura 4.13 – Propriedades mecânicas de placas de quitosana processadas com ácido acético e ácido cítrico. ^{a, b, c, d, e} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.	81
Figura 4.14 – (a) Curvas de absorção de água das placas de quitosana em solução de PBS a 37 ° C e (b) aparência física dos materiais antes e depois do intumescimento.	86
Figura 4.15 – (a) Curvas termogravimétricas das amostras TPC, AC10, AC15, glicerol, pó de quitosana e ácido cítrico e (b) curva da primeira derivada do TGA (curva DTG).....	89
Figura 4.16 – Esquema representativo do (a) inchamento da quitosana reticulada com AC e aprisionamento de moléculas de água e glicerol interagindo fisicamente com a quitosana e o AC e (b) inchamento quitosana termoplástica em maiores dimensões e menor capacidade de absorção de água e glicerol na ausência da interação com AC e sem os pontos de aprisionamento molecular entre os pontos de reticulação.	94
Figura 4.17 – Imagens de MEV de AC15 imerso em glicerol por (a – c) 0 seg exibindo cavidades entre as camadas e trinca; (d – f) 5 seg exibindo quantidade reduzida de cavidades entre as camadas e; (g – i) 30 seg sem evidencias de falhas morfológicas.	96

Figura 4.18 – Imagens de MEV de AC15 imerso em glicerol por (a – c) 1 min sem evidencias de falhas morfológicas; (d – f) 2 min exibindo descontinuidades na fase amorfa do material e; (g – i) TPC imerso em glicerol por 2 min sem evidencias de falhas morfológicas.....	97
Figura 4.19 – Curvas representativas dos materiais neutralizados em PBS após imersão em glicerol por tempos diferentes e estabilização em UR = 50%. Os percentuais P% indicam o teor total de plastificantes para cada condição de imersão em glicerol.	100
Figura 4.20 – Curvas de absorção de água em solução de PBS a 37° C das placas de quitosana TPC e AC15 neutralizadas.	105
Figura 4.21 – Gráfico da perda de massa de água através de TPC e AC15 ao longo do tempo à temperatura e umidade relativa média de 18,06 °C e 59,3 %, respectivamente.	107
Figura 4.22 - Permeabilidade relativa ao vapor de água L_{r,H_2O} de membranas de diferentes amostras de quitosana e diferentes teores de glicerol [119].....	111
Figura 4.23 – Curva de calibração de soluções de cloridrato de tetraciclina em fluido PBS a 37° C em concentrações variando entre 0,58 e 10,03 $\mu\text{L} / \text{mL}$. .	112
Figura 4.24 – Capacidade de carregamento da tetraciclina dissolvida em PBS (1 mg / mL) nas amostras de TPC e AC15 a 50°C por 3 h.....	113
Figura 4.25 – Curva de liberação do cloridrato de tetraciclina por massa de TPC ou AC15 (pH = 7,4) em função do tempo de incubação a 37°C.....	114
Figura 4.26 – Perfil de liberação do cloridrato de tetraciclina em solução PBS (pH = 7,4) a 37° C nas primeiras 75 h.....	116
Figura 4.27 – Imagens das zonas de inibição (duplicata) de (1) TPC 200 μm ; (2) TPC 700 μm ; (3) TPC-CT 200 μm ; (4) AC15 200 μm ; (5) AC15 700 μm ; e (6) AC15-CT 200 μm contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	118

1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo semicristalino derivado da quitina que, por sua vez, é o segundo polímero mais abundante na natureza e amplamente presente em recursos naturais tais como crustáceos, insetos, algas, fungos e leveduras e é principalmente extraída de carapaças de artrópodes tais como camarão, caranguejo, etc. [1]. Este biopolímero reúne um conjunto de propriedades tais como mucoadesividade, citocompatibilidade, bioatividade hemocompatibilidade, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade, hidrofiliicidade além de não provocar resposta imunológica, sendo muito atraente em aplicações biomédicas tais como suturas, implantes, coberturas ativas de feridas, arcabouços de crescimento celular, implantes, adesivos de liberação de medicamentos, etc [2]. A partir desse conjunto atrativo de propriedades e ampla disponibilidade de sua matéria-prima a quitosana tem sido bastante estudada em aplicações biomédicas e farmacêuticas, principalmente.

Entretanto este biopolímero enfrenta limitações devido sua natureza estrutural sendo mecanicamente frágil e incapaz de manter uma forma predefinida [3]. A alta densidade de ligações de hidrogênio dificulta o processamento da quitosana de forma que o método mais utilizado envolve a solubilização do biopolímero em meios ácidos diluídos e subsequente evaporação do solvente, método *casting* [1]. Além disso, a quitosana não apresenta temperatura de fusão pois degrada antes de fundir, sendo considerada infusível [4]. Essa baixa processabilidade implica na subutilização da quitosana apesar da abundância de matéria-prima como recurso renovável.

Para superar a baixa processabilidade da quitosana Epure e colaboradores utilizaram uma abordagem simples para o processamento da quitosana envolvendo o cisalhamento no estado sólido da quitosana a partir da mistura do pó de quitosana, uma solução de ácido acético como agente desestruturante e glicerol como plastificante [3]. Apesar dessa abordagem representar um avanço na obtenção de materiais à base de quitosana esses materiais apresentam baixa integridade estrutural no estado intumescido e são lentamente solubilizados quando submetidos a sistemas aquosos [5]. Como muitas das habilidades biomédicas da quitosana envolvem aplicação em

sistemas úmidos e aquosos uma abordagem simples e eficiente para aumentar a integridade estrutural desses materiais envolve a reticulação química das cadeias do polissacarídeo [5,6]. Para filmes produzidos por casting é comum o uso de um aditivo reticulante capaz de ligar as cadeias diminuindo a solubilidade e a degradação *in vitro* da quitosana. Dentre os agentes de reticulação, o ácido cítrico (AC) é um ácido policarboxílico amplamente utilizado como agente de reticulação não tóxico [6].

Outro desafio relacionado com a aplicação dos materiais à base de quitosana em sistemas biológicos é a acidez residual dos materiais que provoca reações inflamatórias e citotoxicidade [7]. Devido a tal acidez residual muitos trabalhos relatam a neutralização dos filmes de quitosana por imersão em soluções concentradas de NaOH e subsequentes lavagens do material até pH neutro antes dos testes de citocompatibilidade [8–13], entretanto os efeitos da neutralização sobre as propriedades e morfologia do material final são omitidos. Até o presente momento não há uma abordagem na literatura para recuperar a flexibilidade desses materiais após a neutralização.

Lançando-se mão dos benefícios do processamento termomecânico da quitosana e visando uma maior estabilidade em meio aquoso dos materiais à base de quitosana processada através do cisalhamento no estado sólido, nesta tese é apresentada uma abordagem de reticulação química durante o processamento termomecânico da quitosana. Além disso uma nova metodologia de neutralização dos materiais processados foi empregada utilizando-se um sistema tamponado para minimizar a hidrólise alcalina dos materiais. E finalmente para o ajuste da flexibilidade uma abordagem de recuperação do plastificante solubilizado foi proposta. Dessa forma a hipótese desta tese é de que, com o auxílio do cisalhamento, o ácido cítrico possa atuar simultaneamente como um agente reticulante e agente desestruturante capaz de interferir nas fortes interações intermoleculares da quitosana durante o processamento da quitosana. A segunda hipótese é que o uso da solução tampão fosfato salina (pH = 7,4) seguido de imersão dos materiais em glicerol em tempos pré-definidos possa viabilizar a neutralização da quitosana sem gerar maiores prejuízos nas propriedades mecânicas e restituir uma flexibilidade ajustável desses materiais,

de acordo com o tempo de imersão no plastificante, respectivamente. Dessa forma alcançando-se sucesso na proposta de reticulação química durante o processamento mecânico da quitosana, seguido da neutralização em meio tamponado aliada a uma abordagem simples de recuperação do plastificante haverá uma contribuição importante para a melhoria da produtividade e obtenção de materiais com espessuras variadas, pH fisiológico e com propriedades mecânicas adequadas viabilizando o uso dos materiais à base de quitosana desde seu processamento até suas propriedades finais.

1.1 Objetivos gerais

Esta tese de doutorado tem como objetivo geral a obtenção de um biomaterial à base de quitosana reticulada por uma rota de processamento termomecânico com foco na manutenção das propriedades mecânicas e estabilidade estrutural no estado intumescido visando sua utilização como um biomaterial com liberação controlada de fármacos.

1.2 Objetivos específicos

Tornar viável a obtenção de materiais à base de quitosana reticulada por uma rota de processamento termomecânico a partir de três formulações iniciais de AC visando um conjunto de propriedades adequadas visando sua aplicabilidade como biomaterial.

Utilizar uma abordagem inédita envolvendo tratamento criogênico de curto tempo com objetivo de visualizar detalhadamente as diversas estruturas cristalinas existentes nos materiais de quitosana termomecanicamente processadas visando melhor compreensão da relação estrutura-propriedade.

Selecionar a formulação adequada para a obtenção de um biomaterial e apresentar apontamentos sobre o tipo de aplicação viável.

Propor uma metodologia de neutralização em meio tamponado como meio de minimizar os efeitos de hidrólise alcalina e a recuperação do glicerol por imersão visando-se a recuperação da flexibilidade do material;

Investigar a degradação *in vitro*, a capacidade de absorção de exsudatos e analisar o perfil de liberação do antibiótico cloridrato de tetraciclina para se avaliar a capacidade de incorporação e liberação em condições fisiológicas de temperatura e pH visando aplicações como cobertura de feridas e como dispositivo de liberação controlada de fármaco, respectivamente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomateriais e os dispositivos biomédicos

Uma doença, lesão ou trauma podem levar a danos e degeneração dos tecidos no corpo humano, o que requer tratamentos para facilitar a sua reparação, substituição ou regeneração. Com relação à engenharia de tecidos, todos os dias milhares de procedimentos cirúrgicos são realizados para substituir ou reparar tecidos danificados por doenças ou traumas [14].

O termo biomaterial foi definido na primeira Conferência de Consenso da European Society for Biomaterials (ESB), em 1976, como "um material não viável usado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos"; esse termo foi redefinido algumas vezes até a definição atual do ESB como sendo um "material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo". Essa mudança reflete a evolução e o desenvolvimento dos biomateriais de uma simples interação com o corpo para influenciador de processos biológicos [14]. Vários biomateriais têm sido utilizados ao longo dos tempos, porém a partir da década de 50 (pós Segunda Guerra Mundial) tais estruturas começaram a ser investigados de forma mais precisa. Os biomateriais são utilizados como suturas, implantes (dentários, intradérmicos, coluna, etc.), coberturas de feridas (*wound dressings*), arcabouços ou suportes para crescimento celular (*scaffolds*), etc [15], [7].

Uma característica crítica dos biomateriais é a biocompatibilidade, isto é, a habilidade de um material em ser compatível com tecidos vivos, em especial, o corpo humano. Outra característica bastante desejada para biomateriais é a bioatividade que é capacidade de interligar a interface entre sistemas artificiais e biológicos, promovendo assim interações celulares favoráveis e desenvolvimento de tecidos.

As pesquisas em busca de biomateriais aumentam exponencialmente no desenvolvimento de dispositivos tais como *scaffolds* e coberturas bioativas de feridas, por exemplo. Tipicamente são usados na fabricação de *scaffolds* para engenharia de tecidos três grupos individuais de biomateriais, as cerâmicas, os

polímeros sintéticos e os polímeros naturais. Na fabricação de coberturas de feridas esses materiais se restringem basicamente aos materiais poliméricos sintéticos e de origem natural [14]. Para essas aplicações, os biomateriais ideais também devem ser biodegradáveis e bio-reabsorvíveis, fáceis de serem esterilizados e não-tóxicos, o que também se aplica aos seus produtos de degradação, mantendo propriedades mecânicas e físicas adequadas durante a degradação para apoiar a reconstrução de um novo tecido sem inflamação. Conseqüentemente, a taxa de degradação e o mecanismo devem ser ajustados exatamente para a aplicação desejada [16].

Alguns requisitos, no entanto, são necessários para a viabilidade de um biomaterial projetado para atuar em aplicações específicas. Para uma cobertura de feridas, por exemplo, os requisitos são: biocompatibilidade, não alergenicidade, atoxicidade, permitir a remoção sem causar traumas, ser flexível, manter a umidade na interface ferida-cobertura, remover o excesso de exsudatos, fornecer isolamento térmico, permitir trocas gasosas, proteger contra microrganismos, estimular o crescimento celular [17–20].

Neste contexto os materiais à base de biopolímeros biologicamente ativos ganharam destaque nos últimos anos no desenvolvimento de biomateriais. Eles são capazes de substituir a estrutura do tecido humano por causa de sua semelhança física e química. Uma série de materiais naturais tais como: quitosana, colágeno, gelatina, alginato, fibroína da seda, hidroxiapatita, ácido hialurônico, têm sido usados para aplicações de coberturas de feridas [21]. Dentre os biopolímeros, a quitosana tem sido amplamente estudada como um potencial material bioativo devido às suas propriedades e disponibilidade únicas. Entretanto sua baixa processabilidade ainda se impõe como obstáculo na aceitação da quitosana pela indústria [3].

2.2 Quitosana

2.2.1 Aspectos gerais

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, segundo polímero mais abundante da natureza, que por sua vez é um homopolímero semicristalino

constituente estrutural em exoesqueleto de artrópodes e nas paredes celulares de fungos e leveduras, além disso a quitina é produzida por vários outros organismos vivos nos reinos vegetal e animal, servindo em muitas funções estruturais nas quais o reforço mecânico se faz necessário [22]. A quitosana tem ocorrência natural reduzida em alguns fungos (*Mucor* e *Zygomycetes*) enquanto que a quitosana comercial advém, majoritariamente, da quitina proveniente de resíduos da indústria pesqueira principalmente de cascas de caranguejo e camarão sendo considerado um recurso subutilizado [23,24].

Quanto à sua estrutura, a quitosana é um copolímero aleatório constituído dos carboidratos D-glicosamina (2-amina-2-desoxi-D-glicopiranosose) e N-acetil-D-glicosamina (2-acetamina-2-desoxi-D-glicopiranosose) unidos por ligações β -(1-4) (Figura 2.1), desde que a proporção da unidade desacetiladas (2-amina-2-desoxi-D-glicopiranosose) seja igual ou superior a 50% [22]. Apenas as quitosanas de ocorrência natural são completamente desacetiladas.

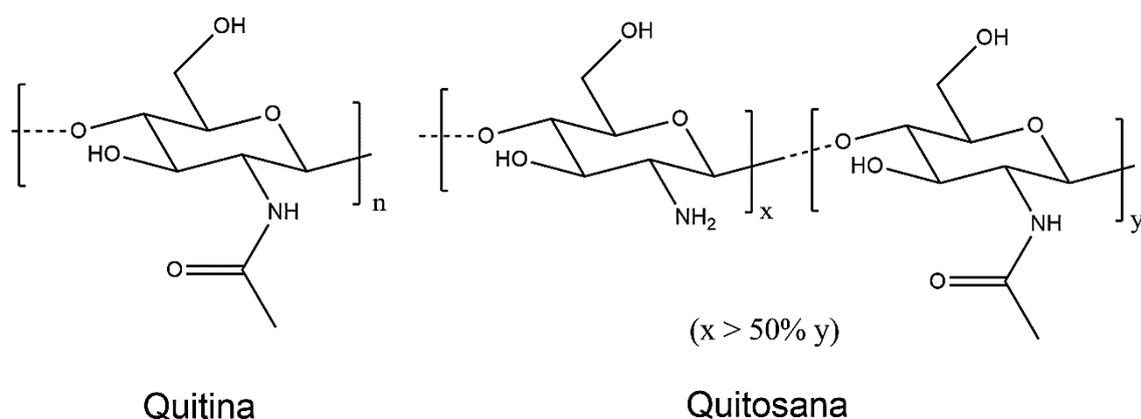


Figura 2.1 – Estrutura da quitina e quitosana. Fonte: própria autora.

Este biopolímero apresenta intensas interações intra e intermoleculares tornando-o muito rígido e de difícil processabilidade, entretanto pode ser solubilizado em meios ácidos diluídos devido à existência de grupos amina de caráter básico enquanto que a quitina é praticamente insolúvel em vários solventes já testados. Esses grupos amina (pKa de 6,2 a 7,0) são completamente protonados em ácidos com pKa menor que 6,2, tornando a quitosana solúvel em

meios ácidos diluídos e insolúvel em água [25]. É relatado que a quitosana é o único polímero catiônico de origem natural, o que confere muitas das propriedades únicas deste biopolímero [26]. O ácido responsável pela protonação e/ou solubilização da quitosana é denominado agente desestruturante ou agente de protonação [4-6].

Okuyama et al. determinaram a estrutura molecular e cristalográfica da forma hidratada da quitosana totalmente desacetilada, obtida por repetidas reações de desacetilação da quitina do caranguejo [28]. Os autores observaram que as cadeias de quitosana cristalizam em uma célula unitária ortorrômbica com dimensões $a = 8,95 \text{ \AA}$, $b = 16,97 \text{ \AA}$, c (eixo da fibra) $= 10,34 \text{ \AA}$. A conformação da cadeia é uma hélice de duas dobras estabilizada por ligação de hidrogênio O3-O5 (figura 2.2 e 2.3). A célula unitária contém quatro cadeias dispostas em direções antiparalelas entre si e oito moléculas de água. Além disso, existem ligações diretas de hidrogênio (N2-O6) entre cadeias adjacentes ao longo do eixo b , o que torna uma estrutura de folha paralela ao plano bc . Essas folhas são empilhadas ao longo do eixo a . Moléculas de água formam colunas entre essas folhas contribuindo para a estabilização da estrutura, fazendo pontes de hidrogênio entre a água e as cadeias poliméricas. Ou seja, nos cristais de quitosana hidratada, as cadeias adjacentes de quitosana são alinhadas antiparalelamente e ligadas com ligação de hidrogênio intermolecular, formando uma estrutura de folha. Além disso, várias folhas empilhadas em conjunto com ligações de hidrogênio, através de moléculas de água presentes entre elas, formam cristais 3-D.

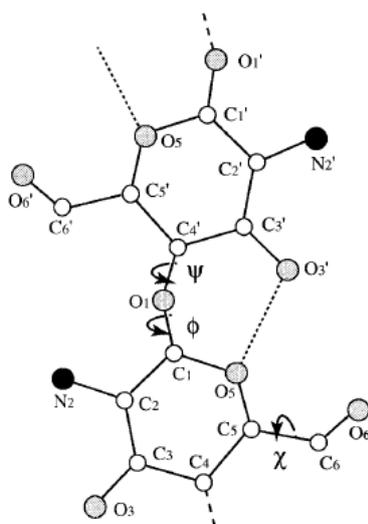


Figura 2.2 Estrutura química da quitosana em conjunto com a numeração atômica. Linhas tracejadas denotam pontes de hidrogênio O3-O5. Dois ângulos diédricos (ϕ , ψ) definindo a conformação da corrente principal e um ângulo χ diédrico definindo a orientação O6 também são mostrados. Extraída da ref [29].

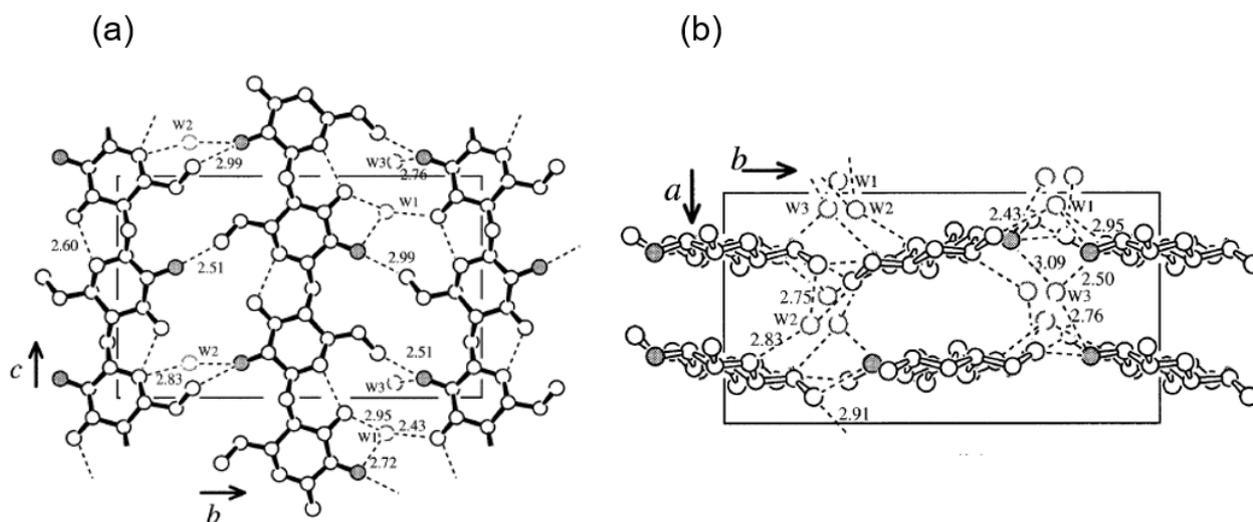


Figura 2.3 - Estrutura de empacotamento de quitosana hidratada projetada ao longo do eixo a (a) e ao longo do eixo c (b). Círculos preenchidos denotam átomos de nitrogênio. As esferas denotadas por W1, W2 e W3 representam moléculas de água interagindo de 3 formas distintas na estrutura cristalina da quitosana e a numeração indica a distância das diferentes ligações de hidrogênio. Extraída da ref [29].

A fase cristalina da quitosana pode ser visualizada numa morfologia em camadas através imagens de microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão como apresentadas na figura 2.4.

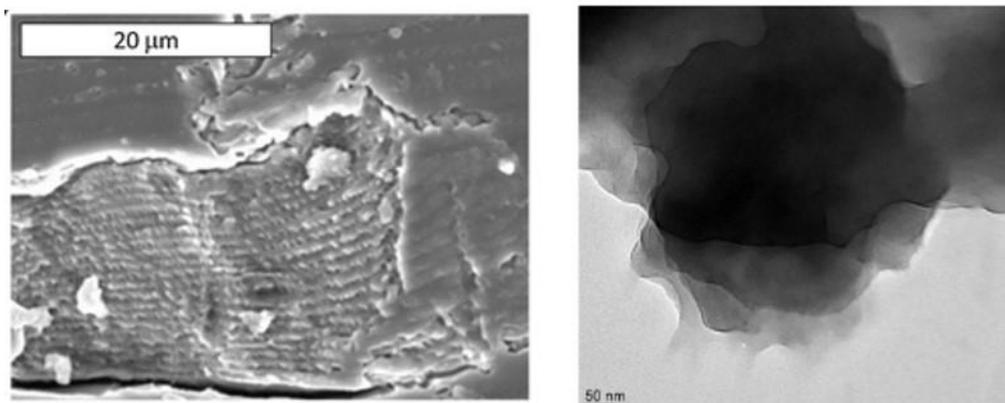


Figura 2.4 – Microscopia eletrônica de varredura do domínio de quitosana não compatibilizada em matriz de polietileno (esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula de quitosana (direita). As imagens evidenciam a estrutura cristalina em camada do biopolímero. Extraídas das referências [30] e [27], respectivamente.

A rede de ligações de hidrogênio da quitosana reflete diretamente nas suas propriedades mecânicas gerando estruturas rígidas e frágeis que podem limitar a aplicabilidade deste material. No sentido de superar a fragilidade imposta pelas ligações de hidrogênio e aumentar a flexibilidade dos filmes de quitosana muitos autores utilizam plastificantes [31–37]. A estrutura dos plastificantes é capaz interagir com a quitosana e interferir nas fortes interações intercadeias [38] agindo como espaçador intermolecular gerando estruturas mais flexíveis, mas com menores resistências à tração. O glicerol está entre as moléculas mais utilizadas para plastificar a quitosana e outros polímeros naturais pois apresenta diversas vantagens, é biocompatível, líquido em temperatura ambiente, não é volátil, possui alto ponto de ebulição e alta capacidade de ligação de hidrogênio (hidrofilicidade) causando uma alta retenção no polímero [38,39].

Materiais de quitosana plastificada geralmente passam por um processo de reticulação, na qual o agente reticulante liga-se quimicamente (de forma iônica ou covalente) à cadeia do biopolímero para restringir o escoamento entre as cadeias durante a aplicação de uma tensão de tração aumentando sua respectiva resistência mecânica [40–43]. A reticulação química é uma abordagem interessante e viável para aumentar o tempo de uso dos biomateriais à base de quitosana em meios úmidos (como é o meio fisiológico) devido às interações químicas entre o biopolímero e o reticulante tendo como resultado uma menor solubilidade e menor taxa de degradação *in vitro* [6]. Muitos estudos apontam para a eficiência do ácido cítrico como reticulador atóxico da quitosana e de outros biopolímeros como a celulose e o amido para obtenção de hidrogéis [6,41,42,44–48]. O ácido cítrico é um ácido carboxílico ternário não tóxico que faz parte do ciclo de Krebs e é usado em muitos campos, como alimentos, limpeza e produtos médicos [17,18] e é liberado pelo FDA para uso médico e alimentar [49]. Os materiais reticulados e plastificados além de uma resistência mecânica aumentada apresentam flexibilidade (fragilidade reduzida) [31–37]. Sem o uso de um plastificante os materiais reticulados seriam ainda mais rígidos que os materiais originais (sem aditivos plastificante e reticulante). Considerando que os valores do pKa do AC são: 3,13 (pKa₁), 4,70 (pKa₂) e 6,40 (pKa₃) [50] é provável que um dos três grupos carboxílicos do AC não reaja formando uma estrutura com três pontos de reticulação já que em valores de pKa superiores a 6,20 os grupos amina da quitosana não são protonados. Entretanto em temperaturas elevadas a constante de acidez se altera podendo favorecer uma completa ação reticulante do AC.

2.2.2 Processamento termomecânico

Apesar dos artifícios utilizados para aumentar a viabilidade dos filmes de quitosana nas diversas aplicações, a técnica amplamente utilizada para obtenção de materiais à base de quitosana, *casting*, impõe limitações que podem restringir as aplicações potenciais da quitosana, como o alto consumo de solvente, baixa concentração de quitosana, baixo volume de materiais produzidos e longos tempos de fabricação, resultando em baixo rendimento de

produção [5,27]. Para o casting contínuo essas limitações são reduzidas ao alto consumo de solvente e baixa concentração de quitosana.

Para superar essas limitações, a técnica de processamento por cisalhamento no estado sólido ou “*mechanical kneading*” foi adotada para preparar materiais à base de quitosana [3]. Este método baseia-se no cisalhamento do biopolímero no estado sólido intumescido em água com uma quantidade adequada de plastificante e um ácido desestruturante num misturador interno de batelada. Nesta técnica de processamento os diferentes componentes tais como solução de ácido acético, quitosana e glicerol são misturados em um misturador interno (tipo Haake) por 15 min a uma temperatura de 80°C com uma velocidade de rotor de 100 rpm. Assim, durante o processamento termomecânico, onde forças de cisalhamento intensivas estão envolvidas, uma quantidade bastante reduzida de solvente é necessária para quebrar a ligação de hidrogênio intrínseca entre as cadeias da quitosana [51]. Após o processamento mecânico, o material é termoprensado (12 min) para moldagem [3], resultando na rápida preparação dos materiais em comparação ao longo tempo necessário para materiais fabricados por *casting*, que envolve um tempo de solubilização e um tempo de secagem. Essa técnica produz materiais que podem ser moldados em diferentes formas e espessuras e oferece maior produtividade e os materiais à base de quitosana obtidos são conhecidos como *thermoplastic chitosan* ou “quitosana termoplástica”.

A partir da análise da microestrutura da quitosana termoplástica, Matet e colaboradores afirmam que nem todas as partículas de quitosana puderam ser completamente protonadas na solução de ácido acético, muito provavelmente devido à alta proporção de cadeias de quitosana em relação ao conteúdo de ácido acético [27]. Meng e colaboradores discorrem que a quitosana termoplástica é na verdade um material compósito onde as partículas remanescentes do pó de quitosana dão reforço mecânico à fase desestruturada [1].

A técnica de processamento termomecânico da quitosana vem se consolidando ao longo dos anos no desenvolvimento da quitosana “termoplástica”. Desde a publicação do primeiro trabalho neste assunto em 2011,

[3] outros trabalhos foram realizados para o desenvolvimento e avaliação da influência de diversas composições de forma que a técnica tem apresentado eficácia e bons desempenhos na obtenção de materiais funcionais. Por exemplo, em 2013, Xie e colaboradores prepararam uma série de nanocompósitos à base de quitosana plastificada nos quais a montmorilonita (MMT) foi totalmente exfoliada [52]. Os resultados de DRX e MET mostraram que a MMT pode ser esfoliado em grande parte na matriz de quitosana durante o processamento termomecânico. Esses nanocompósitos mostraram propriedades mecânicas (resistência à tração, módulo de elasticidade e alongação na ruptura) melhoradas que podem ser atribuídas à excelente dispersão de nanoargila e forte afinidade entre a nanoargila e a matriz de quitosana.

Em 2014, Meng e colaboradores obtiveram placas de quitosana plastificada na presença de teores crescentes de ácido láctico (AL) e glicerol pelo processamento termomecânico [1]. Neste importante estudo a estruturação hierárquica da quitosana foi delineada (e será abordada na próxima seção) bem como o mecanismo de desestruturação da quitosana por ação do cisalhamento imposto ao biopolímero dentro do misturador interno foi determinado. No que se refere ao mecanismo de desestruturação da quitosana, a análise DRX indicou um deslocamento dos picos característicos da quitosana para ângulos menores com o aumento do teor do agente desestruturante. Pela lei de Bragg a diminuição do ângulo da luz difratada significa um aumento nos parâmetros de rede de um material cristalino ou semicristalino [53]. A análise de DRX da quitosana protonada com AL concentrado (na ausência de água e glicerol) confirmou a entrada do ácido láctico na estrutura do biopolímero pelo aumento no espaçamento entre os planos (020) de aproximadamente 0,288 nm de forma que este aumento corresponde ao comprimento aproximado de uma molécula de ácido láctico [1].

Dessa forma foi compreendido o seguinte mecanismo (Figura 2.5): após a protonação da quitosana ocorre um aumento da distância entre as cadeias de quitosana numa folha devido à infiltração de moléculas de ácido láctico ligadas ionicamente aos grupos amina deteriorando as ligações de hidrogênio intermoleculares, ou seja, as moléculas de ácido láctico expandem o espaço entre

as moléculas de quitosana da fase cristalina. Sob ação do cisalhamento imposto durante o processamento ocorre o “rasgamento” das folhas cristalinas finalizando o processo de desestruturação. A protonação da quitosana abre caminho para que o glicerol seja incorporado à estrutura do biopolímero. Além disso, o glicerol contribui com a processabilidade pois também interfere nas fortes interações intercadeias da quitosana facilitando a desestruturação do polissacarídeo [1].



Figura 2.5 – Representação esquemática do mecanismo de desestruturação da quitosana sob ação do cisalhamento imposto durante o processamento mecânico. Imagem extraída da referência [1].

Em 2016 blendas de amido de milho termoplástico e quitosana foram preparadas por extrusão, caracterizadas e constatou-se que foi possível produzir misturas de amido de milho e quitosana com alta dispersão [54]. Embora a incorporação de quitosana termoplástica tenha causado uma diminuição tanto na resistência à tração quanto na rigidez, foram produzidos filmes com maior extensibilidade e estabilidade térmica.

O processamento termomecânico também se mostrou eficaz na obtenção de misturas de materiais à base de quitosana para obtenção de materiais funcionais com propriedades otimizadas. Excelentes níveis de dispersão foram obtidos em nanocompósitos de nanoargila/quitosana (2021) [38] e em polieletrólitos de quitosana/carboximetilcelulose (CMC) complexados com óxido de grafeno ou óxido de grafeno reduzido (2020) [55]. Propriedades mecânicas e

hidrofilicidade otimizadas foram encontradas em filmes de quitosana/gelatina e misturas de quitosana/alginato devido a interações iônicas e de hidrogênio entre os dois biopolímeros possibilitadas pelo processamento termomecânico (2020; 2021) [51,56].

2.2.2.1 Plastificantes da quitosana

O papel dos plastificantes é fundamental para a processabilidade e as propriedades finais dos materiais à base de polissacarídeos, em geral, pois estas estruturas são capazes de romper as fortes interações inter e intracadeias com a vantagem de não ser volatilizado em ampla faixa de temperatura [27]. Os agentes desestruturantes provenientes de ácidos orgânicos além de promover a protonação e, conseqüentemente, uma desestruturação inicial por ação da repulsão eletrostática entre os grupos amina protonados também agem como plastificantes secundários [1,57]. Sobre o uso de ácidos inorgânicos, Zhang e colaboradores concluíram que apesar do HCl ser um excelente agente de protonação a adição deste ácido inorgânico não ajuda na mobilidade entre as cadeias gerando filmes mais rígidos enquanto que o íon acetato é maior e mais livre, conferindo alguma elasticidade e flexibilidade aos filmes de quitosana [57]. Entretanto os polióis, especialmente o glicerol, são considerados os principais agentes de plastificação para a quitosana [27,32,37,51].

Uma vez que o amido termoplástico vem sendo desenvolvido desde meados dos anos 80 (e já apresenta um forte histórico) [58], vários polióis com estruturas químicas diferentes são tipicamente usados para plastificação do amido. Sorbitol, xilitol e maltitol têm maiores massas molares do que o glicerol. Foi demonstrado que quando um poliol com maior massa molar foi utilizado, a resistência à tração e o módulo aumentaram, a estabilidade térmica foi melhor e a temperatura de transição de fase do amido aumentou (Li & Huneault, 2011; Qiao, Tang, & Sun, 2011). Para a quitosana diferentes plastificantes foram testados para materiais processados por *casting*, entre eles glicerol, sorbitol, sacarose, polietilenoglicol, etilenoglicol e propilenoglicol [27,32,37]. Um ponto em comum é que essas estruturas são todas hidrofílicas de forma que esses agentes interagem com as macromoléculas interrompendo a rede de ligações

intermoleculares dos biopolímeros. Nesses sistemas plastificados normalmente a resistência à tração e o módulo diminuem enquanto o alongamento na ruptura aumenta [37]. Além disso é comum se perceber uma maior hidrofiliidade com a adição de moléculas plastificantes em polissacarídeos [59].

Poucos estudos relatam o efeito de diferentes plastificantes para a quitosana termoplástica, além do glicerol. Matet e colaboradores investigaram o efeito de três polióis como plastificantes não voláteis da quitosana, a saber o glicerol, o xilitol e o sorbitol (Figura 2.3).

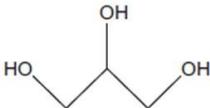
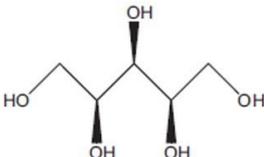
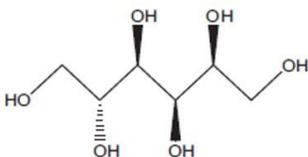
	Glicerol	Xilitol	Sorbitol
			
Ponto de fusão (°C)	20	94	95
Ponto de ebulição (°C)	182	216	296
Massa molar (g/mol)	92,1	152,2	182,2
Número de grupos OH	3	5	6

Figura 2.6 – Principais características do glicerol, xilitol e Sorbitol. Imagem adaptada da ref [27].

Através da espectroscopia no infravermelho foi verificado que nenhum polioli interagiu com os íons amônio (amina protonada) [27]. Seja qual for o polioli, a banda de absorção NH^{3+} apareceu no mesmo número de onda e a banda de absorção de $\text{C}=\text{O}$ (amida I) muda para um número de onda mais baixo, quando o teor de polioli aumenta. Essa mudança indica que os polióis interagem com a quitosana através dos grupos amida e hidroxila, e as ligações de hidrogênio formadas entre o ácido acético e os grupos amida da quitosana são substituídas pelas interações entre os polióis e quitosana nas amostras plastificadas. Quanto à microestrutura da quitosana o uso do plastificante glicerol apresentou o maior conteúdo amorfo inclusive apresentando maiores espaçamentos entre as camadas que foram preenchidos com material amorfo (Figura 2.7). Quanto a

estabilidade térmica o material contendo o poliol de maior massa molar obviamente apresentou maior temperatura de degradação térmica e maior resistência à tração. Enquanto que o glicerol foi o plastificante que resultou na menor resistência à tração. Os resultados de propriedades mecânicas estão de acordo com os resultados de DRX (cristalinidade) e foram justificados por uma possível recristalização do sorbitol à temperatura ambiente [27].

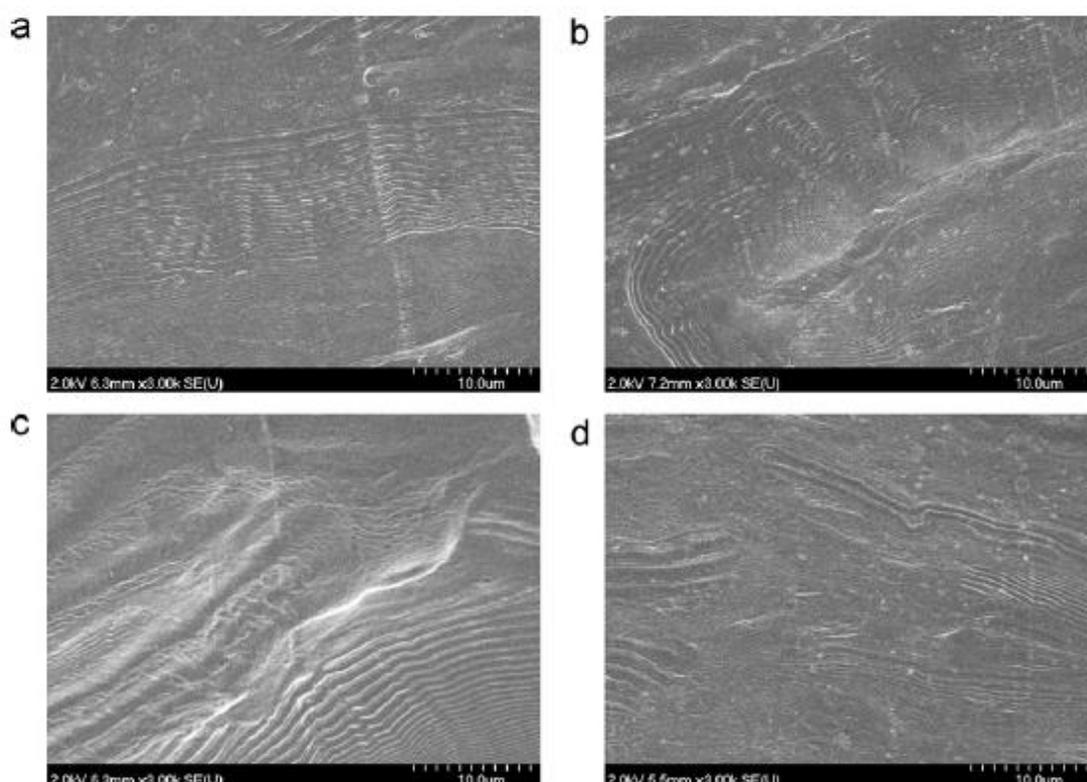


Figura 2.7 – Micrografia eletrônica de varredura da quitosana termomecânicamente processada (a) na ausência de plastificantes; e na presença de (b) glicerol; (c) xilitol e (d) sorbitol. Imagem extraída da ref [27].

Apesar do glicerol ser o plastificante mais amplamente utilizado para biopolímeros devido à sua não volatilidade e hidrofiliabilidade correspondente, nos últimos anos, os líquidos iônicos (LIs) têm atraído muita atenção para o processamento e plastificação de biopolímeros, especialmente o amido [51]. Os LIs contêm um ânion de aceitação de ligação de hidrogênio fortemente básico (por exemplo, carboxilatos ou halogenetos) e podem romper efetivamente as redes de ligações de hidrogênio do biopolímero. Chen e colaboradores avaliaram

os efeitos de diferentes plastificantes com diferentes polaridades e hidrofiliidades, a saber, glicerol, triacetina e acetato de 1-etil-3-metilimidazólio, na estrutura e propriedades da quitosana e blendas de quitosana / alginato processados termomecanicamente [51]. Devido à sua hidrofobicidade, a triacetina (um éster de glicerol e ácido acético) apresentou uma interação fraca com a quitosana. Para as blendas de quitosana/alginato as superfícies apresentaram-se menos coesas que as superfícies de quitosana termoplástica. Devido à carga negativa do alginato interagindo com a carga positiva da quitosana houve uma menor interação entre os biopolímeros e os plastificantes [51]. Para ambas as matrizes (quitosana e quitosana / alginato), a inclusão de triacetina diminuiu a ductilidade e a resistência à tração possivelmente devido à baixa compatibilidade entre a triacetinas e os biopolímeros. Enquanto que o líquido iônico (1-etil-3-metilimidazólio) e o glicerol promoveram um aumento na deformabilidade de ~75% da matriz de quitosana para ~200 e ~160%, respectivamente para as matrizes de quitosana e quitosana / alginato. Os autores sugeriram que o glicerol é mais vantajoso para a plastificação da quitosana do que os LIs porque os grupos terminais hidrofóbicos (ligação C-H) do glicerol podem impedir uma quantidade de ligação de hidrogênio excessiva entre as cadeias de quitosana, enquanto os LIs, que têm capacidade de ligação de hidrogênio mais forte e podem formar múltiplas ligações de hidrogênio com a cadeia de quitosana e, assim, limitar a mobilidade da cadeia apresentando um efeito antiplastificante. Ou seja, se a interação é extremamente alta o efeito de plastificante fica comprometido pelo excesso de interações com a matriz.

Estruturação hierárquica da quitosana

A microestrutura da quitosana termomecanicamente plastificada (quitosana termoplástica) foi investigada por Meng e colaboradores através de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica [1]. Além da identificação do mecanismo de desestruturação da quitosana durante o processamento termomecânico na presença do ácido láctico como agente desestruturante e como plastificante secundário, neste trabalho foram adicionados teores crescentes de glicerol e água como plastificantes primários e

a influência sobre a morfologia e cristalinidade foram analisadas. Meng e colaboradores observaram que o processamento termomecânico da quitosana na presença de plastificantes gera microestruturas complexas que são organizadas hierarquicamente sob os efeitos de tensão de cisalhamento e energia térmica.

Assumindo uma analogia à estrutura hierárquica da quitina [60], os autores definiram cada nível estrutural de acordo com as observações obtidas naquela pesquisa [1]. O comprimento da cadeia das moléculas de quitosana foi estimado a partir da massa molar viscosimétrica obtida através da medição da viscosidade intrínseca e do alto grau de desacetilação (GD) de forma que a quitosana usada naquele estudo consistia em cadeias com um comprimento médio de ~670 nm. O próximo nível estrutural seriam nanofibrilas cristalinas estreitas e longas, com cerca de 3–5 nm de diâmetro, compostas de 18–25 moléculas de quitosana (assumindo analogia à estrutura hierárquica da quitina [60]), que não foram observadas nesse estudo. Essas nanofibrilas de quitosana atuam como núcleos cristalinos entre si para formar aglomerados de nanofibrilas. No trabalho de Meng estruturas com comprimentos de cerca de 1 a 4 μm foram associadas a tais aglomerados nanofibrilares [1]. Com o aumento no teor de glicerol a cristalinidade diminui e a população de aglomerados nanofibrilares na superfície de fratura também diminui e mais áreas lisas relacionadas às cadeias amorfas são observadas. O próximo nível estrutural mais alto consistiu na formação de feixes de alguns desses aglomerados nanofibrilares em microfibras longas de cerca de 1 a 3 μm de diâmetro. A figura 2.8 ilustra esquematicamente os diferentes níveis hierárquicos da quitosana.

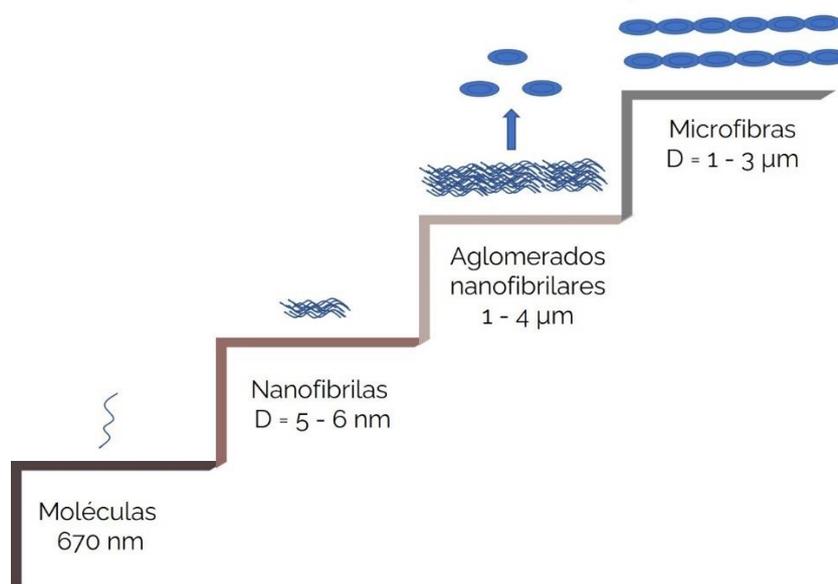


Figura 2.8 – Representação dos diferentes níveis estruturais da quitosana com suas dimensões aproximadas de comprimento ou diâmetro (D). Fonte: própria autora.

Para visualizar tais microfibras, Meng et al imergiram um pequeno disco moldado por compressão de amostra de quitosana processada na presença de AL concentrado (CS-2CLA) em água deionizada por 48 h. Durante a imersão, a amostra ficou inchada e algumas “cordas” emaranhadas, que são longas microfibras, como mostrado na Figura 2.9, foram liberadas da superfície da amostra. Os feixes de microfibras longas emaranhadas são claramente observados na Figura 2.9 (B). Este experimento serviu de base para a experimentação delineada para esta tese visando a observação das estruturas cristalinas obtidas nesta pesquisa de doutorado.

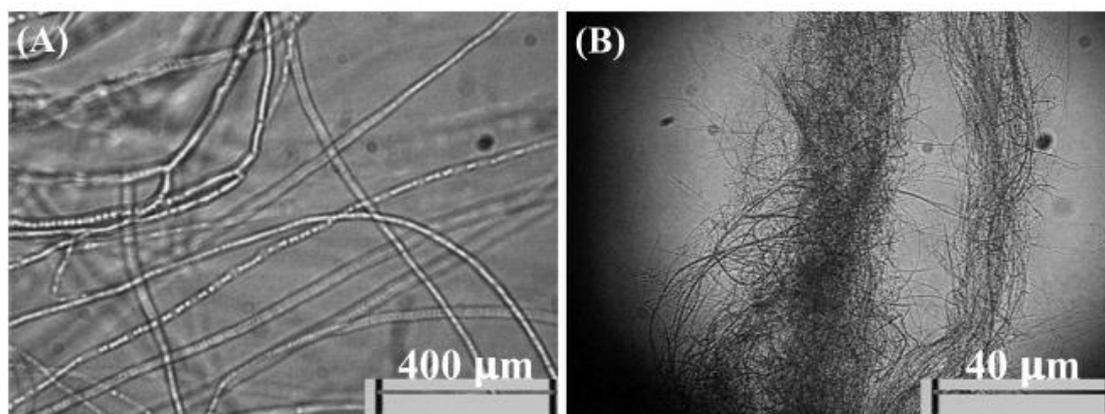


Figura 2.9 – Imagens de microscopia ótica das fibras liberadas da amostra de quitosana processada termomecanicamente na presença de AL concentrado após inchaço em água deionizada por 48 h para duas ampliações diferentes. Extraída da ref. [1].

Meng e colaboradores afirmam que estas microfibras, que foram destacadas da superfície da amostra CS-2CLA com água, são as microfibras residuais que não foram subdivididas durante a plastificação. Os autores afirmam que a diminuição da cristalinidade e o desaparecimento dos aglomerados de nanofibrilas nas imagens de MEV estão associados com o aumento do teor de plastificantes e indicam a quebra dos maiores níveis estruturais em direção às nanofibrilas de quitosana e cadeias moleculares; acredita-se que a cristalinidade remanescente da amostra com maiores teores de plastificantes seja principalmente devido às nanofibrilas de quitosana.

Os autores afirmam que essas estruturas, que incluem várias unidades estruturais compostas por moléculas amorfas, nanofibrilas, aglomerados de nanofibrilas e microfibras longas, são produzidas sob os efeitos de tensão de cisalhamento e energia térmica. Essas várias unidades estruturais atuam como reforço mecânico para a fase amorfa em materiais de quitosana processados termomecanicamente [1]. Tais estruturas jamais foram observadas em materiais produzidos por *casting* por apresentarem morfologia dissemelhante a dos materiais termomecanicamente processados e, conseqüentemente, propriedades distintas.

Vale ressaltar que a ocorrência dessas longas microfibras pode ser devido a um processo de recristalização da quitosana e não propriamente de um remanescente cristalino apenas. Uma vez que um acompanhamento por DRX não foi obtido imediatamente após o processamento e após o tempo de armazenamento. Nesta tese observaremos que a desestruturação da quitosana é bastante efetiva para gerar um remanescente cristalino de tão alto nível estrutural podendo estas estruturas terem sido geradas a partir de uma recristalização tendo nanofibrilas remanescentes como núcleos cristalinos.

2.2.3 Comportamento mecânico da quitosana

A quitosana apresenta comportamento mecânico que pode ser influenciado pelo grau de desacetilação (GD), massa molar, e, principalmente, se foi processada na presença de plastificante. A presença de glicerol e do surfactante Tween 20 em filmes de quitosana preparados por *casting* causou diferenças significativas na resistência à tração (RT) e alongamento na ruptura (E%), independentemente do GD [31]. As curvas tensão-deformação na figura 2.10 (esquerda) indicam que os filmes sem aditivos apresentaram maior RT e os filmes sem glicerol apresentaram menores E%. Na ausência de glicerol na formulação, a presença de Tween causou um decréscimo da RT (significativo apenas para 96% de DD) e significativa redução de E para ambos os tipos de quitosana (GD = 96 e 60%). De forma geral percebe-se através das curvas na figura 2.10 (à esquerda) que os filmes de quitosana na ausência de plastificantes apresenta um perfil semelhante ao perfil de um polímero termoplástico com limite de escoamento bem definido. À medida que o teor de glicerol aumenta a curva se assemelha à curva de um polímero de comportamento borrachoso.

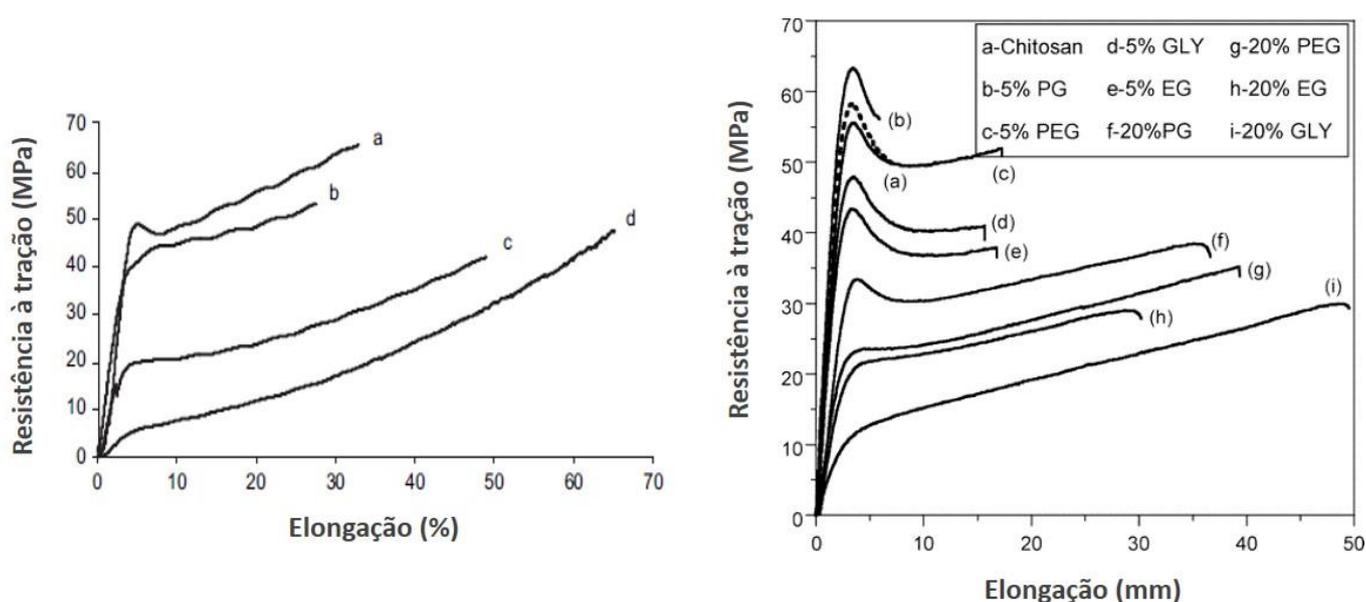


Figura 2.10 – Curvas tensão-deformação de filmes à base de quitosana GD 96% com diferentes aditivos. À esquerda: (a) Sem aditivos, (b) 5% Tween 20, (c) 20% Gly–5% Tween 20 e (d) 20% Gly [31] e à direita: curvas de tensão-deformação de filmes com diferentes teores de glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), poli (etilenoglicol) (PEG) e propilenoglicol (PG) [37].

As propriedades mecânicas de filmes de quitosana plastificados com quatro compostos hidrofílicos, a saber, glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), poli (etilenoglicol) (PEG) e propilenoglicol (PG) preparados por *casting* foram investigadas e estão apresentadas na figura 2.12 à esquerda [37]. Percebe-se que o glicerol apresenta maior efeito plastificante de forma que o aumento no teor do plastificante torna o comportamento com maior perfil de material borrachoso.

A figura 2.11 apresenta curvas tensão-deformação de filmes à base de quitosana termomecanicamente processada com 15% de glicerol (série X) e sua blenda com 50% de alginato (série Y) (figura 2.11 à esquerda) [51] e curvas tensão-deformação de filmes à base de quitosana termomecanicamente processada com 7,5 e 15% de glicerol e diferentes composições formando blendas com gelatina (à direita) [56].

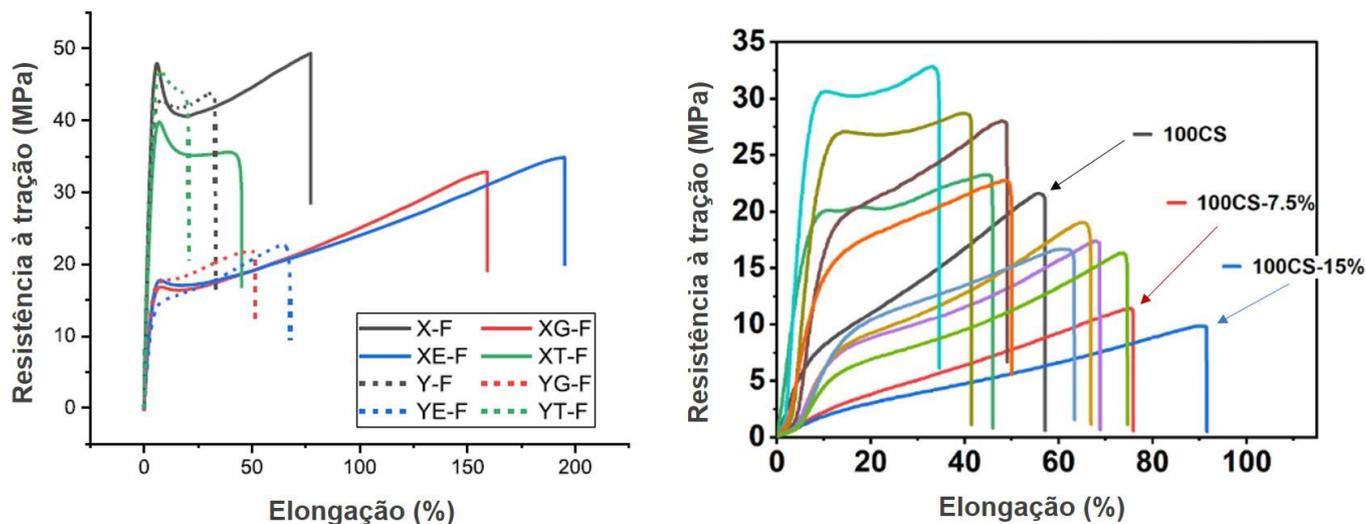


Figura 2.11 – Comportamento mecânico da quitosana termomecanicamente processada apenas com ácido fórmico (X-F) e com os aditivos: glicerol (XG-F), 1-etil-3-metilimidazólio (XE-F) e triacetina (XT-F) à esquerda [51] e da quitosana termoplástica com 0, 7,5 e 15% de glicerol (curvas destacadas à direita) [56].

Considerando-se apenas as curvas da quitosana termoplástica sem mistura com alginato ou gelatina observa-se que a quitosana termomecanicamente processada também apresenta uma tendência de tenacificação com a adição de plastificantes hidrofílicos tornando suas respectivas curvas tensão-deformação semelhantes à de materiais com comportamento mecânico borrachoso. Ressalta-se que a quitosana da imagem 2.11 à esquerda [51] foi processada com ácido fórmico de menor poder plastificante enquanto que a quitosana das curvas à direita [56] foi processada com ácido acético que apresenta maior tamanho e conseqüentemente maior capacidade de atuar como plastificante secundário resultando em materiais com menores módulos de elasticidade mesmo com menores teores de plastificantes.

2.3 Mecanismo de falha mecânica em materiais poliméricos

Para o entendimento das estruturas cristalinas existentes nos materiais obtidos nesta tese foi idealizado um experimento de fratura dúctil em baixa temperatura. Portanto para uma análise morfológica adequada de fraturas

dúcteis em materiais poliméricos faz-se necessário a compreensão dos mecanismos de deformação que estes materiais sofrem antes desse tipo de processo de fratura. Para tanto será abordado os principais aspectos dos processos de escoamento por cisalhamento (*shear yielding*) e microfibrilamento (*crazing*).

Num ensaio mecânico, à medida que o processo de fratura avança mediante uma tensão de tração dois mecanismos podem acontecer para dissipar parte da energia aplicada nos materiais poliméricos de forma a retardar o processo de fratura: escoamento por cisalhamento (*shear yielding*) e microfibrilamento (*crazing*). Foi convencionalizado que quando o microfibrilamento é dominante, este mecanismo é considerado um precursor da ruptura frágil do material [61]. Ao contrário do microfibrilamento, acredita-se que o escoamento por cisalhamento precede a falha dúctil porque a fratura envolve deformações relativamente grandes [62]. Esta convenção é usada em estimativas simples de engenharia para determinar qual desses mecanismos é dominante em um determinado estado de tensão e temperatura. Embora a propagação instável de trincas em polímeros vítreos seja precedida por microfissuração, o inverso não é totalmente verdadeiro: a fissuração pode ocorrer após a deformação plástica ou existir de forma estável em blendas de polímeros vítreos como HIPS ou ABS [63].

O escoamento por cisalhamento é a deformação plástica na forma de bandas de cisalhamento que está intimamente ligada ao amolecimento do material que é observado logo após o escoamento [63]. Após deformação adicional, o material endurece devido à orientação molecular e isso leva à multiplicação e propagação de bandas de cisalhamento. De acordo com este mecanismo o “amolecimento” do material é caracterizado através da curva tensão-deformação típica conforme os perfis na figura 2.11 à esquerda onde após o limite de escoamento bem definido há uma diminuição da tensão necessária para deformar o material (amolecimento). Após isso o endurecimento do material pode ser caracterizado pelo aumento na resistência à tração pelo tensionamento das cadeias orientadas preconizando a fratura no ponto de limite de resistência à tração (LRT). Um elevado grau de amolecimento por

deformação leva a formação de bandas de cisalhamento que são regiões planas e finas de alta deformação [64].

Considerando-se que as curvas tensão-deformação da quitosana plastificada geralmente não apresentam um limite de escoamento definido seguido de uma queda na resistência a tração que caracteriza o “amolecimento” necessário para o mecanismo de escoamento por cisalhamento é razoável que este mecanismo de fratura para este material seja desconsiderado. Entretanto para fins de ilustração, a figura 2.12 ilustra a morfologia da superfície de fratura da blenda de poliestireno e partículas de polibutadieno graftizada com poliestireno *core-shell* (PS/PB-g-PS). Os rasgos dúcteis podem ser facilmente observados na superfície da fratura. Este tipo de deformação plástica implica que ocorreu o escoamento por cisalhamento da matriz PS [65].

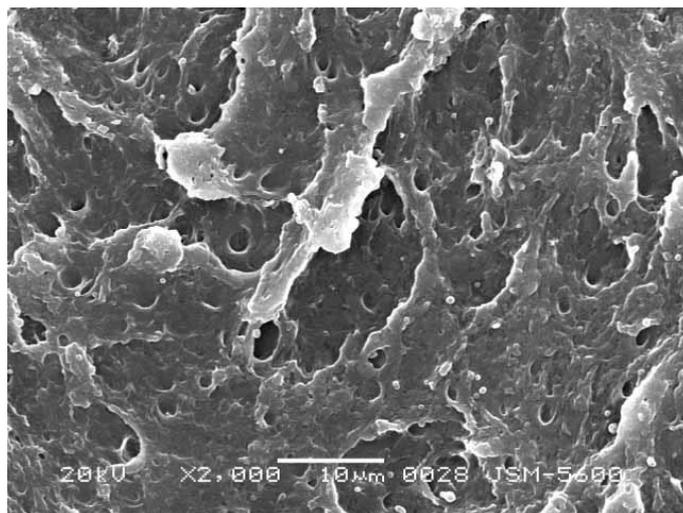


Figura 2.12 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície de fratura de uma mistura PS/PB-g-PS sob condições de impacto entalhado [65].

O microfibrilamento é um mecanismo de fratura em materiais dúcteis e frágeis originado pela nucleação de microvazios em regiões de concentrações de tensão e principalmente normais à tensão principal máxima. Esses vazios não coalescem para formar rachaduras, pois cadeias moleculares altamente orientadas estabilizam esse processo criando microfibrilas (*crazes*) por ação do escoamento do material no sentido da tensão aplicada leva à geração de fissuras

perpendiculares ao sentido da tração, essas fissuras são, portanto, constituídas por microvazios e fibras (ou *crazes*) [66]. No entanto, após o crescimento do *craze*, as fibrilas se quebram e uma microfissura é formada. À medida que as fissuras se estendem, a plasticidade se desenvolve até que uma propagação instável de trincas ocorra quando as fibrilas da fissura começam a se romper. Assim, a largura crítica de uma microfibrila parece ser uma característica chave na tenacidade dos polímeros vítreos [63]. Segundo Canevarolo as fibrilas têm diâmetro da ordem de 10 a 40 nm, e estão dispersas em cavidades de 10 a 20 nm de diâmetro [67].

É importante ressaltar que o microfibrilamento (*crazing*) não é um vazio nem uma trinca, mas sim uma combinação de microfibrilas (*crazes*) com cadeias poliméricas altamente orientadas intercaladas por vazios, e que são capazes de transmitir cargas.

Um exemplo de micrografia evidenciando o mecanismo de microfibrilamento em PLLA preenchido com 3% de nanofibras de quitina organodispersíveis (B-AChNF) pode ser visto na figura 2.13 [66]. Conforme mostrado na figura 2.13, ocorrem discrepâncias entre as morfologias de PLLA original e o compósito de 3% em peso B-AChNF (PLLA_3). Na área de clareamento (figura 2.13 (a)), PLLA exibiu uma aparência lisa sem qualquer deformação plástica observável, enquanto a superfície PLLA_3 (figura 2.13 (c)) exibiu fibras adequadas ligando os micro-vazios e *crazes* (setas vermelhas) de forma que a adição de B-AChNF gerou concentradores de tensão resultando na formação de *crazes* na matriz de PLLA perpendiculares à direção da tensão. Na superfície fraturada dos espécimes, poucas fibras são visíveis no PLLA primitivo, e apenas uma deformação plástica desprezível é mostrada (figura 2.13 (b)) já para o nanocompósito (PLLA_3), uma superfície rugosa com características protuberantes é observada, que se originou das fraturas das microfissuras no PLLA_3 (figura 2.13 (d)). Estes achados morfológicos estão de acordo com a característica dúctil no resultado da tração (figura 2.13 (e)).

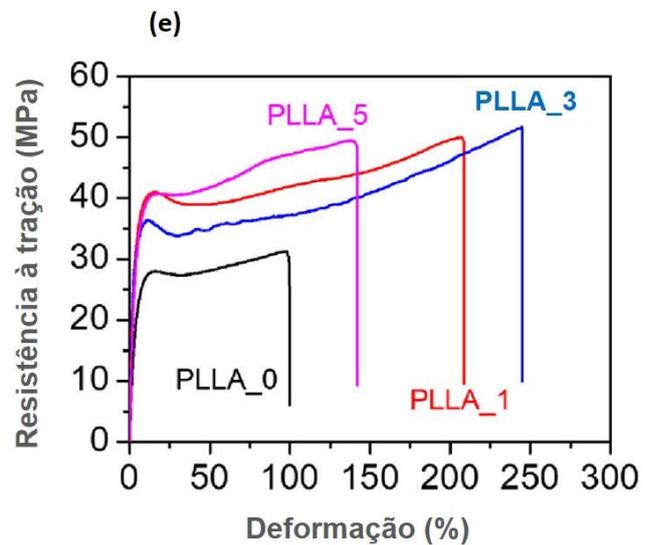
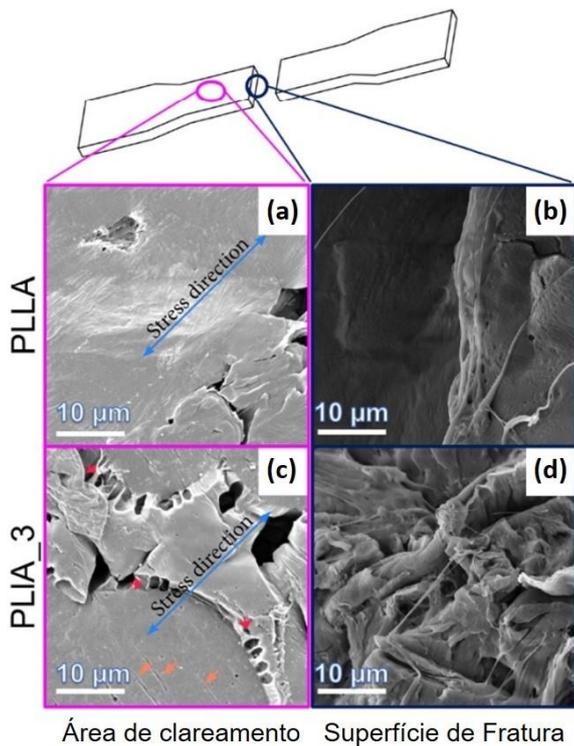


Figura 2.13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do poli(ácido l-láctico) (PLLA) (a e b) e PLLA/B-AChNF (nanofibras de quitina moídas por bola) 3% em peso (PLLA_3; c e d) na área de clareamento e superfície de fratura de corpos de prova de tração e curvas de tensão-deformação de nanocompósitos de poli (ácido l-láctico) com teores de nanofibras de quitina moídas por bola variando de 0 a 5 (e) [66].

Em tempo, o efeito de branqueamento (*whitening*) é definido como a formação de regiões esbranquiçadas que podem surgir devido a processamento ou esforços mecânicos em polímeros. Esse efeito é associado ao processo de cavitação, onde ocorre nucleação e crescimento de microvazios.

De forma geral a tenacidade real depende da competição entre a plasticidade e a microfissuração. Estevez e colaboradores discorrem que do ponto de vista das propriedades do material, essa relação é controlada principalmente pela relação entre a escala de tempo do fluxo plástico e o aumento da microfibrila. Foi concluído que a taxa de abertura do *craze* governa a competição entre o escoamento por cisalhamento e a ruptura frágil por microfibrilamento [53,63,67].

Ressalta-se que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que identificou a ocorrência dos mecanismos de microfibrilação ou escoamento por cisalhamento em materiais com matriz à base de quitosana. Dessa forma as estruturas visualizadas na análise morfológica da presente pesquisa de doutorado não foram relacionadas diretamente a tais fenômenos.

2.4 Propriedades Biológicas da Quitosana

A quitosana apresenta diversas vantagens em aplicações biomédicas tais como a biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, bioatividade e biodegradabilidade controlada, resultando em produtos de degradação que não são tóxicos que não produzem reações inflamatórias [68]. Sua degradação *in vivo* leva à liberação de aminoaçucares, as glicosaminas (monômeros desacetilados), que podem ser incorporados nas vias metabólicas dos glicosaminoglicanos e glicoproteínas, ou excretados [69]; uma vez que as glicosaminas são constituintes naturais da matriz extracelular humana. Sivashankari and Prabakaran assinalam que dentre os materiais naturais, a quitosana é a preferida por imitar a matriz extracelular (MEC) das células humanas [70].

Devido à sua natureza policatiônica única, não tóxica, antimicrobiana e biorreabsorvível, a quitosana em seu estado protonado é um excelente mucoadesivo de forma que em seu estado intumescido é um polímero bioadesivo natural que pode aderir a tecidos duros e moles. Boa adesão foi encontrada nos tecidos epiteliais e no revestimento mucoso presente na superfície dos tecidos [68].

Outras propriedades biológicas, e não menos importante, são a hemostasia, analgesia, ação antioxidante e anti-inflamatória [71]. Os agentes hemostáticos derivados da quitosana têm sido utilizados clinicamente para o controle do sangramento cirúrgico e pós-extração dentária. O caráter policatiônico influencia diretamente a atividade coagulante da quitosana devido aos grupos amino na quitosana que, na realidade, interagem com membranas negativamente carregadas dos glóbulos vermelhos.

A quitosana formulada para o tratamento de feridas pode induzir a analgesia, proporcionando um efeito fresco, agradável e reconfortante quando aplicado a uma ferida aberta. Além disso, a quitosana exerce efeitos anti-inflamatórios inibindo a expressão da prostaglandina E2 e da proteína ciclooxigenase-2 e atenuando as citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β) [72].

Todas essas propriedades e características provém à quitosana um amplo espectro de aplicações em campos médicos, como administração controlada de medicamentos, cobertura de feridas, arcabouços em engenharia de tecidos, anticoagulante sanguíneo e agente antimicrobiano [73]

A quitosana também é bastante utilizada para incrementar a bioatividade de outros materiais devido às múltiplas funções deste biopolímero. Pillai, Paul e Sharma apresentaram uma compilação do efeito de algumas misturas de quitosana com outras fibras [24]. A cultura *in vitro* de fibroblastos do tecido conjuntivo de ratos L929 evidenciou que as quitosanas de baixa massa molar eram mais eficazes para promover e acelerar a proliferação celular, particularmente para os arcabouços que continham 30% em peso de quitosana [74]. As membranas contendo quitosana podem imitar a estrutura das matrizes extracelulares naturais e têm o potencial de aplicação como estruturas tridimensionais de engenharia de tecidos para cultura de fibroblastos de pele de embrião humano [75]. Os fibroblastos são células de grande importância em estudos citológicos pois são responsáveis por produzir a matriz extracelular e o colágeno da pele [76].

Algumas características funcionais da quitosana tais como atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e capacidade de reabsorção, citocompatibilidade, bioatividade, biocompatibilidade e antialergenicidade valem ser mais bem comentadas pois são de grande consenso na literatura e muito requeridas em aplicações biomédicas e no projeto de novos materiais para aplicações biomédicas. Dessa forma a seção anexa (anexo A) contém maiores detalhes acerca de estudos comprovando as propriedades biológicas citadas da quitosana.

2.4.1 Aplicações biomédicas da quitosana

Em aplicações médicas a quitosana foi usada inicialmente como coberturas de feridas, suplemento para emagrecimento e em aplicações na engenharia de tecidos, no entanto, com o tempo, a quitosana se desenvolveu como um candidato proeminente para o sistema de liberação de drogas [77].

Na engenharia de tecidos, os campos mais relevantes da aplicação da quitosana que mais se desenvolveram nos últimos anos são: engenharia de tecidos de cartilagem, engenharia de tecidos ósseos, engenharia de tecidos de discos intervertebrais, engenharia de tecidos de vasos sanguíneos, regeneração de córnea, engenharia de tecidos de pele, fixação de tecidos e engenharia de tecidos periodontais [21]. Estudos extensivos usando quitosana em combinação com materiais naturais e sintéticos foram relatados na produção de *scaffolds* multifuncionais para aplicações de engenharia de tecidos [72,78,79].

No gerenciamento de feridas muitas pesquisas são desenvolvidas uma vez que a ferida é um desafio de saúde crescente que afeta várias milhões de pessoas em todo o mundo. Distúrbios do estilo de vida, como diabetes ou infecções, aumentam o risco de complicações da ferida. De acordo com estatísticas da OMS [80], 58 milhões de pessoas são afetadas por lesões fatais, entre as quais 5 milhões de pessoas morrem a cada ano, esse valor representa 9% das mortes no mundo. E os vários milhões de pessoas restantes requerem tratamento e cuidados adequados. A gestão eficaz da ferida é muitas vezes difícil devido à complexidade do processo de cicatrização. Além das práticas convencionais de tratamento de feridas, os polímeros bioativos estão ganhando cada vez mais importância no tratamento de feridas [81].

Materiais bioativos à base de quitosana têm sido amplamente utilizados no gerenciamento de feridas nas últimas décadas. Como cobertura de feridas, o material à base de quitosana estimula o fechamento, neovascularização e regeneração permanente da derme em feridas. Esses biomateriais também reduzem o risco de amputação em pacientes. Assim, coberturas inovadoras à base de quitosana podem ser usadas para prevenir infecções de feridas devido às suas propriedades antimicrobianas intrínsecas. Além disso, a quitosana pode ser usada como um veículo de liberação lenta de drogas para fatores de

crescimento em locais de feridas para estimular e melhorar a cicatrização de feridas. [26].

Diversos trabalhos de pesquisa sugeriram a quitosana como agente de cura de feridas e reconhecem o uso de quitosana e seus derivados como uma cobertura ideal para feridas [82–89]. A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve coagulação, inflamação e síntese de matriz. A formação de cicatriz hipertrófica é um grande desafio para a ciência médica. Cicatrizes hipertróficas são formadas devido à atividade desbalanceada dos colágenos tipo I e tipo III. No entanto, o uso de quitosana como coberturas não deixou cicatriz quando aplicado a feridas abertas em animais [32], [33], [34]. Quando a quitosana parcialmente desacetilada sofre uma leve despolimerização ocorre a liberação de unidades acetiladas (N-acetil- β -d-glicosamina), que inicia a proliferação de fibroblastos durante o processo de cicatrização de feridas. Os monômeros de quitosana ajudam na deposição ordenada de colágeno e estimulam o aumento do nível de síntese de ácido hialurônico natural no local da ferida. A quitosana fornece uma matriz celulósica para a regeneração dos tecidos da pele e ativa os macrófagos para interromper a atividade anormal do crescimento. Isso ajuda na cicatrização mais rápida da ferida e na prevenção da cicatriz hipertrófica [26].

2.4.1.1 Sistemas de liberação controlada de fármacos (SLC)

O desenvolvimento de sistemas eficientes de liberação de medicamentos que otimizam a ação farmacológica de medicamentos recebeu grande atenção nos últimos vinte anos [90]. A maioria das formas farmacêuticas convencionais, como comprimidos, cápsulas, cremes, loções e géis de liberação imediata, são pouco sofisticadas e apresentam um grande número de deficiências, como baixa biodisponibilidade, irritação cutânea e gástrica, reações adversas e efeitos tóxicos dos agentes ativos [91].

Os sistemas convencionais de liberação de fármacos (SCLFs) são geralmente desenvolvidos para administração oral, onde haverá liberação imediata e rápida absorção do fármaco. Além do fato de que os SCLFs geralmente são projetados para curtos períodos de tempo e requerem

administração repetida, esses sistemas exibem flutuações fora da faixa desejada à medida que a liberação do fármaco passa por picos e vales, atingindo níveis tóxicos mais altos ou absorção insuficiente do fármaco durante o período de administração (curvas vermelha e azul na figura 2.14) [92]. Assim, a tecnologia de liberação modificada de medicamentos representa uma das áreas mais importantes das Ciências Farmacêuticas, com o objetivo de contribuir para a saúde humana e animal, além de oferecer diversas vantagens (liberação sustentada, controlada e/ou entrega vetorizada (*site-specific*)) em comparação com as formas de dosagem convencionais [91].

Em sistemas de liberação controlada de drogas, a concentração do fármaco deve ser utilizada entre dois limites, referidos como a concentração mínima eficaz e a concentração máxima segura (acima da qual a dose atinge níveis tóxicos), para ser eficaz e não tóxico. Normalmente, uma droga é liberada de três maneiras (Figura 2.14): Liberação em explosão, na qual uma droga eventualmente se dissolve no meio circundante e libera toda a sua quantidade; liberação periódica, na qual um fármaco é liberado periodicamente e preserva sua concentração com alta flutuação entre os dois limites; e liberação de ordem zero, na qual um fármaco é liberado em concentração constante sem variação significativa por um longo tempo. A liberação de ordem zero é a idealizada, mas um fármaco geralmente é liberado em três fases: Fase I, liberação em explosão devido à liberação do fármaco nas proximidades da superfície e camada hidratada em água (efeito *burst*); Fase II, liberação de taxa lenta devido à taxa de liberação controlada ocorre pela taxa de difusão da água na estrutura; e Fase III, liberação rápida devido ao início da degradação da estrutura. Portanto, a capacidade de controlar a liberação do fármaco é crucial no projeto de um carreador de fármaco [93]. A curva de liberação controlada ou de ordem zero (em verde) na figura 2.14 não apresenta a fase 3 onde ocorre uma drástica diminuição da concentração do fármaco no plasma sanguíneo. O sistema de liberação sustentada consiste na manutenção do fármaco no plasma, porém com uma taxa mais lenta de decréscimo durante o tempo de ação em relação aos SCLFs.

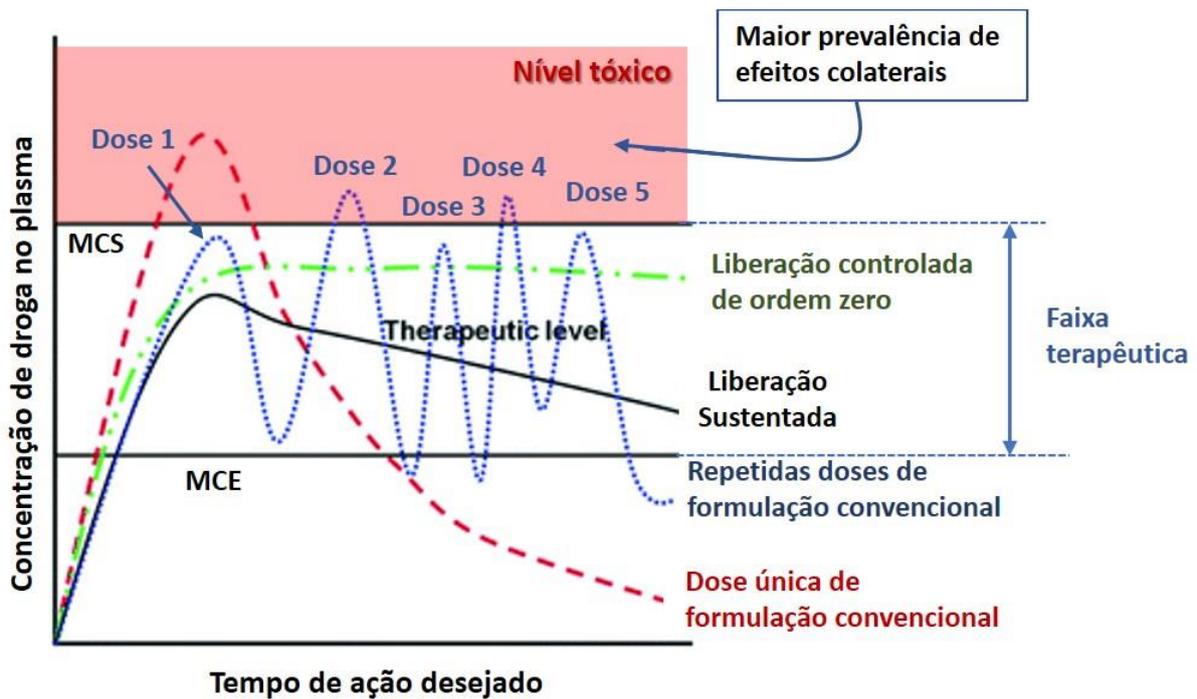


Figura 2.14 – Perfis de liberação de fármaco no plasma sanguíneo para comprimidos convencionais (curvas em vermelho e azul), sistemas de liberação sustentada (curva em preto) e sistemas de liberação controlada (curva em verde). MCE significa máxima concentração efetiva e MCS significa máxima concentração segura. Imagem extraída e adaptada da ref [94].

Algumas das grandes vantagens dos sistemas de liberação controlada ingeridos incluem: a dose total necessária é baixa, efeitos colaterais gastrointestinais reduzidos, frequência de dosagem reduzida, melhor aceitação e adesão do paciente, menor flutuação nos níveis plasmáticos de drogas, níveis de droga mais uniformes, relação eficácia/segurança melhorada.

Além dos sistemas de liberação de fármacos por ingestão, existe também uma ampla gama de sistemas transdérmicos de liberação controlada. Um material projetado como cobertura de feridas também pode atuar simultaneamente como um sistema de liberação controlada de fármacos [95–98].

Devido suas excepcionais propriedades biológicas, a quitosana e seus derivados ganharam enorme importância na formulação de biomateriais e permaneceu sob extensa exploração em sistemas de liberação de drogas [77].

Farmacologicamente, os carreadores de drogas poliméricas à base de quitosana têm sido utilizados com sucesso na entrega de agentes anticancerígenos, proteínas/peptídeos, fatores de crescimento, antibióticos, anti-inflamatórios e outros medicamentos, bem como uma estratégia na entrega de vacinas e terapia gênica [21]. A molécula da droga é então carregada, dissolvida, adsorvida passivamente ou quimicamente ligada à superfície do biopolímero [90].

A partir da natureza policatiônica da quitosana diferentes mecanismos de liberação podem ser utilizados para atuar como sistema de liberação controlada. Além disso, filmes bucais para administração transmucosa de fármacos, por exemplo, são capazes de proporcionar uma duração de atividade estendida permitindo dosagem e frequência mínimas e oferecer uma dose exata e flexível, associada à facilidade de manuseio [96].

Um hidrogel composto por uma rede polimérica semi-interpenetrante (semi-IPN) à base de um derivado de quitosana (N,O-carboximetilquitosana, NOCC) e alginato misturado com um agente de reticulação natural (genipina) foi desenvolvido para atuar como um sistema de liberação controlada como um hidrogel sensível ao pH para entrega de proteína (albumina de soro bovino, BSA). Os resultados apontaram que a quantidade de BSA liberada em pH 1,2 foi relativamente baixa (20%), enquanto a liberada em pH 7,4 aumentou significativamente (80%). Dessa forma o hidrogel NOCC/alginato reticulado com genipina pode ser um transportador polimérico adequado para a entrega de drogas proteicas específicas no intestino [95].

A quitosana atuou como membrana de suporte para liberação sustentada para nanopartículas lipídicas sólidas (FZ-SLNs) carregadas de fluconazol (FZ). As SLNs são uma formulação de nanopartículas lipídicas bem conhecida que é frequentemente usada topicamente para aumentar a permeabilidade de drogas lipofílicas. Estudos de permeação usando mucosa bucal porcina demonstraram que o FZ dos filmes de quitosana-FZ-SLNs (C-FS) foi mais permeável do que nos filmes de quitosana-FZ. A atividade antifúngica dos filmes C-FS foi avaliada contra *Candida albicans* e foram observadas claras zonas de inibição. Assim, os filmes C-FS representam um promissor carreador de drogas para o tratamento da candidíase via mucosa bucal [97].

Filmes bucais para administração transmucosa de fármacos são capazes de proporcionar uma duração de atividade estendida permitindo dosagem e frequência mínimas e oferecer uma dose exata e flexível, associada à facilidade de manuseio. Dessa forma filmes poliméricos à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com quitosana (CH) ou hialuronato de sódio (HA) ou gelatina (GEL) foram avaliados para a liberação sustentada de cloridrato de ondansetrona, um inibidor seletivo dos receptores 5-HT₃ indicado na pediatria para prevenção e tratamento de náuseas e vômitos causados por quimioterapia ou radioterapia citotóxica e no pós-operatório. A inclusão de GEL ou CH no filme de HPMC aumentou a liberação do fármaco *in vitro* em relação à inclusão de HA, embora filmes contendo HA tenham apresentado a maior absorção de água. De acordo com o comportamento de liberação, a inclusão de CH e GEL proporcionou maior permeação do fármaco em testes através da mucosa bucal suína em relação ao filme de HPMC e garantiu perfis de permeação linear do fármaco [96].

Hidrogéis de quitosana reticulada com ácido benzeno-1,3,5-tricarboxílico (BTC) foi avaliado como sistemas de liberação controlada de um composto hidrofílico e um composto hidrofóbico, a saber, Rodamina B e *Oil Red*, respectivamente como compostos modelos. O material ofereceu a vantagem de encapsulamento fácil dos compostos hidrofóbico e hidrofílico. Foi demonstrado que a liberação do corante hidrofílico dos hidrogéis de quitosana pode ser ajustada pelas concentrações de BTC/quitosana e pelos métodos de secagem do hidrogel. No entanto, a liberação do corante hidrofóbico encapsulado é insignificante [98].

2.4.1.2 Desafios na aplicabilidade da quitosana como biomaterial

A partir da revisão da literatura e fundamentação teórica fica evidente que a quitosana apesar de ser um recurso de origem abundante na natureza com um conjunto amplo e único de propriedades, ainda é um material subutilizado muito em função de sua baixa processabilidade, baixa estabilidade hidrolítica e do seu conjunto de propriedades mecânicas como alta rigidez, alta resistência à tração, baixa flexibilidade; ou alta flexibilidade e baixa resistência à tração, a depender

do teor de plastificante, onde essa combinação de propriedades dificulta sua aplicabilidade quando maiores resistências à tração e flexibilidades são requeridas associadamente. Assim este trabalho apresenta uma proposta de otimizar o material à base de quitosana por uma rota de processamento industrial na presença de ácido cítrico atuando como agente desestruturante e agente reticulante durante o processamento termomecânico além de um plastificante para obter materiais com estabilidade hidrolítica, resistência mecânica e flexibilidade. A hipótese desta tese é de que o ácido cítrico unicamente possa atuar como agente de desestruturação e agente de protonação para a quitosana termoplástica gerando estruturas reticuladas com propriedades mecânicas otimizadas e estabilidade em meio aquoso. Outra hipótese é de que a estrutura hidrofílica e biocompatível do ácido cítrico seja capaz de interferir nas propriedades físico-químicas dos materiais principalmente aumentando a capacidade de absorção de água podendo atuar como coberturas de feridas exsudativas e ainda com capacidade de incorporação e liberação de fármaco aprimorada.

Outro grande desafio em materiais à base de quitosana é a acidez proveniente do agente de protonação (ou agente desestruturante) necessário durante o processamento que pode induzir reações inflamatórias sérias de forma que sua neutralização se faz necessária. Muitos artigos ao desenvolverem os materiais à base de quitosana visando aplicações biomédicas procedem necessariamente a neutralização requerida, entretanto as propriedades finais dificilmente são relatadas [8–13]. Além disso a neutralização por imersão em soluções alcalinas pode promover algum nível de hidrólise além da solubilização do plastificante resultando num material final extremamente frágil e quebradiço. Considerando a necessidade de uma neutralização não hidrolítica associada à obtenção de materiais flexíveis e mecanicamente resistentes, uma nova abordagem de tratamento pós-processamento envolvendo a neutralização em meio tamponado e recuperação do plastificante solubilizado foi projetada para a obtenção de materiais funcionais à base de quitosana passíveis de utilização como biomaterial para cobertura de feridas.

A capacidade de absorção de água e retenção de exsudatos foi avaliada *in vitro* pelo balanço entre a capacidade de absorção de água em fluido tamponado e a transmissão de vapor de água do material neutralizado. Além disso, a incorporação e liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina um antibiótico hidrofílico de amplo espectro muito utilizado em aplicações dérmicas foi avaliado. Dessa forma o material idealizado foi processado por uma nova forma de processamento em escala ampliada de produtividade, caracterizado, neutralizado e novamente plastificado adquirindo propriedades mecânicas superiores e seu desempenho foi avaliado como um biomaterial para cicatrização de feridas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A quitosana com grau de desacetilação (DD) = 77% e viscosidade de 1% em massa da solução (87 mPa·s) foi adquirida da Primex (nome comercial ChitoClear® cg 400). O polissacarídeo é fornecido na forma de pó esbranquiçado (90,6% de matéria seca e 0,7% de resíduo de cinza), conforme informado na ficha do fabricante. Glicerol e ácido cítrico (ambos com 99,5% de pureza, da Labsynth), ácido acético (Fluka), solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH de 7,4 (Quimilab), Cloreto de cálcio anidro dessecante PA (Neon), nitrato de magnésio hexahidratado PA (Exodo) e lisozima (muramidase de clara de ovo de galinha, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram usados conforme recebidos. Água deionizada foi usada para a preparação das amostras.

3.2 Métodos

A metodologia para a obtenção da quitosana reticulada quimicamente com o ácido cítrico (AC) por processamento termomecânico foi composta pelas seguintes etapas: 1) Obtenção e caracterização de placas de quitosana pelo processamento termomecânico na presença de ácido cítrico (AC) em três concentrações diferentes; 2) Neutralização e reposição do glicerol solubilizado na neutralização do material selecionado na etapa 1 e avaliação das propriedades finais do material. Nas duas etapas as placas de quitosana processadas com AC foram comparadas com placas de quitosana tradicionalmente processadas na presença de ácido acético (HAc) como agente de desestruturação da quitosana. Os materiais foram armazenados a umidade relativa de 50% por um mínimo de 30 dias antes de cada caracterização. O fluxograma esquemático das etapas experimentais desta pesquisa é exibido na figura 3.1.

Etapas da Pesquisa

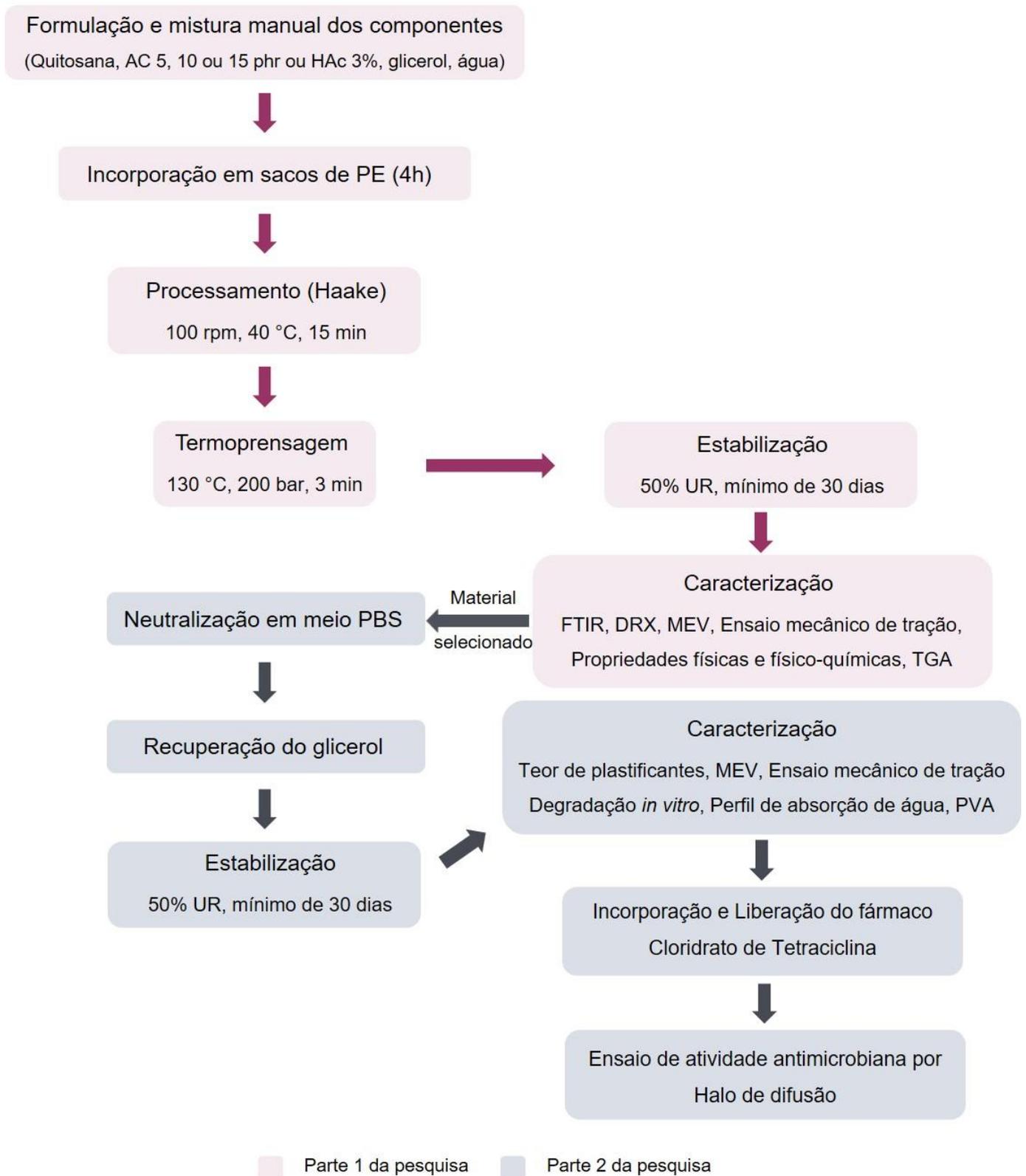


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas nesta tese.

3.2.1 Parte 1: Obtenção de Placas de Quitosanas Reticuladas com ácido cítrico por Processamento Termomecânico

A fabricação das placas de quitosana reticulada foi realizada a partir de uma adaptação da metodologia relatada por Epure e colaboradores [3] e Meng e colaboradores [1]. Considerando-se que o ácido cítrico (AC) apresenta 3 grupos ácido carboxílicos contra 1 grupo ácido do ácido acético (HAc), o teor de AC para processamento das amostras foi proporcional a 1/3 do equivalente molar ao teor de HAc utilizado no processamento da quitosana termoplástica (TPC) [30]. Inicialmente, a quitosana foi misturada manualmente ao glicerol de forma que a razão quitosana / glicerol foi de 67/33 (m / m) até que uma mistura homogênea fosse formada. 10 partes por cem (pcr) de ácido cítrico em relação à quantidade de quitosana foram dissolvidos em água de forma que a relação do teor de quitosana:água de 1:3 (m/v) fosse utilizada em todas as formulações desenvolvidas nesta pesquisa (Tabela 3.1). Paralelamente, concentrações de 5 e 15 pcr de AC também foram testadas na obtenção das placas à base de quitosana reticulada. Em seguida, a solução ácida foi adicionada lentamente à massa de quitosana e misturada manualmente para formar uma mistura homogênea. A mistura foi acondicionada em sacos de polietileno por 4 horas em temperatura ambiente para permitir a incorporação dos componentes na estrutura da quitosana. Para a obtenção da quitosana termoplástica como material de referência toda a formulação foi mantida idêntica à formulação da quitosana processada com AC substituindo-se apenas a solução de AC pela solução aquosa de ácido acético (HAc) a 3% (v/v).

Tabela 3.1 – Composição e designação das amostras em relação ao teor de quitosana.

Amostra	AC5	AC10	AC15	TPC
Teor de água (mL:g)	3:1	3:1	3:1	0
Teor de ácido cítrico (pcr)	5	10	15	0
Solução de ácido acético 3% (mL:g)	0	0	0	3:1
Teor de glicerol (g:g)	1:2	1:2	1:2	1:2

Em seguida, a pasta de quitosana foi então misturada mecanicamente em um reômetro de torque Haake Rheomix 600p com rotores contra rotacionais tipo roller a 40° C por 15 min, com uma velocidade de rotor de 100 rpm. Nesta etapa não ocorre a fusão do material, o cisalhamento promove a homogeneização da mistura sólida e a incorporação do AC e do glicerol na estrutura do pó da quitosana [1]. A temperatura amena foi usada para evitar a reticulação nesta fase do processamento e permitir uma moldagem adequada. Aproximadamente 12,5 g da pasta de quitosana processada foi colocada em um molde de aço retangular de 10 cm x 9 cm (espessura = 1,15 mm) e prensada a quente entre duas folhas de Teflon a 130 ° C e 200 bar de pressão por 3 minutos. As amostras produzidas com ~ 0,7 mm foram resfriadas à temperatura ambiente no próprio molde por 3 minutos. A alta temperatura na termopressagem possibilita a moldagem e a reticulação química do material.

Em seguida, as amostras foram acondicionadas numa caixa aberta por 2 dias para evaporação do excesso de água. Então esta caixa foi hermeticamente fechada e mantida a 25 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 3\%$ por pelo menos 30 dias antes da caracterização. Os materiais processados com 15, 10 e 5 pcr de AC são designados a partir de agora como AC15, AC10 e AC5, respectivamente, e as amostras processadas com HAc 3% foram designadas como TPC (“*thermoplastic chitosan*” [27]), conforme destacado na Tabela 3.1.

Os materiais reticulados com AC e o material de referência (TPC) foram caracterizados por espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada

de Fourier (FTIR), difratometria de raios-x (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaios de tração uniaxial, com relação às propriedades físicas e físico-químicas: por medidas de espessura, densidade, teor de água, teor de glicerol, absorção de água em solução tampão fosfato salina (PBS) e solubilidade, análise dimensional no estado intumescido e análise termogravimétrica (TGA). A metodologia para cada tipo de caracterização será descrita na seção 3.3. Após avaliação da caracterização de AC5, AC10 e AC15 a formulação avaliada com maior potencial para aplicação biomédica seguirá para a etapa de neutralização, caracterização e avaliação final.

3.2.2 Parte 2: Neutralização do material selecionado na etapa 1 e recuperação do glicerol

Após 1 semana de fabricação, as placas AC15 e TPC foram imersas num béquer de 1 L contendo solução tampão PBS (pH = 7,4) numa proporção de 1 placa / 250 mL de PBS sob agitação magnética lenta. Volumes apropriados de uma solução aquosa de NaOH 1,2 M foram adicionados sob monitoramento do pH até a estabilização do valor na faixa fisiológica entre 7,2 e 7,4 e então retirados da solução tampão. 1 h após as placas foram imersas em glicerol PA por 30 seg, 1 min e 2 min para recuperação do plastificante solubilizado na neutralização e garantir a flexibilidade dos materiais.

Após a incorporação do glicerol, as amostras foram acondicionadas numa caixa aberta por 2 dias para evaporação do excesso de água e então a caixa foi hermeticamente fechada e mantida a 25 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 3\%$ por pelo menos 30 dias antes da caracterização.

Os materiais neutralizados foram caracterizados inicialmente quanto aos teores de glicerol e água em cada amostra que passou por imersão em glicerol por tempos diferentes. Após isso os materiais foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaios de tração uniaxial, degradação *in vitro*, capacidade de absorção de água, permeação ao vapor de água (PVA), capacidade de incorporação e liberação de fármaco e atividade antimicrobiana por halo de difusão. A metodologia para cada tipo de caracterização será descrita na seção 3.3.

3.3 Técnicas de caracterização

3.3.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A modificação química da quitosana foi analisada por espectroscopia vibracional no infravermelho utilizando-se um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR) Nicolet 6700, ThermoScientific com sonda de diamante no modo ATR (*Attenuated total reflectance*). As medidas foram realizadas na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com uma média de 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Nenhuma preparação específica foi necessária para os ensaios, exceto para a obtenção do espectro do material AC15 após cisalhamento mecânico e antes da termoprensagem, onde o pó processado foi seco em estufa a 40° C por 15 h antes do ensaio.

3.3.2 Difratomia de Raios-x (DRX)

As análises da estrutura cristalina dos materiais processados foram realizadas por meio de um difratômetro Rigaku, Bruker D8 Advance, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$) com tensão e corrente de 40 kV e 25 mA, respectivamente. A faixa de ângulo foi varrida de 5° a 30° com passo de 0,02° a 2 seg/passos. A porcentagem de cristalinidade relativa (X_c) foi determinada a partir da Equação 3.1 [3].

$$X_c = \frac{A_c}{(A_c + A_a)} \times 100\% \quad (3.1)$$

Onde A_c e A_a representam as áreas sob os picos cristalinos e a linha de base do halo amorfo, respectivamente, usando o software Origin 9.0. O halo amorfo foi obtido de acordo com a figura 3.2.

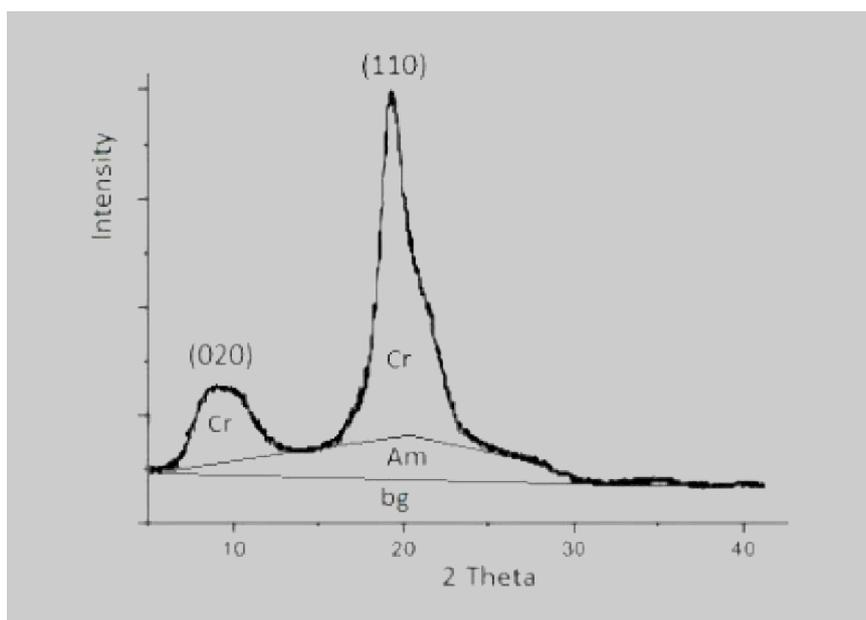


Figura 3.2 – Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade da quitosana. A linha bg significa linha de base ou background. Imagem extraída da ref [99].

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A superfície e a área criofraturada das placas de quitosana originais (como obtidas) e amostras TPC e AC15 neutralizadas e imersas em glicerol por 2 minutos (estabilizadas e não neutralizadas) foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura num microscópio XL-30 FEG, Philips. As superfícies visualizadas foram revestidas com ouro usando um sputter coater Balzers SCD 004 (Oerlikon Balzers) antes da análise.

Para a fratura frágil os materiais estabilizados (30 dias a UR = $50 \pm 3\%$) foram imersos em nitrogênio líquido $N_{2(liq)}$ por 1 hora. As imagens foram obtidas em diferentes ampliações usando uma tensão de 15 kV.

Para a análise detalhada da estrutura cristalina dos materiais, foram realizadas fraturas dúcteis em baixa temperatura dos materiais estabilizados e previamente inchados em água durante 24 h para favorecer o destacamento das fibras cristalinas da quitosana da fase amorfa, como observado no experimento de Meng e colaboradores [1]. A idealização deste experimento está

esquemática na figura 3.3. Para a fratura dúctil em baixa temperatura os materiais foram imersos em $N_{2(liq)}$ por 10 minutos.

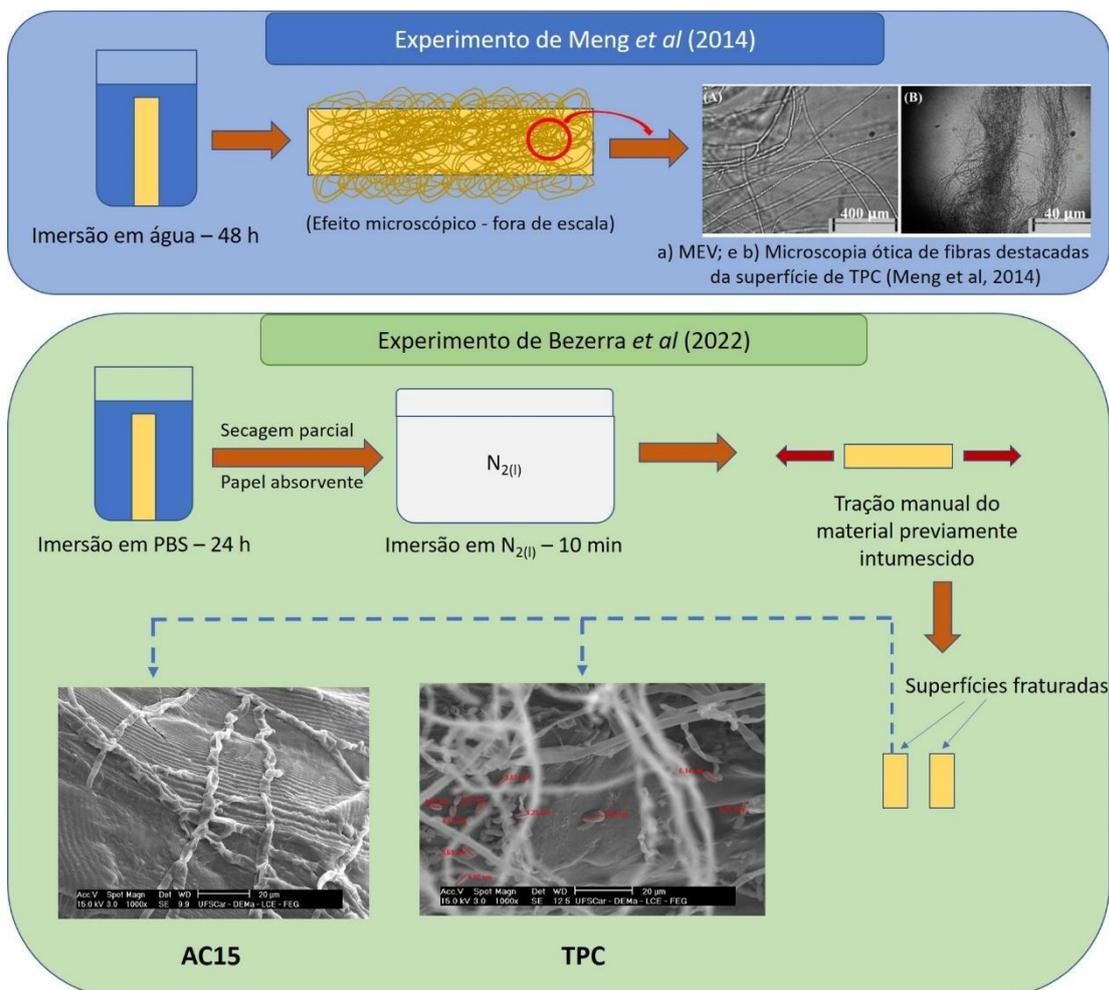


Figura 3.3 – Figura esquemática do experimento de Meng e colaboradores com ênfase para as fibras destacadas da superfície da quitosana termomecanicamente processado (a) e do experimento de Bezerra e colaboradores enfatizando as estruturas fibrosas destacadas da superfície de fratura após tratamento criogênico por 10 min (b).

Para a microscopia das fraturas frágeis obtidas das amostras AC15 neutras e imersas em glicerol por 0, 5, 30 e 60 seg foi utilizado um microscópio modelo Quanta FEG 650 marca Thermo Fisher Scientific (LCT – USP). A fratura frágil foi obtida após imersão em nitrogênio líquido $N_{2(liq)}$ por 1 hora. As imagens foram obtidas em diferentes ampliações usando uma tensão de 20 kV. A

condução foi feita com fita de carbono e a metalização de carbono utilizando-se equipamento da Bal-tec, modelo SCD-050.

3.3.4 Propriedades mecânica sob tração

Os testes de tração foram realizados numa máquina Instron 5569 (EUA) equipado com uma célula de carga de 500 N à temperatura ambiente, umidade relativa de aproximadamente 50% e uma taxa de deformação de 50 mm/min. Amostras de placas retangulares (20 mm x 80 mm x ~ 0,7 mm) foram usadas para a análise. As propriedades tensão-deformação (módulo de elasticidade, resistência à tração e alongamento na ruptura) foram determinadas a partir de uma média de seis medições. Testes semelhantes foram realizados em amostras imersas em solução PBS por 40 horas para avaliar a eficácia da reticulação química pelo AC nas propriedades mecânicas do material em condição úmida, de forma semelhante ao que pode ser obtido durante uma aplicação biomédica em meio fisiológico.

3.3.5 Propriedades físicas e físico-químicas

Espessura e Densidade

As placas à base de quitosana produzidas foram cortadas em círculos com 2,50 cm de diâmetro (D). Um paquímetro digital (Zaas Precision) foi usado para medir a espessura (h) em seis posições diferentes. O diâmetro e o valor médio das espessuras foram usados para calcular o volume (V) das amostras usando a equação 3.2.

$$V = \frac{\pi D^2 h}{4} \quad (3.2)$$

Onde: h = espessura média das amostras

A densidade (ρ) dos materiais à base de quitosana foi determinada em função do peso (m) e do volume ($\pi r^2 h$) usando a Equação 3.3.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (3.3)$$

Teor de água (TA), Solubilidade em água (SA) e Absorção de água (AA)

As análises físico-químicas das amostras foram realizadas com base no trabalho de Wu et al [46]. Em relação a essas medidas, quatro placas quadradas (20 mm x 20 mm) foram cortadas e pesadas (M_1), secas a 105° C por 2 h e pesadas novamente (M_2). As amostras secas foram então imersas em 30 mL de uma solução de PBS (para simular um fluido fisiológico) numa estufa a 37° C por 24 h. As amostras foram pesadas periodicamente por 7 horas até um tempo máximo de imersão de 24 horas, cada pesagem (M_3) foi apurada após a retirada da água superficial com papel absorvente. Por fim, as amostras foram secas em estufa a 105° C por 24 h, e cada massa (M_4) foi determinada. O TA (%), AA (%) e SA (%) de cada amostra foram determinados de acordo com as Equações 3.4, 3.5 e 3.6.

$$TA = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100\% \quad (3.4)$$

$$AA = \frac{(M_3 - M_2)}{M_2} \times 100\% \quad (3.5)$$

$$SA = \frac{(M_2 - M_4)}{M_2} \times 100\% \quad (3.6)$$

Teor de glicerol

O teor de glicerol (TG) das amostras foi determinado a partir de cinco amostras quadradas (1 cm x 1 cm) das placas originais TPC, AC10 e AC15 e as placas neutralizadas TPC e AC15 após estabilização por 30 dias. Essas amostras foram pesadas (M_0) e em seguida colocadas num béquer contendo 100 mL de água destilada para solubilização do glicerol por 24 h com duas trocas da água de lavagem ao longo do período. Após este período as amostras foram secas em estufa à vácuo por 2 h a 115 °C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente num dessecador contendo sal dessecante (CaCl_2) e sílica

gel por 8 min e então pesadas em balança analítica (M_f). A determinação do teor de glicerol foi dada através da equação 3.7.

$$TG = \frac{(M_0 - M_f)}{M_0} \times 100\% \quad (3.7)$$

Análise dimensional no estado intumescido

As placas de quitosana TPC, AC10 e AC15 foram cortadas em círculos com 2,50 cm de diâmetro (D) e imersas em solução PBS por 24 h a 37° C. Após o intumescimento o excesso de água foi removido com auxílio de papel absorvente. O diâmetro médio dos materiais inchados foi obtido com um paquímetro digital (Zaas Precision) pela média de pelo menos seis medidas em posições diferentes. A média desses valores foi utilizada para a determinação do grau de dilatação de cada amostra em referência às medidas dos materiais antes do inchamento em fluido PBS. As medidas das espessuras não foram obtidas pela imprecisão gerada pela compressibilidade dos materiais intumescidos.

3.3.6 Análise termogravimétrica

A influência dos ácidos utilizados sobre a degradação térmica dos materiais à base de quitosana TPC, AC10 e AC15 foi avaliada a partir de um equipamento TGA Q50 (TA Instruments USA) com referência à análise do pó de quitosana. Varreduras de temperatura foram realizadas desde a temperatura ambiente até 700° C, a uma taxa de aquecimento de 10° C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.3.7 Degradação *in vitro*

A degradação das placas de quitosana neutralizadas TPC e AC15 foi avaliada pelo método gravimétrico de acordo com adaptações de estudos anteriores [6,100]. Resumidamente, três placas quadradas (10 mm x 10 mm) foram cortadas, imersas em água destilada por 12h para solubilização do glicerol, secas a 105 °C por 2 h e pesadas. As amostras secas (triplicatas) foram

então imersas em 60 mL de uma solução de PBS (pH 7,4) contendo 4 mg/mL de lisozima e agitadas suavemente a 37 °C. A solução de lisozima foi trocada a cada 24 horas. Após 7 dias, o material foi imerso em água destilada durante 8h para retirada da lisozima adsorvida aos materiais, foram realizadas duas trocas da água de lavagem durante esse período. O grau de degradação (*GDeg*) foi determinado pela equação (3.8).

$$GDeg = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\% \quad (3.8)$$

Onde *GDeg* é o grau de degradação, M_1 é a massa inicial da amostra seca e M_2 é a massa seca final da amostra.

3.3.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA dos materiais neutralizados foi determinada gravimetricamente, usando o método da água descrito na norma ASTM E96M-10. O experimento foi idealizado supondo um ferimento úmido (umidade relativa igual a 100%) exposto a uma umidade relativa (UR) de 50%.

Foram utilizadas cápsulas de acrílico com diâmetro interno de 49,80 mm e diâmetro externo de 80 mm (área exposta: 1947,8 mm², aproximadamente) e 10 mm de profundidade. Cada cápsula foi preenchida com 5 mL de água destilada para gerar 100% UR e coberta pelas placas de quitosana. Um anel de acrílico com mesmos diâmetros interno e externo foi encaixado com auxílio de 4 parafusos e porcas para imobilização do material. Além disso foram utilizadas camadas de parafilme e por último uma camada filme de PVC para garantir o isolamento lateral entre a cápsula e o anel de fixação da amostra. A figura 3.4 superior exhibe a montagem da capsula para o ensaio de PVA. Cada capsula contendo as respectivas placas de quitosana e suas réplicas foram pesadas e em seguida o ensaio foi realizado numa caixa de polipropileno com travas. A superfície de contato entre a caixa e sua tampa foram previamente recobertos com fita crepe e graxa de silicone para manter o sistema fechado e não haver variação na umidade relativa entre o interior da caixa e o exterior (UR ambiente).

Antes de iniciar o ensaio a umidade relativa na caixa foi estabilizada em 50% com auxílio de uma solução saturada de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e sílica gel azul para remover o excesso de umidade liberada pelas cápsulas (Figura 3.4 inferior). Devido à alta permeabilidade dos materiais de quitosana, ao transcorrer do ensaio, a umidade no interior da caixa subiu muito sendo necessário retirar a solução de MgSO_4 e inserir rapidamente uma placa de Petri contendo sal dessecante (CaCl_2) para estabilizar a UR próxima a 50% no interior da caixa para simular as condições idealizadas.

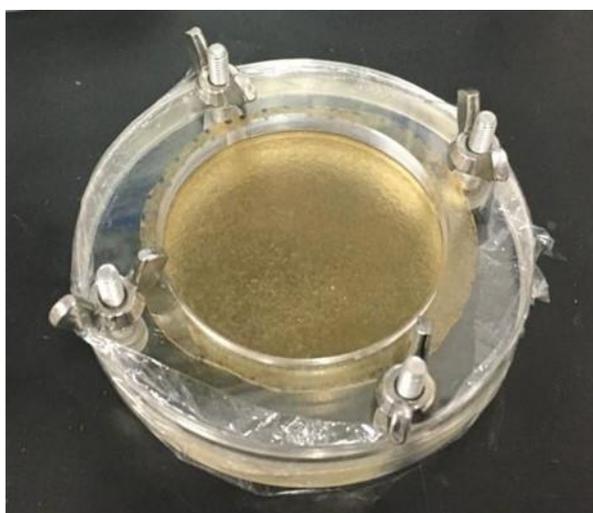


Figura 3.4 – Imagem de uma cápsula montada para ensaio PVA contendo uma placa AC15 (superior) e uma caixa de PP no início do ensaio de PVA (inferior).

Mudanças no peso das cápsulas (com precisão de 0,01 mg) foram registradas em função do tempo por 5 dias sendo duas aferições por dia. Os testes foram realizados em triplicata. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada de acordo com as equações (3.9) e (3.10). A partir da PVA a transmissão de vapor de água (TVA) foi estimada para placas com 700 e 200 μm de espessura de acordo com a equação (3.11).

$$PVA (g \times Pa^{-1} \times s^{-1} \times m^{-1}) = \frac{\Delta m \times X}{A \times t \times \Delta P} = \frac{tg\theta \times X}{A \times \Delta P} \quad (3.9)$$

$$\text{Sendo: } \Delta P = S \times (R_1 - R_2) \quad (3.10)$$

$$TVA = \frac{\Delta m}{t \times A} = \frac{PVA \times \Delta P}{X} \quad (3.11)$$

Onde Δm é a mudança de massa ao longo do tempo (g); X é a espessura da amostra (m); t é o tempo (h); A é a área da amostra (m^2); ΔP é a diferença da pressão de vapor (Pa); S pressão de vapor de saturação na temperatura de teste (Pa), R_1 é a umidade relativa dentro da cápsula contendo água destilada (100%) e R_2 a umidade relativa no ambiente externo à cápsula, URs expressas em fração, e $tg\theta$ é a inclinação da reta gerada por Δm em função do tempo ao longo do ensaio (Figura 4.21).

A temperatura do ensaio foi de $18,06 \pm 3,35$ °C e a umidade relativa (R_2) foi de $59,3 \pm 12,94$ %. A alta variação de umidade foi gerada pelos vapores de água devido à alta permeabilidade dos materiais à base de quitosana. O parâmetro S foi determinado pela equação de Tetens (equação 3.12) para a temperatura de 18 °C ($S = 2,0639$ kPa) [101]:

$$S = A \times 10^{\frac{7,5 \times T}{237,3+T}} \quad (3.12)$$

Onde o parâmetro A equivale a 610,8 Pa e T é a temperatura (°C).

A diferença de pressão de vapor (Δp) foi então determinada pela equação 3.10 para a pressão de vapor de saturação à 18 °C determinada pela equação de Tetens ($\Delta p = 840,0073$ Pa).

A mudança de massa foi registrada pela evaporação da água dentro da cápsula (UR = 100%) para o ambiente no interior da caixa (UR_{média} = 59,3 %) e plotadas em função do tempo. A inclinação da reta forneceu a taxa de evaporação da água através do material ($\Delta m / t$). As espessuras médias (X) de TPC e AC15 foram de $437,89 \pm 20,11 \mu\text{m}$ e $417,61 \pm 20,11 \mu\text{m}$, respectivamente e a área exposta $A = 0,0019478 \text{ m}^2$.

3.3.9 Ensaios de incorporação e liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina (CT) *in vitro*

O desempenho dos materiais desenvolvidos para utilização como coberturas cutâneas capazes de promover uma liberação controlada de fármacos ou como um dispositivo transdérmico para liberação controlada foi avaliado também em termos de sua capacidade de liberação controlada de princípios ativos. Para tanto o cloridrato de tetraciclina (CT) foi usado como um modelo de droga antibacteriana para analisar o perfil de liberação *in vitro* das placas de quitosana termomecanicamente processadas após a etapa neutralização desenvolvida nesta tese.

3.3.9.1 Incorporação do fármaco cloridrato de tetraciclina (CT) nas placas de quitosana

As placas de AC15 e TPC foram cortadas com auxílio de um alicate perfurador circular com 6 mm de diâmetro. Cada corpo de prova foi obtido em triplicata e então foram secos em estufa a 115°C por 2 h. Após a secagem cada corpo de prova foi resfriado em dessecador contendo sílica gel azul e CaCl_2 para se evitar a reabsorção de água durante o resfriamento. O tempo de 8 min foi suficiente para o resfriamento à temperatura ambiente e então as amostras foram pesadas.

Para a incorporação do CT nas amostras uma solução de 1 mg / mL do fármaco em solução PBS foi utilizada. Cada réplica foi imersa na solução do CT e deixadas em estufa a 50°C por 3 h. Após o tempo de incorporação as réplicas

foram retiradas da solução e imersas em PBS por 5 segundos para retirada do excesso de solução do CT na superfície dos materiais.

A capacidade de incorporação da tetraciclina nas amostras AC15 e TPC foi obtida através da massa total liberada do CT avaliada por espectrofotometria (Varian Cary® 50 UV-Vis, Agilent) de absorção no UV-Vis (método descrito a seguir) no momento onde uma baixa absorbância foi detectada a 275 nm durante o ensaio de liberação do fármaco (198 h). A capacidade de incorporação (CI) foi determinada a partir da equação 3.13.

$$CI = \frac{m_{CT}}{m_{Quit}} \quad (3.13)$$

Onde: m_{CT} é a massa do fármaco incorporada determinada no ensaio de liberação (198 h) e m_{Quit} é a massa da placa de quitosana (TPC ou AC15).

3.3.9.2 Ensaio de liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina (CT) *in vitro* e curva de calibração do CT em fluido PBS

Antes do ensaio de liberação do CT uma curva de calibração foi obtida a fim de correlacionar a absorção do CT a 275 nm em função da concentração do fármaco dissolvido em solução PBS. A curva de calibração das soluções do cloridrato de tetraciclina em fluido PBS a 37° C foi obtida no intervalo entre 0,58 e 10,03 µL / mL.

O ensaio de liberação *in vitro* da tetraciclina incorporada ao TPC e AC15 foi realizado em 10 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4) com agitação mínima a 37 °C. Alíquotas de 3 mL foram retiradas em tempos determinados e substituídas por PBS fresco [6]. A quantidade de droga liberada foi determinada a partir da absorbância da alíquota a 275 nm usando um Espectrofotômetro Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer (Agilent). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3.10 Atividade antimicrobiana

Para os ensaios de ágar difusão, foi utilizada cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por ser um dos contaminantes patogênicos mais comuns

em ferimentos cutâneos. O microrganismo foi incubado em meio TSB (Tryptone Soya Broth), por 24 horas, sob agitação (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil) (150 rpm), à 37 °C. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi diluída para obtenção da turbidez de 1×10^8 UFC / mL, equivalente a escala McFarland, e uma alíquota foi transferida para o meio ágar Muller-Hinton (45°C) de modo a se obter uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. O meio contendo o microrganismo foi rapidamente transferido para 2 placas de Petri de 150 mm e permaneceu em repouso por 30 minutos para a solidificação.

Após a solidificação do ágar, os materiais foram colocados sobre o meio de cultura inoculado e as placas foram incubadas por 24 horas em estufa à 37 °C. Um disco de gentamicina (10 µg) foi utilizado como controle positivo. Com a intenção de observar se um maior teor de quitosana nos materiais termomecanicamente processados estando no estado sólido e não protonado promove algum efeito antimicrobiano, os materiais foram testados em duas espessuras distintas sem adsorção do cloridrato de tetraciclina além de uma amostra de cada material com o antibiótico: TPC fino (200 µm), TPC espesso (700 µm), TPC fino com cloridrato de tetraciclina e AC15 fino (200 µm), AC15 espesso (700 µm) e AC15 fino com cloridrato de tetraciclina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da quitosana modificada com ácido cítrico

4.1.1 Aspecto físico

Três diferentes teores de ácido cítrico (AC) foram avaliados e a influência do teor do AC sobre a estrutura e propriedades dos materiais foram analisadas. A formulação do material teve uma variação superior no teor de AC (15 pcr – AC15) e inferior (5 pcr – AC5) em relação ao teor de 10 pcr (AC10) que é o teor equimolar ao teor de grupos ácido carboxílicos do ácido acético (HAc) utilizado na formulação da quitosana processada com HAc (TPC) [102]. Todos os materiais são translúcidos e apresentaram coloração amarelada característica da quitosana, aspecto também relatado por Epure e colaboradores [3]. À medida que o teor de AC aumentou a opacidade dos materiais diminuiu (Figura 4.1) indicando previamente que o maior teor de AC promoveu maior desestruturação cristalina do pó de quitosana como será visto mais adiante na análise microestrutural (DRX e MEV). Os materiais processados na presença de HAc apresentaram um tom de amarelo mais escuro e uma opacidade aparente ligeiramente maior que AC15 indicando uma possível maior degradação térmica e menor desestruturação do pó de quitosana, respectivamente, como será confirmado mais adiante na análise termogravimétrica e difratometria de raios x.

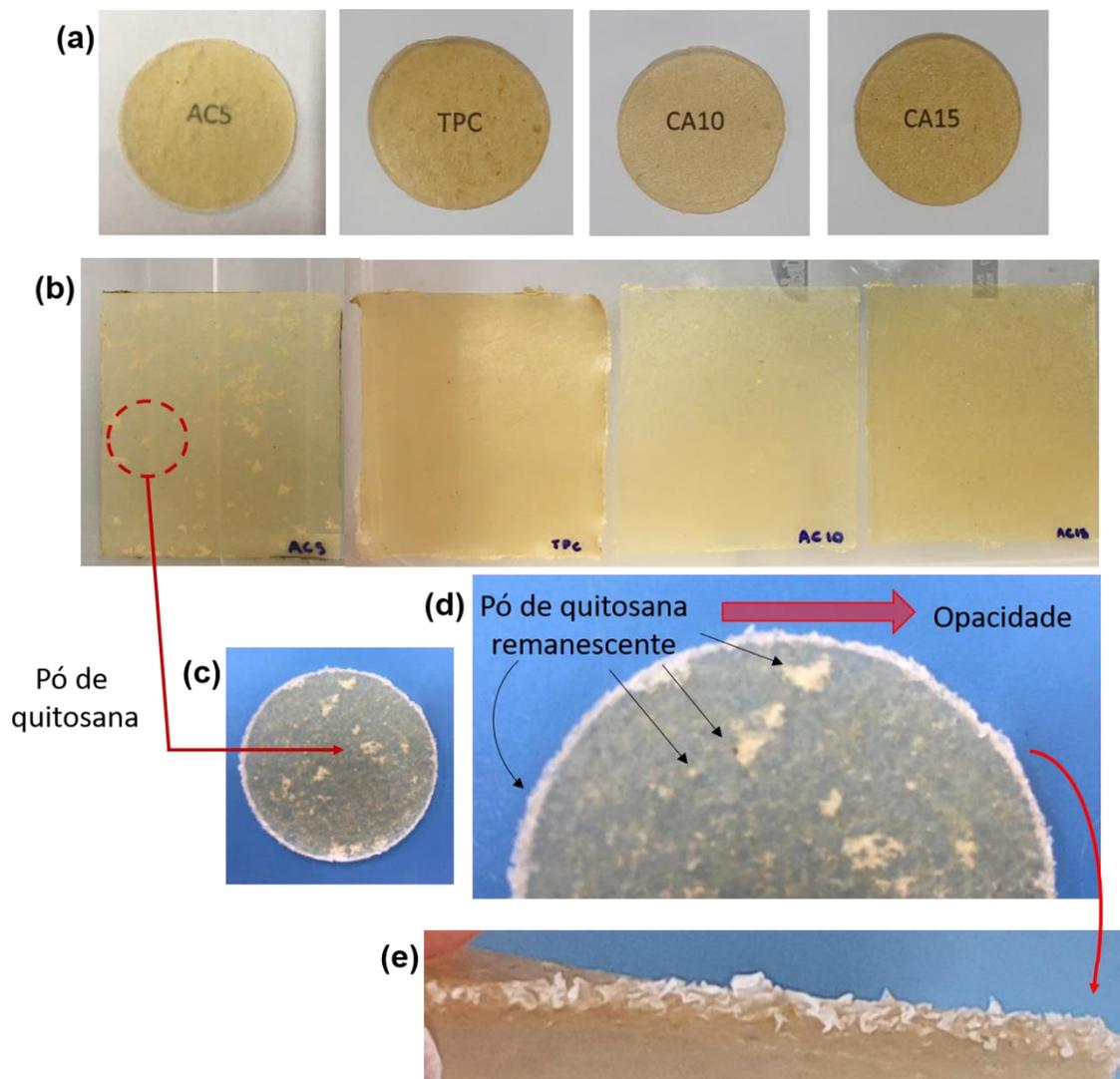


Figura 4.1 – a, b) Aspecto físico dos materiais com diferentes teores de AC: TPC (0 pcr), AC5 (5 pcr), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr); c) Imagem de um disco retirado de AC5; d) ampliação do disco de AC5 apresentando o pó de quitosana remanescente no pós processamento; e e) ampliação da imagem lateral do disco de AC5 apresentando alta quantidade de pó remanescente (não desestruturado).

Para o material AC5 além dos aspectos de coloração e opacidade é possível observar o pó de quitosana remanescente do processamento. Percebe-se a olho nu que o teor de 5 pcr de AC foi insuficiente para promover um processamento capaz de gerar uma uniformidade estrutural no material. Devido ao grande teor de pó de quitosana remanescente o material AC5 não foi avaliado

extensivamente por apresentar baixa homogeneidade. Para AC5 apenas análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difratometria de raios x (DRX) serão discutidas para se analisar a influência do AC em diferentes concentrações na estrutura da quitosana. Vale ressaltar que mesmo com um baixo teor de AC (5 pcr), este único ácido foi capaz de gerar um material que não se desfaz facilmente ao ser manipulado apresentando integridade e flexibilidade consideráveis indicando previamente a eficiência do processamento termomecânico mesmo com uma baixa desestruturação do pó de quitosana como será visto na análise por DRX. Os demais materiais não apresentaram evidências macroscópicas de pó de quitosana remanescente no pós-processamento.

4.1.2 Espectroscopia FTIR

Espectros de FTIR (Figura 4.2) foram obtidos para identificação das bandas características da quitosana e do ácido cítrico e das principais interações entre o ácido cítrico, o glicerol e a quitosana nos materiais plastificados e modificados pelo processamento termomecânico. Para uma visualização mais detalhada os espectros de cada material são exibidos em gráficos separados nas figuras A1 e A2 do apêndice A.

O espectro do ácido cítrico mostrou suas bandas características em 3295 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} e 1692 cm^{-1} correspondendo ao estiramento O-H e estiramentos C=O do ácido carboxílico, respectivamente [103]. Para o pó de quitosana, a banda larga centrada em 3284 cm^{-1} corresponde a sobreposição das bandas relativas às vibrações de estiramento do grupo -OH e do grupo -NH₂ [104]. As bandas de absorção em 2926 , 2884 e 1411 e 1240 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais de estiramentos simétricos e anti simétricos de CH₂ [105]. As bandas em 1653 , 1559 e 1375 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C=O em amidas [27], deformação angular em aminas [104,106] e estiramento C-N em amidas [27], respectivamente. Além disso, mais duas bandas presentes em espectros de infravermelho de polissacarídeos são as bandas referentes às ligações C-O-C e C-OH que no espectro da quitosana estão centrados em 1024 cm^{-1} e 1149 cm^{-1} , respectivamente [107].

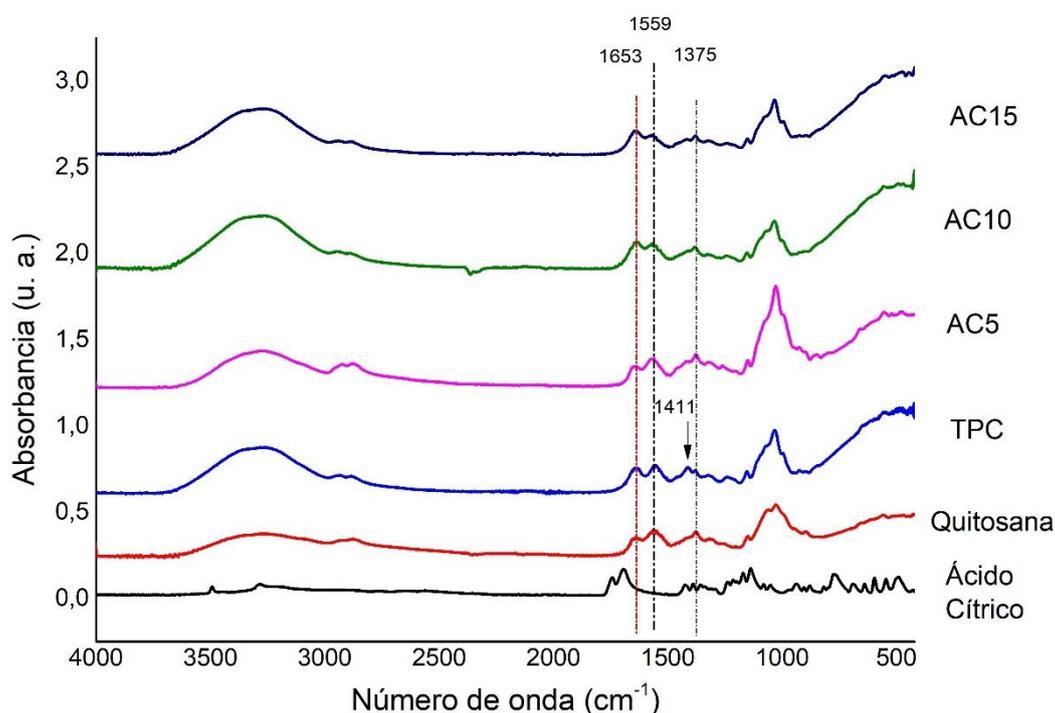


Figura 4.2 – Espectros FTIR de cristais de AC, quitosana em pó e das amostras plastificadas TPC, AC5, AC10 e AC15.

Os espectros das quitosanas termoplásticas apresentam bandas similares às respectivas bandas no espectro do pó de quitosana com pequenos deslocamentos devido às interações com o HAc ou AC e principalmente com o plastificante [27]. Nesses espectros as bandas, em geral, apresentaram-se mais intensas indicando que nestes materiais as ligações químicas vibram mais facilmente devido ao efeito plastificante da água e do glicerol [1] devido ao aumento do espaçamento entre as cadeias de quitosana nos segmentos não reticulados gerando interações intercadeias mais fracas ampliando a intensidade das bandas nos materiais devido à menor rigidez da estrutura do biopolímero. Pequenos deslocamentos para menores frequências, na ordem de até 10 cm^{-1} , foram observados nos espectros das amostras processadas evidenciando que os componentes da formulação (AC, glicerol e água) interagem fisicamente com a quitosana diminuindo a energia das interações intercadeias [27,51]. Particularmente, no espectro de AC5 a banda relativa à ligação glicosídica C-O-C (aproximadamente 1024 cm^{-1}) apresenta intensidade relativa maior que a mesma banda nos espectros dos demais materiais processados, que pode ser

resultado de um efeito mínimo de hidrólise ácida sobre as ligações glicosídicas devido ao menor teor de AC (5 pcr) aliado ao efeito dos plastificantes gerando uma maior intensidade da banda centrada em 1024 cm^{-1} .

Apesar da similaridade dos espectros dos materiais processados com o espectro da quitosana, uma mudança fundamental foi evidenciada no perfil das bandas em 1653 cm^{-1} e em 1559 cm^{-1} . Enquanto no espectro das amostras AC5 e TPC (processada com ácido acético), semelhantemente ao espectro do pó da quitosana, a proporção dessas bandas apresenta maior absorção em 1559 cm^{-1} do que em 1653 cm^{-1} , nos espectros das amostras AC10 e AC15 essa proporção é alterada. Além disso, percebe-se que para as amostras contendo AC (AC5, AC10 e AC15) a intensidade da banda em 1559 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$) diminui e a banda em 1653 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) aumenta progressivamente à medida que o teor de ácido cítrico aumenta. Estes efeitos associados indicam que houve consumo dos grupos aminas e formação de grupos amidas ocasionada pela reação de amidação entre as aminas da quitosana e as carboxilas do ácido cítrico. O espectro de AC5, ao contrário dos espectros de AC10 e AC15, apresenta uma maior intensidade da banda amina em relação à banda amida indicando um baixo consumo dos grupos amina da quitosana o que é esperado dado o baixíssimo teor molar de AC na formulação deste material. Para a amostra TPC apesar do teor de grupos ácidos semelhante ao teor desses grupos em AC10 a menor proporção de amidação pode ser explicada em parte pela evaporação de parte do HAc durante a termoprensagem à 130°C (ponto de ebulição $\sim 115^\circ\text{C}$). Nota-se ainda que o espectro de TPC (figura 4.3) apresenta um notável aumento na intensidade da banda em 1411 cm^{-1} referente a vibração do CH_2 na estrutura da quitosana. Uma vez que TPC tem segmentos acetatos enxertados e os materiais não são reticulados, esse aumento na intensidade desse modo vibracional fornece indícios de uma maior mobilidade e, conseqüentemente, menor rigidez da estrutura do biopolímero aumentando a intensidade desse modo vibracional.

Em alguns artigos é relatado que a reticulação entre cadeias de quitosana pelo AC se dá por reações de esterificação [103,108]. Priyadarshi e colaboradores, por exemplo, encontraram uma banda em 1720 cm^{-1} no espectro

FTIR de filmes de quitosana reticulada com ácido cítrico a 130°C feito pelo método solvente casting [108], esta banda é atribuída ao estiramento C=O em grupos ésteres indicando uma reação de esterificação entre grupos hidroxilas da quitosana com as carboxilas do ácido cítrico, além da esterificação os autores indicam também a reação de amidação entre o AC e as aminas da quitosana. Um ponto a ser ressaltado é que Priyadarshi *et al* utilizaram uma proporção de AC maior que a utilizada neste trabalho, enquanto eles utilizaram a proporção 1:1 em massa, aqui utilizamos a proporção quitosana:ácido cítrico (m:m) de 1:0,05; 1:0,1 e 1:0,15. Para a proporção 1:1, em termos molares, considerando que cada 1 g do mero glicosamina na quitosana (massa molecular de 161 g/mol) equivale a 6,21 mmol e 1 g do ácido cítrico (massa molecular de 192 g/mol) equivale a 5,20 mmol que corresponde a 15,60 mmol de grupos carboxílicos (grupos ácidos). Utilizando-se a proporção 1:1 em massa de quitosana:AC, mesmo que a quitosana seja 100% desacetilada (hipótese de maior teor de aminas como grupos reativos) o AC ainda será o reagente em excesso desta reação entre AC e quitosana possibilitando, após o consumo de todo o grupo amina, a reação de esterificação entre os grupos ácidos excedentes e os grupos hidroxilas da quitosana.

Chen e colaboradores [48] afirmam que a reação principal entre AC e quitosana é a amidação. A formação de amida ocorre preferencialmente à reação de esterificação pois quando a solução de AC é adicionada à quitosana ocorre a protonação das aminas e este sistema quando submetido a aquecimento o grupo NH^{3+} se torna um sítio ativo preferencial para reação com o íon carboxilato do AC ao invés da reação com uma hidroxila [109]. Corroborando com a afirmação de Chen *et al* [48] neste trabalho, os espectros FTIR não evidenciaram formação de grupos ésteres como relatado no trabalho de Priyadarshi *et al* [108]. A inexistência de bandas relativas a grupos ésteres indica que tanto os grupos hidroxila da quitosana quanto as hidroxilas do glicerol não esterificaram na presença do AC. O ácido cítrico em todas as formulações, inclusive em AC15 (material com maior teor de AC), foi o reagente limitante, e a amina agiu como o reagente em excesso por grama de quitosana (0,78 mmol AC / 4,13 mmol glicosamina), considerando o GD = 75% como especificado pelo

fabricante. Portanto, apenas as aminas reagiram durante a reação entre AC e quitosana numa reação de amidação.

Ainda em relação aos espectros das amostras processadas, não foram observadas as bandas de 1740 cm^{-1} e 1684 cm^{-1} pertencentes aos grupos C = O do AC. Uma vez que o conteúdo de AC é pelo menos 5 vezes menor do que o conteúdo de glicosamina na amostra de AC15, o desaparecimento das bandas em 1740 cm^{-1} e 1684 cm^{-1} indica que grande parte dos grupos ácidos foram consumidos gerando necessariamente a reticulação química entre as cadeias do biopolímero. Para corroborar com a ideia de reticulação química pela baixa evidência de grupos ácidos remanescentes nos espectros dos materiais processados, o espectro de AC15 misturado termomecanicamente no Haake e antes da cura (etapa de termoprensagem) foi obtido a fim de compreender como se dá as interações entre AC e quitosana no caso em que a reação química não ocorre (figura 4.3). Devido ao elevado teor de umidade da amostra não curada, essa mistura foi seca em estufa a 40°C por 15h antes da análise de espectroscopia FTIR gerando uma diminuição na intensidade das bandas pela saída do excesso do plastificante volátil, a saber, a água.

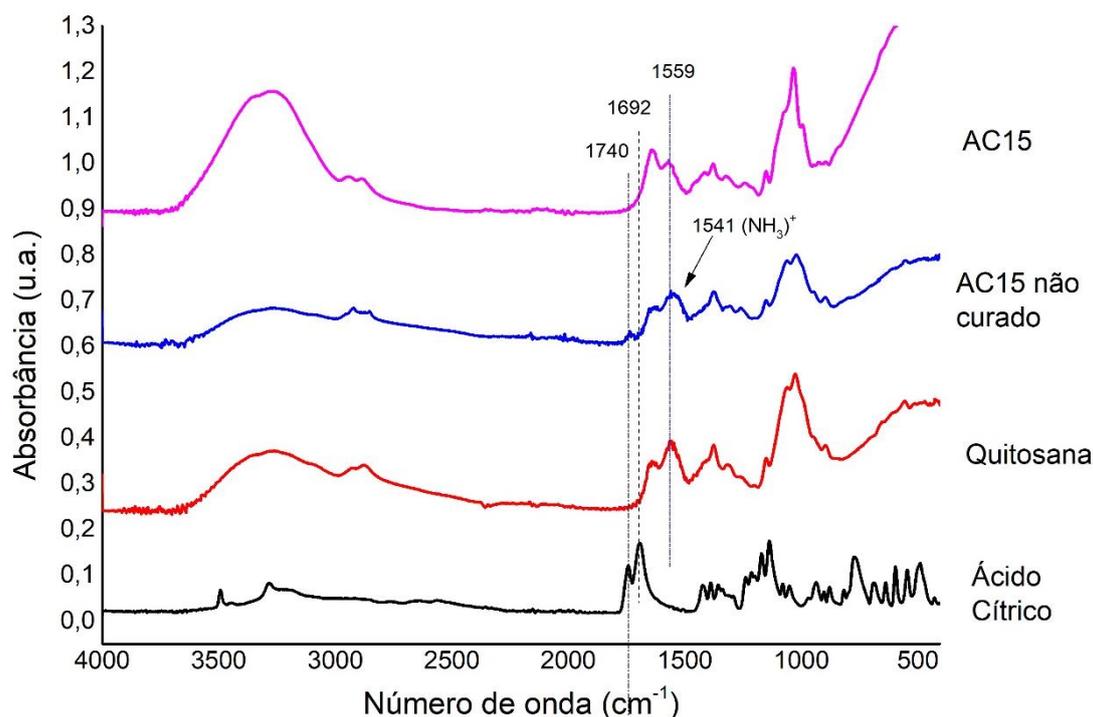


Figura 4.3 – Espectro de AC15 antes da etapa de cura em comparação aos espectros de AC, quitosana e AC15.

A figura 4.3 evidencia que o material não curado apresenta a banda referente aos grupos C = O do ácido cítrico deslocada e centrada em 1735 cm^{-1} . A literatura indica que o AC em presença de moléculas hidrofílicas apresenta um deslocamento da banda C = O dos grupos ácidos carboxílicos para valores inferiores até 1725 cm^{-1} devido às ligações de hidrogênio entre C = O e outras moléculas do meio como a água, o glicerol e hidroxilas e amida da quitosana [110]. Além disso a banda relativa ao grupo amina apresenta-se alargada devido a sobreposição dessa banda com a banda NH_3^+ da amina protonada (ou íon amônio) que aparecem como um “ombro” por volta de 1541 e 1572 cm^{-1} [27] gerando um alargamento na banda em 1559 cm^{-1} [1]. A banda relativa à amina (1559 cm^{-1}) permanece mais intensa que a banda C=O em amidas (1653 cm^{-1}), assim como no espectro da quitosana. Esse resultado corrobora com a hipótese de haver pouquíssimos grupos ácidos remanescentes nas amostras curadas, uma vez que a banda C=O do AC interagindo fisicamente com a água em 1735

cm^{-1} mostrado no espectro do material antes da cura não é evidenciada nos espectros dos materiais curados (figura 4.2), reforçando a ideia de uma reticulação química eficiente. A figura 4.4 ilustra a estrutura dos materiais reticulados deduzida a partir da análise de espectroscopia FTIR.

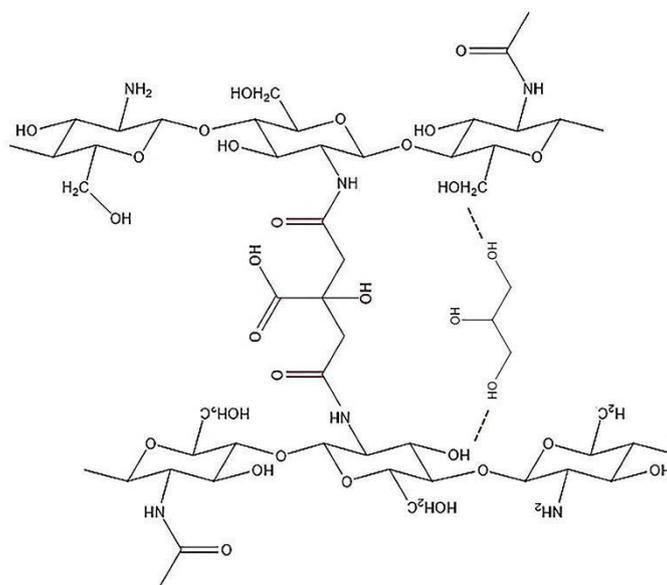


Figura 4.4 – Ilustração esquemática da estrutura das cadeias de quitosana reticuladas com ácido cítrico através de reação de amidação. O glicerol interage por meio de ligações de hidrogênio.

4.1.3 Difractometria de raios-x (DRX)

A influência do processamento termomecânico e da adição de AC na estrutura cristalina das amostras processadas foi investigada por DRX, e seu nível de cristalinidade foi estimado (equação 3.1). A Figura 4.5 mostra os difratogramas do pó de quitosana e das amostras processadas TPC, AC10 e AC15 após 2 e 30 dias do processamento.

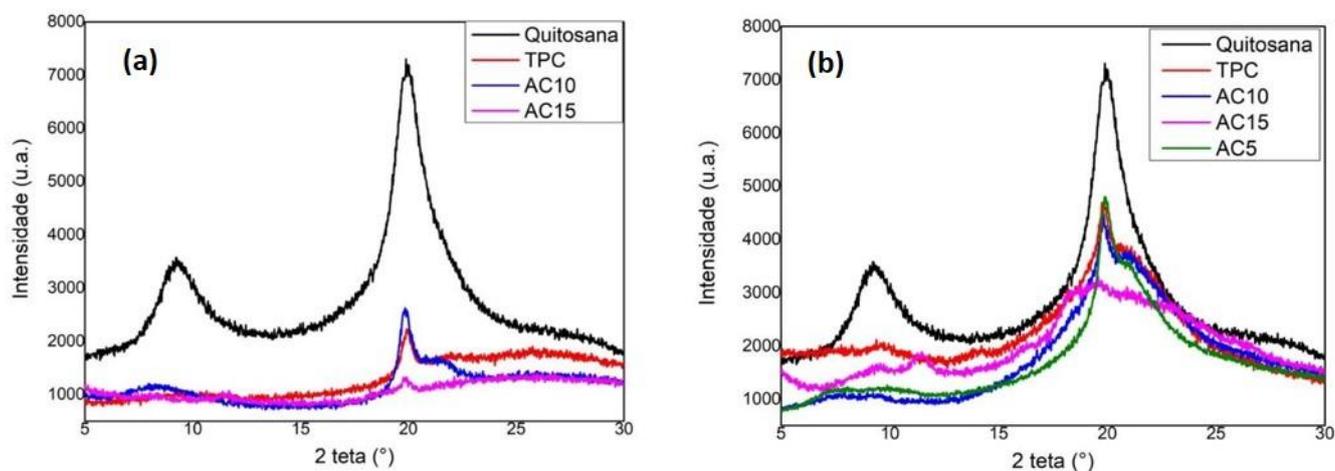


Figura 4.5 – Padrões de DRX de pó de quitosana e amostras processadas com diferentes quantidades de AC: (a) TPC (0), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr) no segundo dia de armazenamento a $50 \pm 3\%$ RH e $25 \pm 2^\circ$ C e (b) TPC (0), AC5 (5 pcr), AC10 (10 pcr) e AC15 (15 pcr) após estabilização estrutural (30 dias a $50 \pm 3\%$ UR e $25 \pm 2^\circ$ C).

O difratograma do pó de quitosana revela o polimorfo derivado da α -quitina (polimorfo existente na quitina extraída de exoesqueletos de crustáceos) com picos de difração característicos em $2\theta = 9,3^\circ$ e $19,8^\circ$ correspondendo a difração dos planos (020) e (100) em cristais de quitosana hidratada, respectivamente [28,111]. Sua cristalinidade foi estimada em 47,7%. Os difratogramas de TPC, AC10 e AC15 exibiram três picos em $9,5^\circ$, $19,9^\circ$ e $20,8^\circ$ que estão relacionados à estrutura cristalina da quitosana. Os picos foram atribuídos aos planos (020), (100) e (110), respectivamente [111]. O pico de difração correspondente a (110) foi observado em amostras processadas termomecanicamente em trabalho anterior [27]. As intensidades dos picos das amostras diminuíram em relação aos picos do pó de quitosana indicando que o processamento termomecânico promoveu a desestruturação cristalina do biopolímero na presença do plastificante e dos ácidos utilizados. As amostras examinadas no segundo dia de armazenamento mostram um padrão de baixa cristalinidade (Figura 4.5 (a)). Essa característica revela que a desestruturação cristalina foi bastante eficiente para todas as amostras processadas indicando

que ambos os ácidos (AC e HAc) são bons agentes desestruturantes para a quitosana. Para as amostras TPC e AC15, o pico a $9,5^\circ$ é quase imperceptível. A cristalinidade estimada para as amostras processadas foi de 2,24%, 4,88% e 1,60% para as amostras TPC, AC10 e AC15, respectivamente. A natureza semicristalina do polimorfo de quitosana hidratada depende das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares formadas pelo grupo amino na posição C-2 e o grupo hidroxila na posição C-3 [28,42]. Epure *et al* atribuíram a diminuição da intensidade dos picos da quitosana termoplástica à deterioração das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares após o processamento [3]. Essa deterioração das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares resultou na quebra da estrutura cristalina da quitosana, conforme refletido pela diminuição da intensidade dos picos nos padrões de DRX exibidos na figura 4.5.

Após o tempo de estabilização em umidade relativa (UR) de 50% as amostras TPC, AC5 e AC10 exibiram alteração em seus respectivos padrões de DRX (Figura 4.5(b)). A cristalinidade estimada para as amostras processadas após a estabilização foi de 22,0%, 32,8% 28,3% e 9,5% para as amostras TPC, AC5, AC10 e AC15, respectivamente. Esses valores indicam que estes materiais sofreram processo de recristalização durante a estabilização. Em relação a estas amostras, a difração correspondente ao pico (020) deslocou-se ligeiramente para $9,5^\circ$ e a sua intensidade diminuiu, tornando-a praticamente imperceptível enquanto o pico (100) em $19,8^\circ$ permanece na mesma posição com intensidades maiores. Especificamente, a amostra AC15 apresentou um padrão de DRX com picos mal definidos típicos de amostras amorfas. Este padrão ocorreu devido à baixa capacidade de recristalização associada a um maior conteúdo de reticulações. Além disso, outro pico foi revelado em $11,4^\circ$ para a amostra AC15. Este pico foi atribuído à difração deslocada do plano (020) do polimorfo de quitosana hidratada [111]. O aparecimento do pico em $11,4^\circ$ do AC15 revela que o material apresenta uma estrutura cristalina complexa com diferentes espaçamentos interplanares para o plano (020), caracterizado pelo deslocamento do pico em $9,3^\circ$. Uma vez que a modificação química resultou na entrada de moléculas de AC na estrutura química do material a organização cristalina possivelmente tornou-se diferente para as regiões mais próximas ou

mais afastadas dos sítios de reticulação química. Por motivos de restrições de acesso devido à pandemia do SARS-COV-2 não foi possível obter o DRX de AC5 pouco tempo após o processamento, portanto não foi possível determinar se há recristalização deste material no pós processamento.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A seção transversal e a superfície dos materiais processados e estabilizados por 30 dias foram avaliadas por MEV (Figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.11). A fratura frágil foi alcançada com sucesso 1 h após os materiais serem imersos em nitrogênio líquido (Figura 4.6 (b-d)). As micrografias da superfície da amostra mostraram características rugosas típicas dos filmes de quitosana [40,43], como pode ser visto representativamente na imagem da superfície da amostra de AC15 na Figura 4.6(a) e nas imagens de MEV das superfícies das amostras TPC e AC10 encontram-se na figura B1 (Apêndice B).

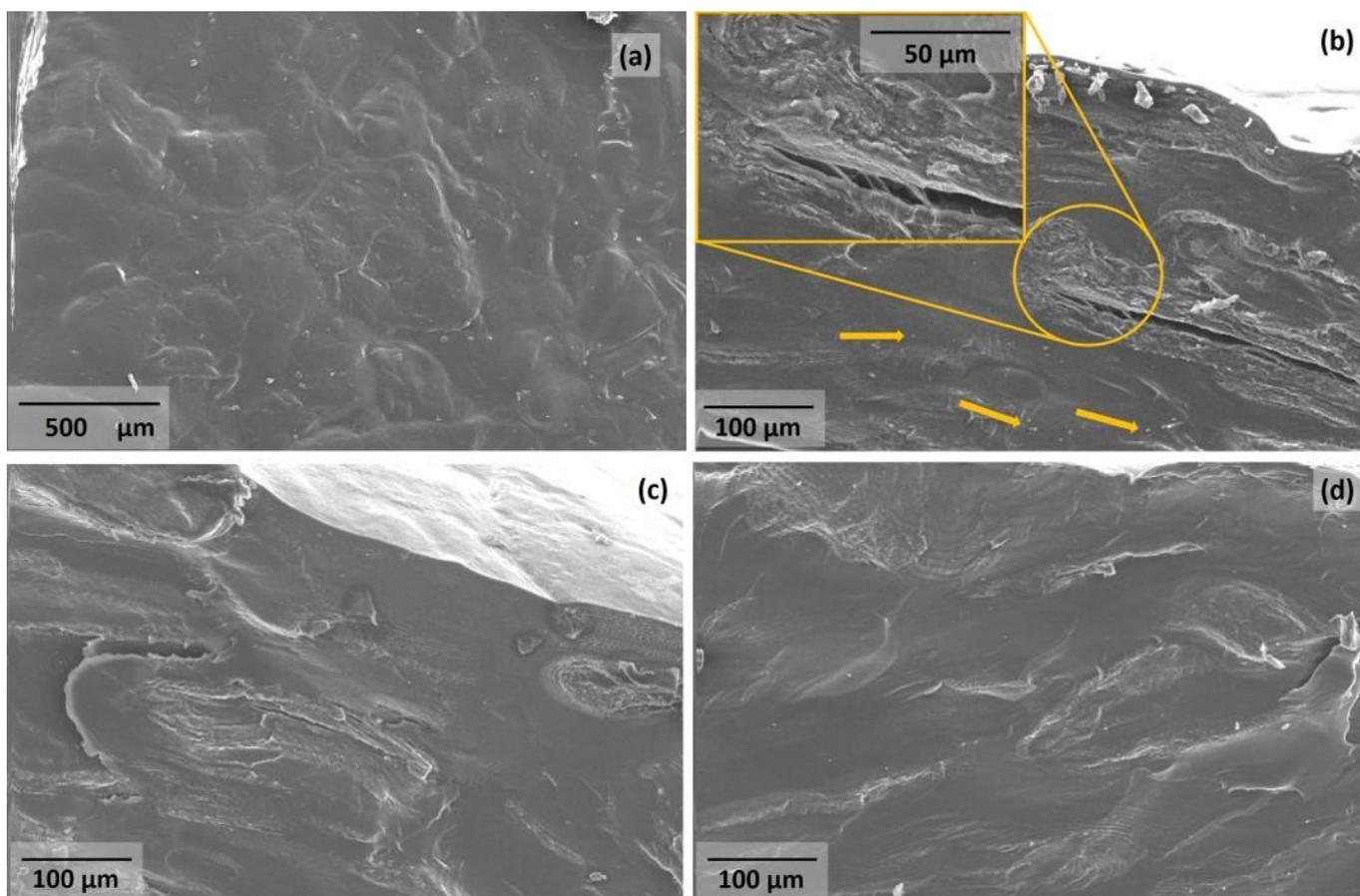


Figura 4.6 – Imagens de MEV da (a) superfície de AC15; seções transversais das amostras fraturadas após 1 h de imersão em nitrogênio líquido de (b) TPC com extensão de trinca adjacente à região cristalina da quitosana (ampliação), (c) AC10 e (d) AC15.

As imagens da superfície de fratura (Figura 4.6 (b, c e d)) indicam boa miscibilidade entre quitosana, ácido cítrico ou ácido acético e glicerol, uma vez que nenhuma separação de fases foi detectada. Além disso, todas as amostras revelaram um arranjo estrutural semicristalino, que consiste numa morfologia em camadas (regiões cristalinas) e regiões lisas [1,27]. As regiões lisas são compostas por moléculas amorfas e nanofibrilas de quitosana, que não podem ser distinguidas por MEV [1]. O material (TPC) preparado a partir da formulação sem AC apresenta fissuras em direção paralela ao plano de prensagem que se localizam próximas às regiões cristalinas. Essas fissuras podem ter sido formadas durante a recristalização, quando o volume livre das moléculas diminuiu devido à reorganização estrutural após o processamento. Alguns grânulos

irregulares e intactos do pó de quitosana, não desestruturados pelo processamento termomecânico, foram identificados (indicados com setas amarelas na Figura 4.6(b)). A amostra AC10 apresenta, além de excelente miscibilidade entre os constituintes, uma boa coesão do material onde foram encontradas trincas menores adjacentes aos domínios cristalinos. Notavelmente, o AC favorece a continuidade no material apesar de sua concentração (0,52 mmol AC / 1 g quitosana) ser três vezes menor do que HAc (1,575 mmol HAc / 1 g quitosana) na amostra de TPC. Os grânulos do pó de quitosana remanescentes também foram encontrados incorporados na matriz de AC10. Em relação ao material AC15, um aumento de 50% no teor de AC (0,78 mmol CA / 1 g de quitosana) levou ao desenvolvimento de uma estrutura mais lisa, homogênea e menos fases cristalinas. Por conta do alto teor de quitosana na formulação, pequenos grânulos de quitosana permaneceram na amostra após o processamento. Além disso, não foram observadas trincas na microestrutura do AC15. Fica evidente que além de atuar como um agente de reticulação, o AC é um bom agente de desestruturação para materiais à base de quitosana processada termomecanicamente. O uso de 15 pcr de AC gera maior teor de fase amorfa com baixa capacidade de recristalização devido ao aumento da reticulação química.

A análise da fratura dos materiais imersos em nitrogênio líquido ($N_2(l)$) por 10 min (Figuras 4.7 e 4.8) revelaram uma superfície de fratura dúctil e a existência de estruturas compatíveis com diferentes níveis cristalinos da quitosana conforme a investigação relatada por Meng e colaboradores [1]. No experimento de Meng [1] as microfibras cristalinas da quitosana foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura e ótica a partir da superfície do material após a imersão em água por 48h. Naquele experimento durante a imersão, a amostra ficou inchada e algumas “cordas” emaranhadas, que são longas microfibras, foram liberadas da superfície da amostra. Na presente pesquisa um passo além foi dado para o entendimento de como as unidades cristalinas da quitosana se organizam no interior do material. A morfologia da superfície de fratura dos materiais TPC e AC15 (previamente inchados em água) após imersão em nitrogênio líquido ($N_2(l)$) por 10 min favoreceu a observação da

estrutura cristalina da quitosana termomecanicamente processadas (TPC e AC15) e detalhes importantes foram revelados.

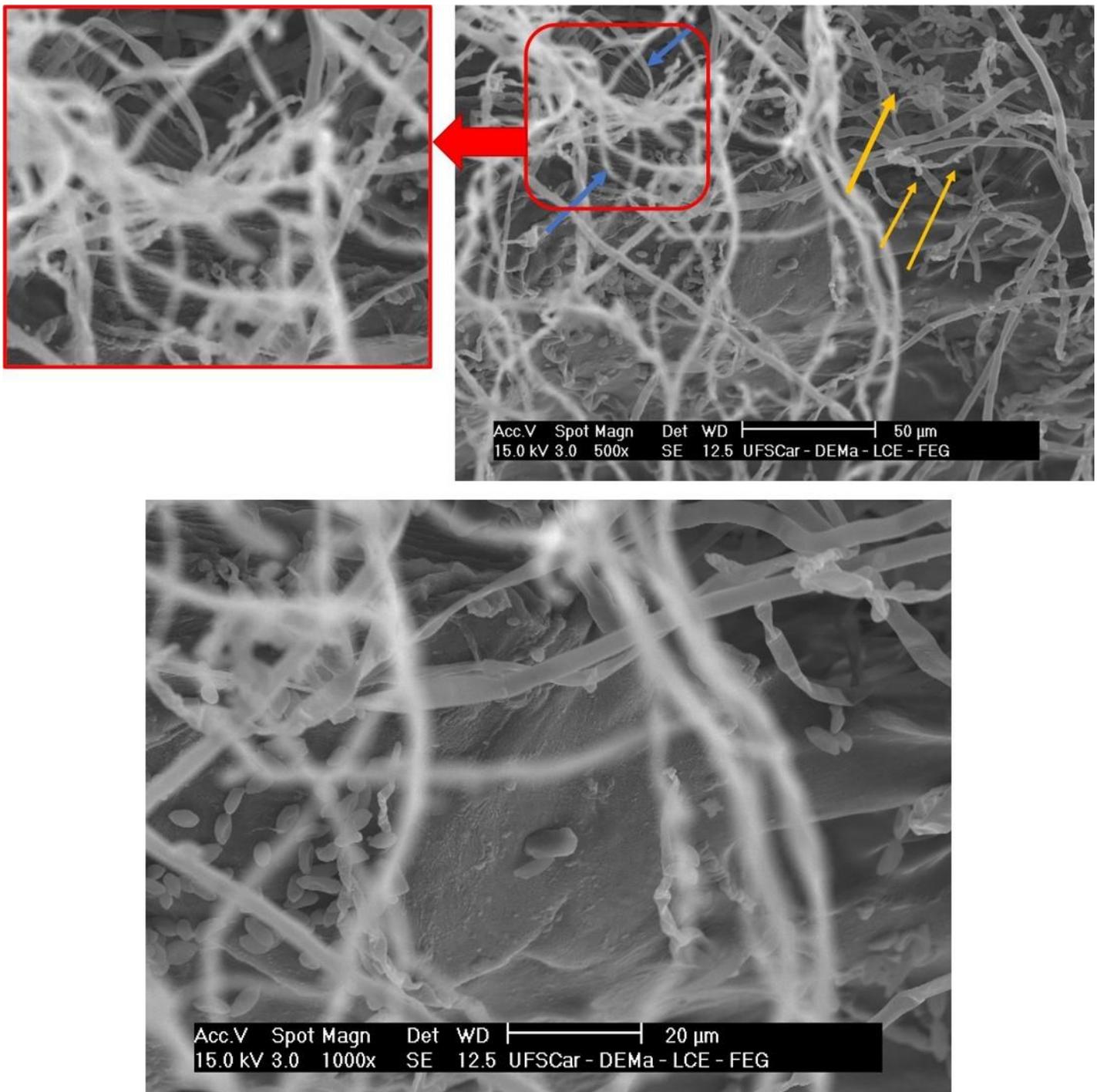


Figura 4.7 – Superfície de fratura dúctil (após imersão em N_2 (l) por 10 min) de TPC em diferentes aumentos evidenciando dois níveis de estruturas hierárquicas da quitosana, os aglomerados nanofibrilares e microfibras.

As imagens de TPC (Figura 4.7) revelaram uma alta densidade de estruturas fibrosas. Inicialmente essas estruturas foram relacionadas ao fenômeno de microfibrilamento durante a fratura (*crazing*), uma vez que é relatado que em baixos níveis de tensão o mecanismo de fratura dúctil predominantes em polímeros é o microfibrilamento (*crazing*) enquanto que em elevados níveis de tensão o mecanismo predominante é o escoamento por cisalhamento (*shear yielding*) [112]. Entretanto numa análise mais cuidadosa foram observadas algumas regularidades e pequenas estruturas arredondadas e côncavas nas imagens da superfície de fratura da amostra TPC. Essas estruturas côncavas apresentam comprimentos entre 4 e 6 μm , não estão associadas às microfibrilas geradas por *crazing* e podem ser atribuídas aos aglomerados nanofibrilares associados ao segundo nível cristalino da estruturação hierárquica da quitosana [1]. Além disso algumas regiões com alto teor de estruturas fibrosas com regularidade direcional chamou atenção. Na imagem 4.7 (à esquerda) percebe-se, em segundo plano, unidades de fibras alinhadas ao plano da imagem. Tal regularidade induz à ideia de que essas estruturas estavam organizadas e empacotadas antes da fratura do material. Além disso as espessuras dessas longas microfibras (entre 2,6 e 3,9 μm) são compatíveis com as dimensões das microfibras cristalinas da quitosana termomecanicamente processada identificadas por Meng e colaboradores [1]. É possível que haja fibras resultantes do mecanismo de microfibrilamento (ou *crazing*) porém o abaixamento da temperatura possivelmente congelou as estruturas amorfas desfavorecendo o escoamento para formar *crazes*, mas não foi suficiente para congelar as fibras cristalinas (mais densas) destacando-as da matriz amorfa. Devido à baixa condutividade térmica dos materiais borrachosos associada à espessura do material ($\sim 700 \mu\text{m}$), a diminuição da temperatura no interior do material não foi suficiente para uma fratura frágil completa (uma vez que as amostras deformaram ligeiramente antes da fratura), mas sim para uma fratura dúctil com um fenômeno de microfibrilamento minimizado. Como o microfibrilamento ou *crazing* é formado devido ao fluxo de material que estabilizam as trincas geradas sob tensão antes da ruptura [67], a diminuição da temperatura impediu ou minimizou o escoamento das cadeias e,

consequentemente, o fenômeno *crazing*, o que possibilitou verificar o desprendimento das microfibras originais da quitosana possivelmente produzidas a partir da recristalização durante o pós-processamento dos materiais (Figuras 4.7, 4.8). Associada ao congelamento da matriz amorfa, a solubilização do glicerol durante o intumescimento antes do tratamento criogênico é outro fator que desfavorece o escoamento das cadeias do biopolímero e contribuiu para o destacamento dessas microfibras e aglomerados nanofibrilares. Além disso ainda pode-se observar que essas microfibras se assemelham a fitas achatadas e não tubulares como se essas fibras estivessem empilhadas uma sobre as outras. Com relação às medidas das estruturas fibrosas, considerando-se que após a fratura o material foi seco em condições ambientais por 2 dias e depois armazenado em 50% de UR por no mínimo 10 dias antes da metalização o tamanho das estruturas determinados pelas imagens de MEV provavelmente correspondem ao tamanho real das estruturas no interior do material (não intumescidos). A observação dessas fibras com este nível de detalhamento nunca foi relatada pela literatura em materiais processados por *casting* e provavelmente estão relacionadas ao desempenho mecânico superior da quitosana processada termomecanicamente, como será abordado adiante na discussão do ensaio mecânico de tração.

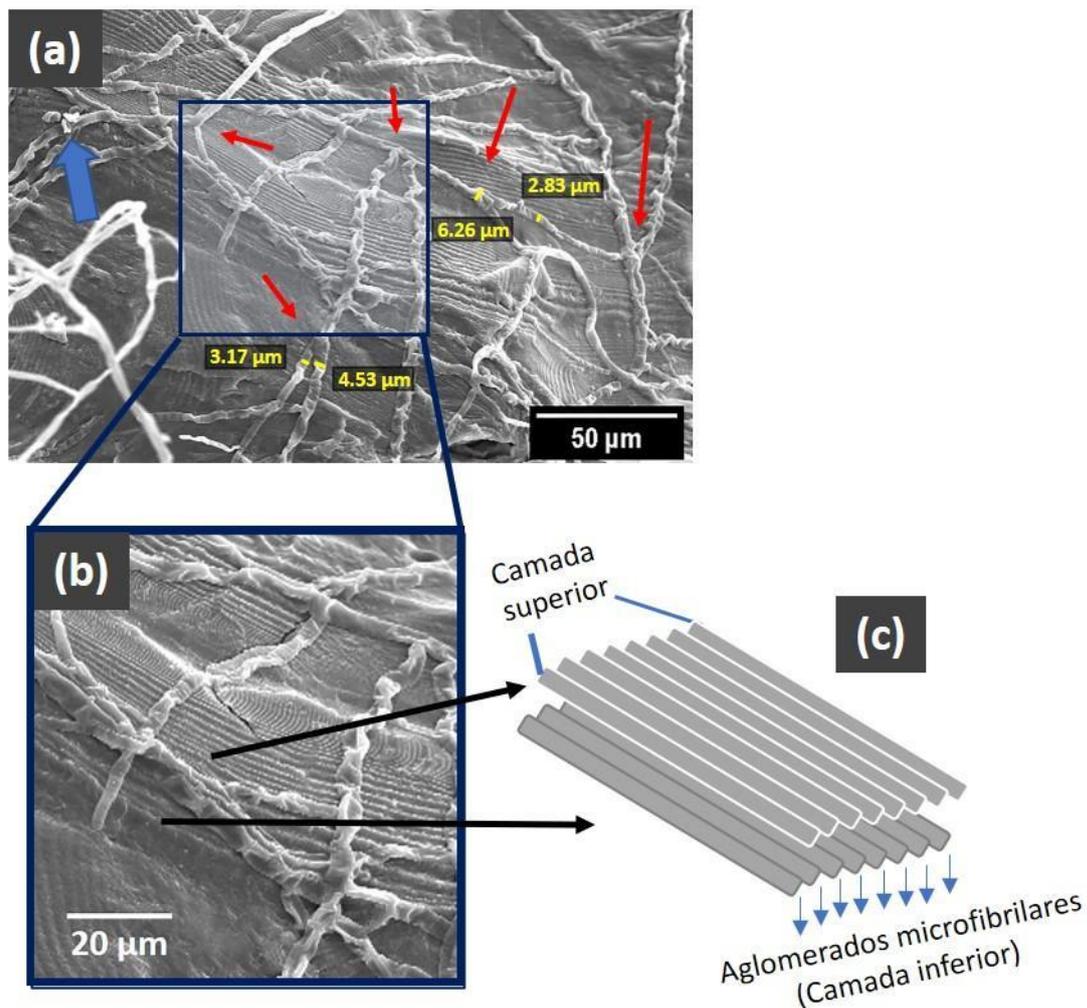


Figura 4.8 – Superfície de fratura dúctil (após imersão em $N_2(l)$ por 10 min) de (a) AC15, (b) ampliação de uma seção da Figura 4.10a, (c) representação esquemática da formação da estrutura em camadas de fibras de quitosana em AC15.

A figura 4.8 apresenta a morfologia da superfície de fratura dúctil em baixa temperatura de AC15 previamente intumescido. Estruturas fibrosas bastante espessas foram apresentadas com poucas evidências da presença de aglomerados nanofibrilares (seta azul). Aparentemente uso do AC favoreceu a formação de estruturas cristalinas superiores, a partir de agora denominadas, aglomerados microfibrilares, com espessura maior que as microfibras identificadas por Meng et al [1]. Esta configuração representa maior nível hierárquico entre as estruturas cristalinas da quitosana processada termomecanicamente. O mecanismo de nucleação e crescimento dessas

estruturas, entretanto, ainda precisa ser estudado. A Figura 4.8 mostra que algumas microfibras da quitosana se unem gerando outras microfibras mais espessas (setas vermelhas), os aglomerados de microfibras. Essas estruturas robustas apresentam estreitamentos periódicos, gerando uma estrutura semelhante a uma vagem de leguminosa. Em relação às estruturas identificadas por Meng e colaboradores, nanofibrilas (menores estruturas cristalinas não distinguíveis por MEV) são núcleos cristalinos entre si formando os aglomerados nanofibrilares com dimensões de cerca de 1-4 μm de comprimento. As microfibras consistem em feixes de alguns desses aglomerados nanofibrilares de cerca de 1 a 3 μm de diâmetro [1]. O que se percebe é que os aglomerados nanofibrilares mostrados na figura 4.7 apresentam morfologia similar a estruturas em forma de discos alongados e côncavos parecidas com células de hemácia. Pelo modelo de Meng *et al* [1] as microfibras são constituídas de feixes desses aglomerados nanofibrilares que nuclearam-se gerando as microfibras. De fato, na figura 4.8 observa-se mais claramente que o aspecto morfológico dos aglomerados microfibrilares são compatíveis com os aglomerados nanofibrilares como unidades de repetição que nuclearam entre si gerando uma estrutura semelhante a uma vagem de leguminosa. Na imagem 4.7 (TPC) percebe-se agrupamentos de aglomerados nanofibrilares sobre as microfibras de TPC (setas em amarelo) possivelmente em processo de nucleação para gerar aglomerados microfibrilares. Esta hipótese, entretanto, precisa ser devidamente investigada. A figura 4.9 e 4.10 apresenta uma representação esquemática dos possíveis processos de nucleação dos diferentes níveis estruturais formando estruturas superiores em TPC e em AC15. Além disso, independentemente do mecanismo que deu origem a essas estruturas fibrosas, o fato de serem geradas estruturas mais espessas em AC15 certamente está intimamente associado ao desempenho mecânico apresentado na próxima seção desta tese.

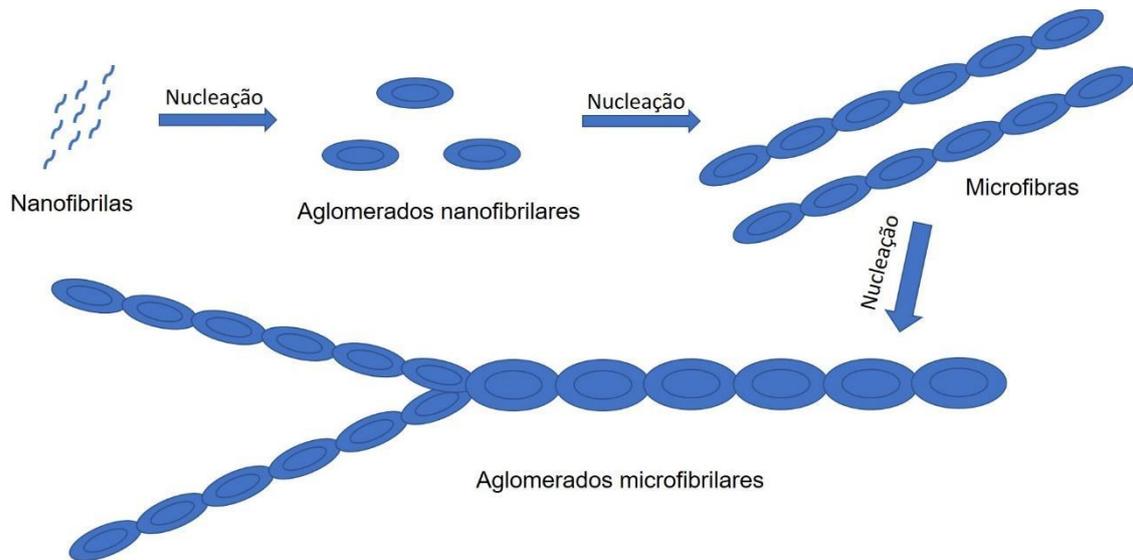


Figura 4.9 – Representação esquemática do possível processo de nucleação dos diferentes níveis estruturais formando estruturas superiores a partir das nanofibrilas (AC15).

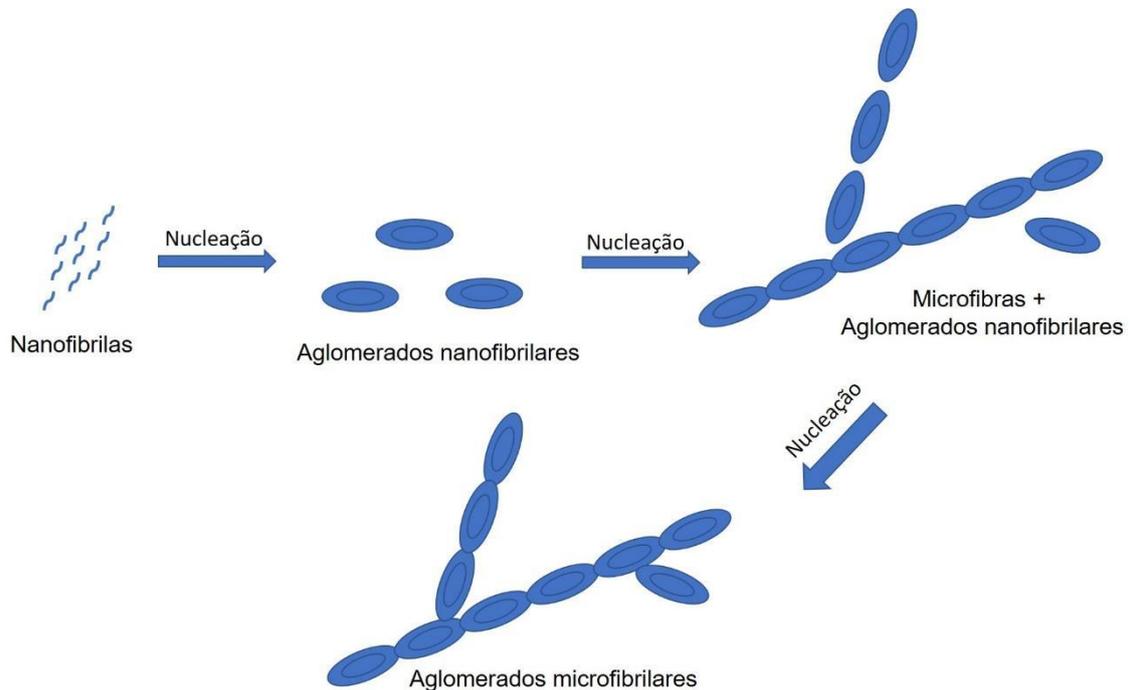


Figura 4.10 – Representação esquemática do possível processo de nucleação dos diferentes níveis estruturais formando estruturas superiores a partir das nanofibrilas (TPC).

Os aglomerados de microfibras identificados neste trabalho consistem no agrupamento de microfibras longas, gerando estruturas com espessuras variando entre 2,83 e 6,26 μm . A partir da Figura 4.8 pode-se também verificar que as microfibras e aglomerados microfibrilares podem ser empilhados, gerando a estrutura em camadas típica de materiais à base de quitosana processados termomecanicamente [27,102,113]. O plano de empilhamento microfibrilar sobrepõe-se a outros planos de empilhamento microfibrilares paralelos que estavam na mesma direção do plano de empilhamento superior (Figuras 4.8(b) e 4.8(c)).

Para a amostra AC10, o tempo de imersão de 10 min em N_2 (liq) gerou uma superfície de fratura com morfologia de fratura frágil (Figura 4.11) incluindo a presença de uma morfologia de camadas típica da quitosana [27,102]. A estruturação em camadas composta por planos de microfibras adjacentes também é confirmada pela análise da figura 4.11 (seta branca) na qual a vista lateral à um domínio em camadas pode ser visto com o empilhamento de microfibras. Além disso pode-se ver algumas poucas estruturas semelhantes em dimensão aos aglomerados nanofibrilares (seta amarela). O baixo teor de estruturas de menores níveis hierárquicos podem indicar que essas estruturas menores nuclearam eficazmente gerando estruturas superiores com poucos aglomerados nanofibrilares remanescentes. Por último pode-se observar que algumas camadas apresentam maiores espaçamentos podendo-se entender que as microfibras que formam estas camadas estavam na iminência de serem arrancadas de seu ordenamento estrutural (setas verdes) pela tensão aplicada durante a fratura manual após tratamento criogênico por 10 min.

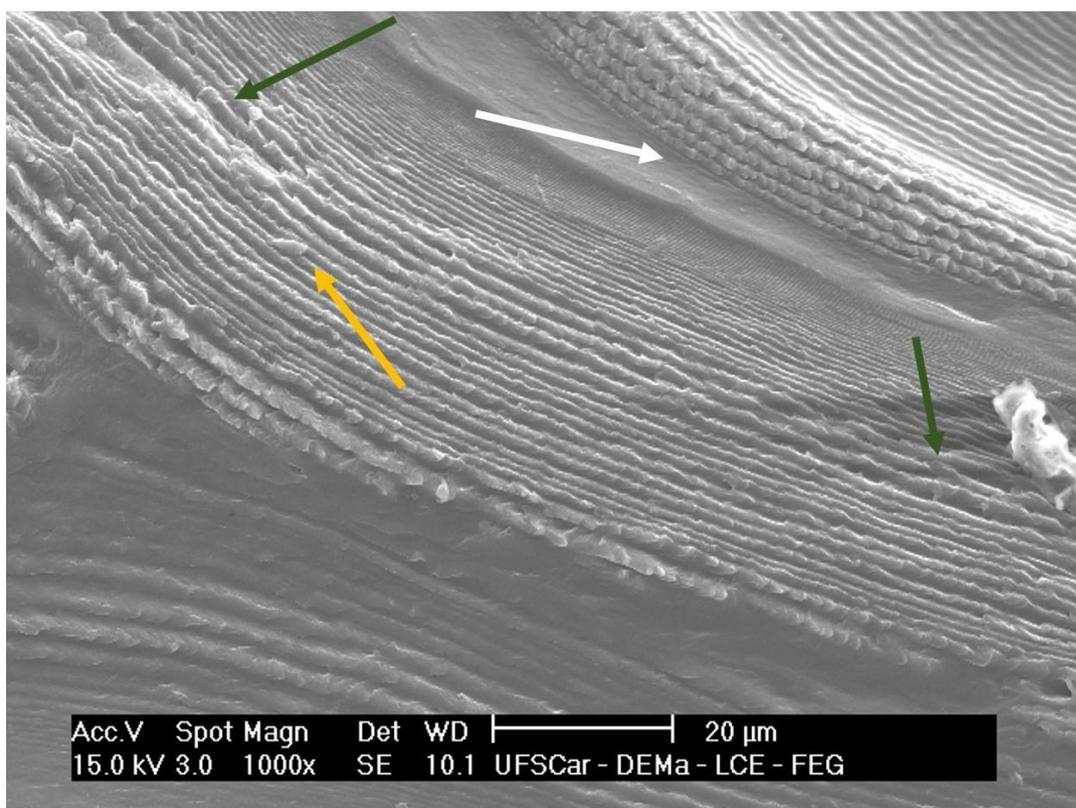


Figura 4.11 – Superfície de fratura de AC10 (após imersão em $N_2(l)$ por 10 min).

Nas amostras reticuladas, o conteúdo ao menos cinco vezes maior de unidades de glucosamina em relação ao teor de AC (além das unidades acetiladas igualmente passíveis de ordenamento estrutural) pode ter levado a uma organização das cadeias e segmentos moleculares não afetados pela reticulação química, levando à formação de fibras espessas. Assim, mesmo em pequena quantidade, o AC foi importante para destruir a estrutura do pó de quitosana (por ação da protonação dos grupos amins em conjunto com a ação do cisalhamento), favorecendo sua processabilidade sendo também eficiente para promover reticulação química e ainda permitir a recristalização da quitosana em microfibras espessas apesar de obviamente recristalizar em menor proporção (menor cristalinidade).

A identificação da ocorrência e predominância das diferentes estruturas cristalinas em cada material é de relevante importância pois além do reforço mecânico normalmente alcançado pela reticulação química, a existência das fibras robustas justifica o incremento mecânico que os materiais AC10 e AC15

alcançaram em relação ao TPC e em relação à materiais análogos processados por *casting*, como será visto a seguir.

4.1.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas foram determinadas pelo ensaio de tração uniaxial. Na Figura 4.12 são exibidas as curvas representativas do ensaio de tração das amostras TPC, AC10 e AC15 e constatou-se que a presença do AC influenciou tais propriedades uma vez que as respectivas estruturas internas visualizadas nos materiais reticulados estão associadas ao comportamento mecânico superior [40]. Os gráficos das demais réplicas de cada amostra seguem na figura C1 (Apêndice C). Todos os materiais apresentam comportamento dúctil, entretanto é notável que os materiais reticulados apresentam resistência à tração bem maior em relação ao material de controle (TPC). Além da maior resistência à tração, o módulo elástico das amostras processadas com AC também é maior.

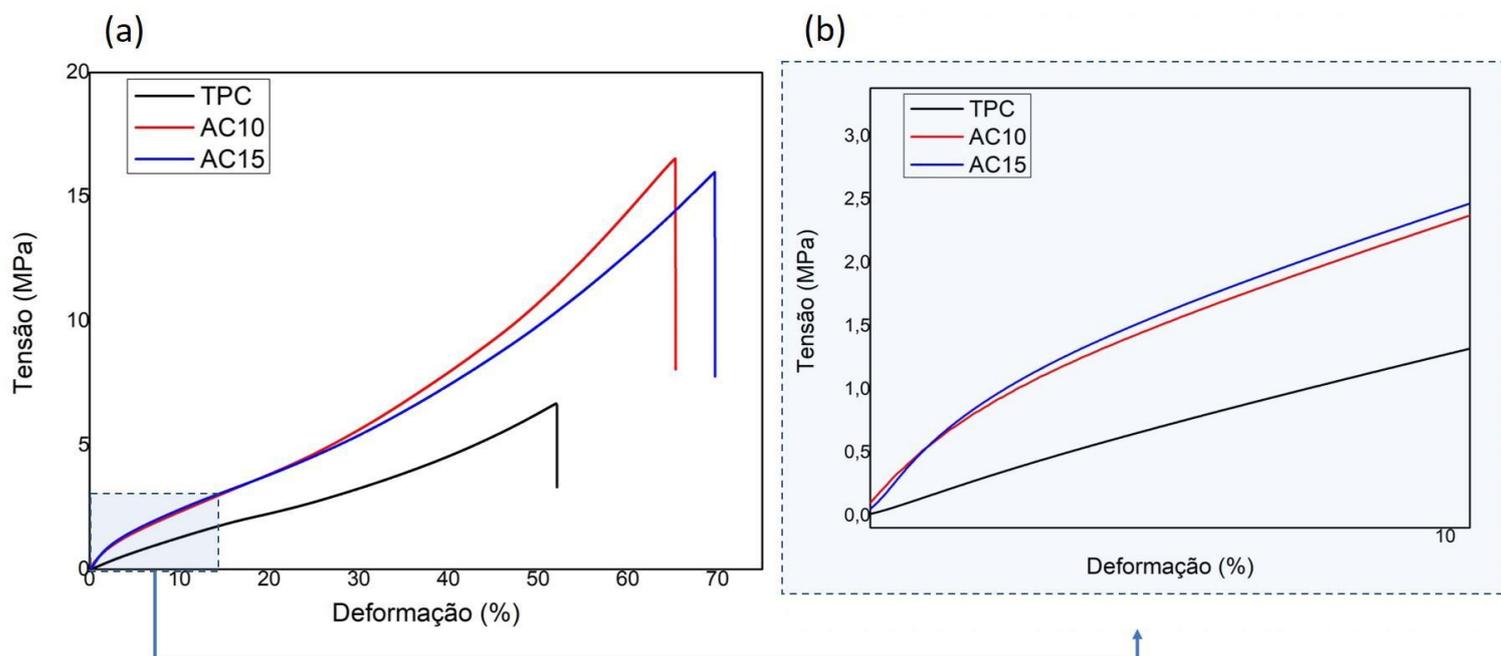


Figura 4.12 – (a) Curvas representativas do comportamento mecânico sob tração de TPC, AC10 e AC15 e (b) ampliação da parte inicial das curvas.

Para uma melhor compreensão dos valores alcançados por meio do ensaio de tração os valores das propriedades mecânicas serão exibidos em gráficos de barras (figura 4.13). Para avaliação de potenciais aplicações como biomaterial o ensaio mecânico também foi realizado com os corpos de prova intumescidos em solução PBS por 40 h. Avaliando-se inicialmente as amostras secas, a figura 4.13 mostra que a resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade dos materiais aumentaram com o uso de AC em comparação ao material processado na presença de HAc, entretanto as propriedades de AC10 e AC15 foram consideradas estatisticamente iguais. A resistência à tração do TPC aumentou de $6,9 \pm 0,3$ MPa para $17,3 \pm 1,6$ MPa (AC10) e $17,0 \pm 2,0$ MPa (AC15). O módulo de elasticidade do TPC aumentou de $16,3 \pm 1,3$ MPa para $52,3 \pm 2,4$ MPa (AC10) e $53,7 \pm 2,6$ MPa (AC15). Apesar do relativo baixo grau de cristalinidade de AC15, os aglomerados microfibrilares robustos contribuíram para um aumento de 145% na resistência à tração e 230% no módulo de elasticidade para as amostras de quitosana reticulada termomecanicamente. Outros autores encontraram um aumento nas propriedades mecânicas das quitosanas reticuladas produzidas por evaporação do solvente (*casting*) ou pelo método de termoprensagem na ordem de 30% e 80%, respectivamente [40,43]. Mais ainda, o alongamento na ruptura aumentou em aproximadamente 35% de $48,1 \pm 3,8\%$ (TPC) para $65,0 \pm 2,00\%$ e $68,3 \pm 6,5\%$ para AC10 e AC15, respectivamente. Como o teor de glicerol foi o mesmo para todas as amostras, esse aumento pode ser atribuído ao efeito plastificante do AC que eventualmente não reticulou a quitosana, conforme relatado em estudos anteriores [40,103].

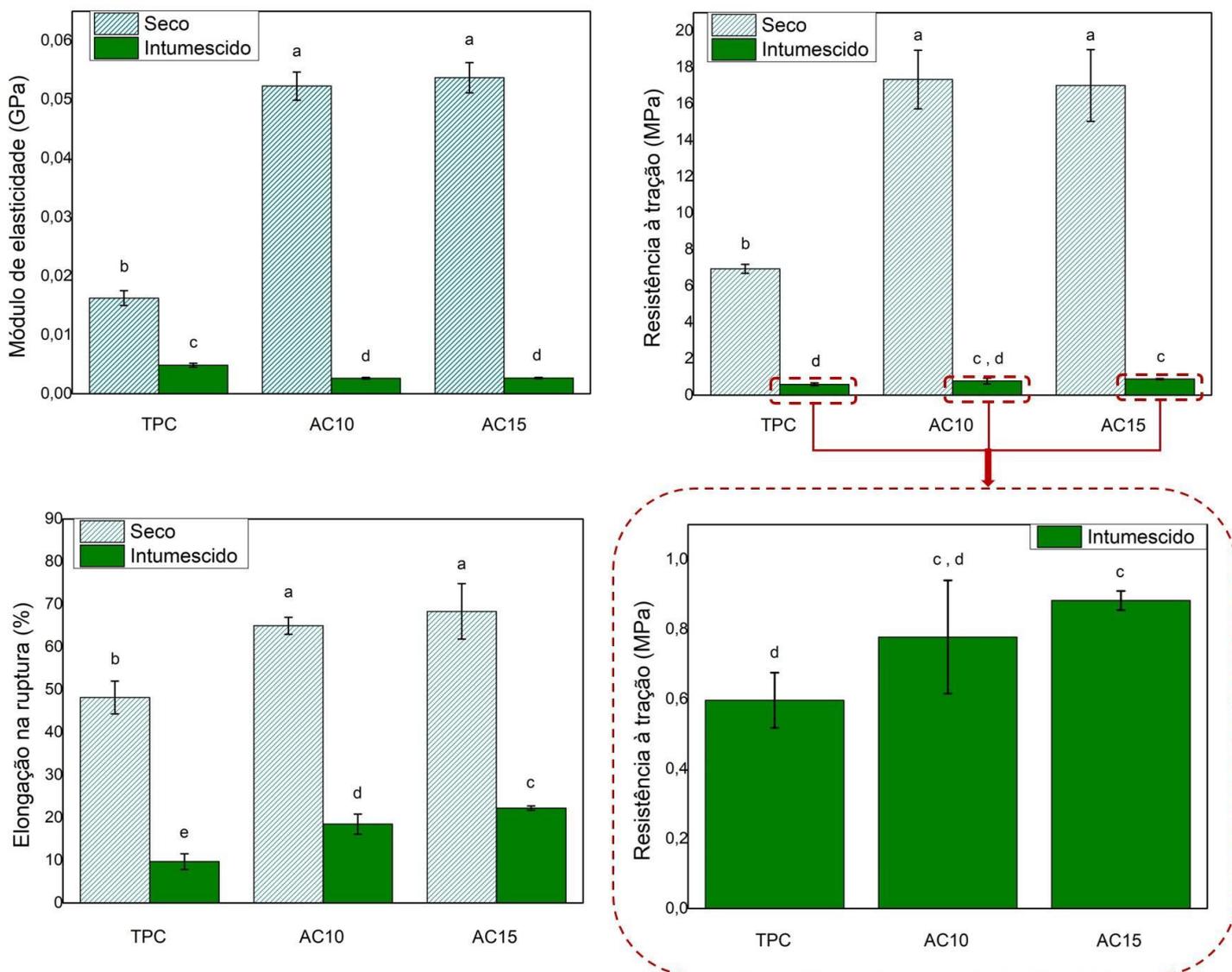


Figura 4.13 – Propriedades mecânicas de placas de quitosana processadas com ácido acético e ácido cítrico. a, b, c, d, e Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Para aplicações biomédicas, o comportamento mecânico em condições úmidas é crítico. Por esse motivo, os materiais foram testados após 40 h de imersão em solução de PBS. Como esperado, houve uma redução drástica nas propriedades mecânicas de todas as amostras devido à diminuição das interações secundárias entre as cadeias de quitosana devido à plastificação excessiva à medida que os materiais absorvem água. Nesta circunstância, o

alongamento e a resistência à tração na ruptura apresentaram valores decrescentes para AC15, AC10 e TPC, respectivamente (Figura 4.13). De forma contrária, o módulo de elasticidade foi inferior para as amostras contendo teores crescentes de AC assim os valores do módulo elástico para TPC, AC10 e AC15 são $5,0 \pm 0,3$, $2,7 \pm 0,1$ e $2,7 \pm 0,1$ MPa, respectivamente. Esse efeito foi atribuído à maior capacidade de absorção de água das amostras contendo AC, uma vez que a água atua como um plastificante volátil [1,3]. Em comparação com as propriedades da amostra sob condição seca, a resistência à tração diminuiu de $6,9 \pm 0,3$, $17,3 \pm 1,6$ e $17,0 \pm 2,0$ MPa para 596 ± 79 , 778 ± 162 e 882 ± 27 kPa, respectivamente para TPC, AC10 e AC15. Além de uma diminuição nas interações entre as cadeias do biopolímero, o excesso de água nos materiais inchados pode ter levado à separação de fases (ou seja, fases ricas e pobres em quitosana), resultando em uma menor resistência mecânica [27], no entanto, essa hipótese exigiria uma investigação mais aprofundada. Embora com menor módulo de elasticidade no estado intumescido de AC10 e AC15 em comparação com TPC, suas respectivas resistências à tração na ruptura permaneceram superiores. As resistências à tração de TPC e de AC15 mostraram-se estatisticamente diferentes entre si, correspondendo a uma resistência à tração significativamente maior mesmo em condições fisiológicas, o que pode ampliar suas áreas de aplicação. Os resultados indicam que o processamento termomecânico da quitosana com AC pode resultar em um desempenho mecânico superior em relação ao material processado com ácido acético. A observação também é aplicável em condições úmidas, quando os materiais estão inchados. O alongamento na ruptura das amostras inchadas diminuiu para $9,70 \pm 1,8\%$ (TPC), $18,5 \pm 2,3\%$ (AC10) e $22,3 \pm 0,5\%$ (AC15), de modo que as amostras reticuladas ainda possuem boa ductilidade. A resistência à tração do AC15 intumescido mostrou-se semelhante à de um arcabouço (*scaffold*) multicamadas de hidrogel de quitosana-gelatina suportado por uma matriz de PCL para engenharia de tecido cardíaco [26]. Os gráficos dos ensaios sob condições fisiológicas de temperatura e pH estão apresentados na figura C2 (Apêndice C).

4.1.6 Propriedades físicas e físico-químicas

As propriedades físicas e físico-químicas são aspectos importantes a serem considerados ao se projetar um material como um potencial biomaterial especialmente se a aplicação pretendida envolver contato com fluidos corporais como no caso de coberturas de feridas, arcabouços para engenharia de tecidos, dispositivos para liberação controlada de fármacos, etc. Uma vez que a cobertura de ferida, por exemplo, tem que entrar em contato diretamente com o local da ferida infectada, então biocompatibilidade e uma boa absorção de água são propriedades vantajosas para qualquer material de cobertura de feridas [114]. Dessa forma as propriedades físicas e físico-químicas das amostras foram determinadas a partir da espessura, densidade, teor de água, solubilidade, curva de absorção de água durante 24 h em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH = 7,4) e a análise dimensional no estado intumescido. Os dados das propriedades físicas e físico-químicas foram calculados conforme descrito na seção 3.3.5 e são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Propriedades físicas e físico-químicas das amostras processadas com diferentes teores de AC.

	TPC	AC10	AC15
Espessura (μm)	793,89 \pm 18,98 ^a	737,78 \pm 16,31 ^b	725,00 \pm 20,50 ^b
Densidade (g/cm^3)	1,269 \pm 0,062 ^a	1,308 \pm 0,059 ^a	1,322 \pm 0,035 ^a
Teor de água (%)	19,93 \pm 0,74 ^a	17,38 \pm 0,48 ^b	16,82 \pm 0,79 ^b
Teor de glicerol (%)	31,58 \pm 0,34 ^a	29,34 \pm 0,28 ^b	26,97 \pm 0,69 ^c
Absorção de água em PBS (%)	90,67 \pm 3,75 ^c	122,67 \pm 1,86 ^b	137,62 \pm 1,52 ^a
Solubilidade (%)	31,00 \pm 1,20 ^b	31,90 \pm 1,06 ^{a, b}	32,92 \pm 0,46 ^a

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

As placas de quitosana processadas na presença de ácido acético (TPC) apresentaram maior espessura e menor densidade do que as amostras reticuladas (AC10 e AC15). A espessura e a densidade do AC10 diminuíram e aumentaram, respectivamente, com a incorporação do AC. Blendas reticuladas de amido / quitosana feitas por evaporação do solvente mostraram uma maior espessura e densidade para filmes reticulados com aumento do teor de AC [103]. Os autores relataram que a espessura do filme era diretamente proporcional à concentração de sólidos na formulação, e o aumento do conteúdo de AC contribuiu para o maior teor de sólidos nesses filmes. Os materiais processados termomecanicamente têm outro aspecto físico. O aumento da quantidade de AC (AC15) levou a um maior grau de reticulação, o que aproxima as cadeias de quitosana e resultou em uma estrutura mais compacta com maior densidade e menores espessuras [103,115]. Este comportamento era esperado, uma vez que as amostras plastificadas não reticuladas (TPC) não possuem cadeias quimicamente ligadas. Como resultado, as cadeias de quitosana no TPC tem um maior volume livre após a prensagem, o que faz com que o material fique mais espesso e com menor densidade. Em contrapartida, as amostras reticuladas têm suas cadeias quimicamente ligadas entre si de forma a promover uma diminuição na espessura e um aumento na densidade.

O teor de água das amostras após 35 dias de armazenamento apresentou ligeira variação, atingindo um valor de equilíbrio (UR = 50%) entre $16,82 \pm 0,79\%$ e $19,93 \pm 0,74\%$ com uma pequena diferença entre elas. As amostras reticuladas possuíam teores de água mais baixos. O teste de Tukey indica uma diferença estatística entre TPC, AC10 e AC15, mas não entre AC10 e AC15. Wu e colaboradores [103] atribuíram o menor teor de água de tais amostras reticuladas a uma diminuição nos grupos NH_2 hidrofílicos na cadeia de quitosana devido à reação de reticulação e à geração resultante de grupos amida hidrofóbicos [116]. Como o teor de glicerol adicionado a cada formulação foi idêntico, a diferença no teor de glicerol em cada amostra possivelmente deve-se a volatilização parcial do glicerol na termoprensagem a 130°C , como o material reticulado absorve mais energia térmica para a reação de amidação ocorrer esses materiais terão um

teor de glicerol menor. Além disso o menor espaço entre as cadeias reticuladas podem abrigar menores teores de glicerol.

O conhecimento do grau de intumescimento dos materiais é necessário para investigar seu potencial para aplicações biomédicas. Após 24 h de imersão na solução de PBS, a capacidade de absorção de TPC, AC10 e AC15 foi $90,67 \pm 3,75\%$, $122,67 \pm 1,86\%$ e $137,62 \pm 1,52\%$, respectivamente. As curvas de absorção de água (Figura 4.14(a)) indicam que a absorção ocorre de forma abrupta nos primeiros 20 min. Posteriormente, a absorção de água da amostra TPC permanece constante, enquanto AC10 e AC15 continuam a absorver água com AC15 exibindo uma taxa de absorção de água mais alta. Guerrero e colaboradores [40] relacionaram a maior absorção de água para amostras reticuladas obtidas por termoprensagem ao grau de cristalinidade da quitosana reticulada, onde as amostras preparadas por termoprensagem apresentaram menor cristalinidade e maior capacidade de intumescimento. No presente estudo, não foi observada relação entre a cristalinidade e a capacidade de absorção de água dos materiais obtidos, uma vez que a amostra AC10 processada termomecanicamente, que apresenta maior cristalinidade ($X_c = 28,3\%$) do que TPC ($X_c = 22,0\%$), exibiu uma maior capacidade de absorção de água. Neste caso a maior absorção de água de AC10 foi associada à presença de AC. Apesar da restrição estérica imposta pelas reticulações químicas, as moléculas de água têm um tamanho hidrodinâmico menor do que o agente de reticulação, o que permite que a água se difunda entre as cadeias reticuladas, mesmo que lentamente, porque as amostras reticuladas são mais densas. O espaço entre as cadeias reticuladas atua como armadilhas (*trappings*) que podem reter grandes quantidades de água que são estabilizadas pelas interações entre o biopolímero e o AC [5]. Senna et al afirmam, baseados na teoria de Flory-Rehner, que em baixas densidades de reticulações ocorre o afastamento das cadeias poliméricas favorecendo uma maior quantidade de solvente entre as cadeias [117]. Apesar da teoria de Flory-Rehner indicar que a densidade de reticulações é inversamente proporcional ao grau de inchamento de um polímero reticulado, a natureza hidrofílica do agente reticulante deve contribuir para uma maior retenção hídrica em relação ao polímero não

reticulado. Desta forma, a estrutura química e o teor de AC influenciam a capacidade de absorção de água das placas de quitosana processadas termomecanicamente. Em contraste, os materiais de quitosana reticulados com AC obtidos por evaporação do solvente mostraram uma absorção de água reduzida [6,42,103,108]. A divergência entre os resultados obtidos para os materiais mecanicamente processados e os da literatura (processados por *casting*) pode ser atribuída à diferença nas técnicas de processamento empregadas que resulta em diferenças estruturais. Para materiais feitos por evaporação do solvente, as cadeias de quitosana foram solubilizadas e desemaranhadas adquirindo, portanto, o máximo volume livre antes da reação de reticulação, gerando uma macro e micromorfologia distintas. Os resultados físico-químicos obtidos indicam que AC15 e AC10 podem ser úteis em aplicações de cicatrização de feridas onde o biomaterial deve ser capaz de absorver grandes quantidades de exsudatos.

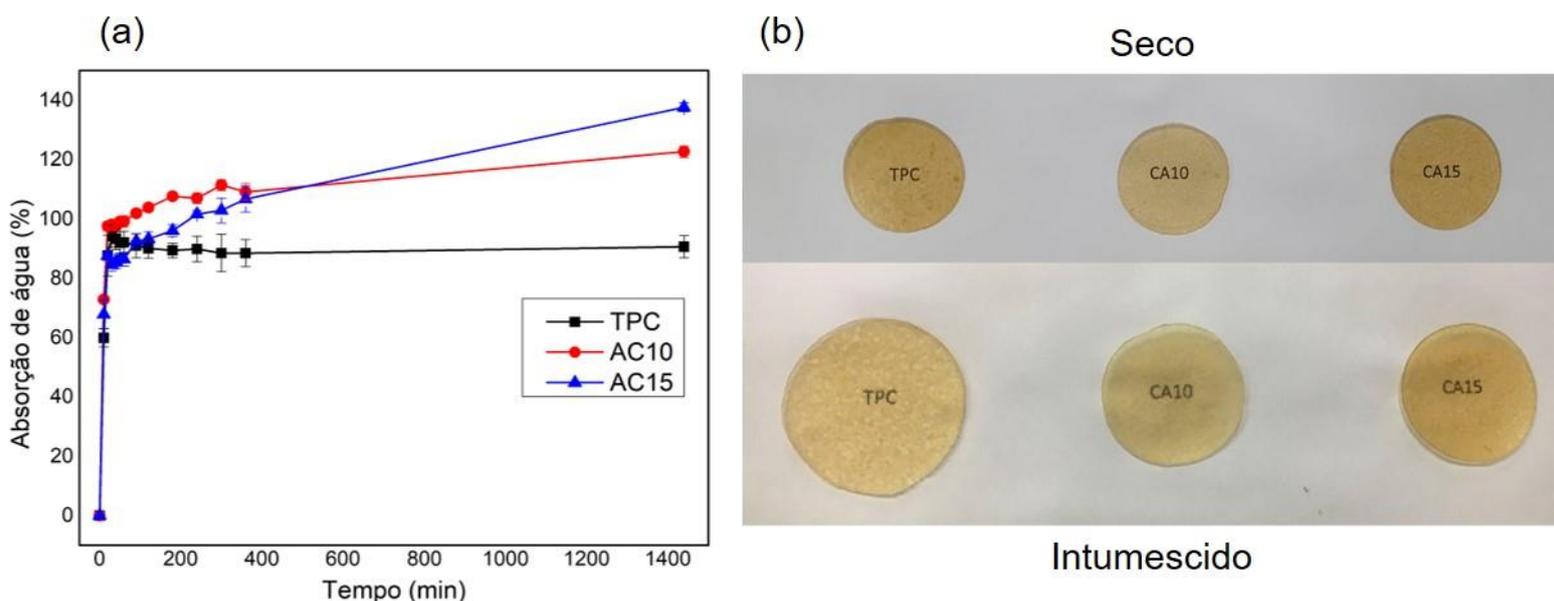


Figura 4.14 – (a) Curvas de absorção de água das placas de quitosana em solução de PBS a 37 ° C e (b) aparência física dos materiais antes e depois do intumescimento.

O aspecto físico dos materiais termomecanicamente processados antes e depois do intumescimento pode ser visualizada na Figura 4.14(b). Após o teste

de intumescimento (40 h), as amostras apresentaram integridade estrutural sem evidência de formação de trincas por intumescimento. Apesar da maior capacidade de absorção de água das amostras reticuladas, elas mostraram uma menor capacidade de expansão devido à reticulação química (22,8%, 25,7% e 42,8% com relação ao diâmetro para AC10, AC15 e TPC, respectivamente). As imagens antes e após o inchamento dos materiais são aparentemente inconsistentes com as curvas de absorção em PBS. O entendimento é de que como os materiais que não sofreram reticulação química apresentam maior volume livre, pois não possuem suas cadeias poliméricas quimicamente ligadas entre si, isso permite que, ao absorver água, essas amostras se expandam excessivamente. Assim, nas amostras reticuladas, a interação da água com a quitosana e com o AC hidrofílico é positiva e eficiente o suficiente para alcançar maior estabilidade estrutural (dimensional) mesmo com maior teor de água pelo efeito de aprisionamento da água mencionado anteriormente aliado ao menor volume livre da quitosana reticulada. Em contrapartida, a interação da água com a amostra de TPC causou inchaço excessivo devido à expansão do volume livre do biopolímero, resultando em uma configuração expandida. Aliada a maior capacidade de absorção de água, a menor extensibilidade é benéfica pois pode ser importante para se evitar algum nível de maceração na região do ferimento em aplicações como coberturas para cicatrização de feridas.

O teor de glicerol apresentou uma pequena diferença onde a amostra não reticulada apresentou maior teor do plastificante. Apesar da mesma quantidade de glicerol adicionado em todas as formulações, essa diferença que é atribuída ao maior teor de sólidos na formulação das amostras reticuladas gerando um menor percentual do plastificante. Quanto à solubilidade após 24 h, a Tabela 4.1 evidencia que todas as amostras apresentaram solubilidade semelhante, que está em torno de 31%. No entanto, as solubilidades das amostras TPC e AC15 foram consideradas estatisticamente diferentes. A solubilidade encontrada nas amostras foi essencialmente atribuída à solubilização do glicerol adicionado à formulação (1/3 em relação ao teor de quitosana - Tabela 4.1).

Diante dos resultados encontrados verificou-se que a utilização de 15 pcr foi vantajosa, visando aplicações biomédicas, em relação ao teor de 10 pcr

especialmente por sua maior capacidade de absorver água e menor extensibilidade.

4.1.7 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi obtida a fim de se compreender a estabilidade térmica dos materiais em relação ao teor do AC ou HAc e relacioná-las à provável hidrólise ácida do polissacarídeo após o processamento. Uma vez que as amostras com AC foram insolúveis em meio ácido devido à reticulação química entre as cadeias, uma análise quantitativa via cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) não foi possível de se obter. A figura 4.17 (a) exhibe os termogramas do pó de quitosana e das amostras TPC, AC10 e AC15 enquanto a fig. 4.15 (b) mostra a primeira derivada de perda de massa em função da temperatura (curva DTG) para o pó de quitosana e para as amostras TPC, AC10 e AC15. Para fins de uma maior clareza as curvas TGA e DTG do ácido cítrico e glicerol são apresentados na figura D1 (Apêndice D). A quitosana apresenta dois eventos característicos de decomposição térmica, o primeiro inicia a temperatura ambiente e evolui até 125°C correspondendo a evaporação de moléculas de água na estrutura da quitosana enquanto que o segundo estágio de perda de massa inicia a 250°C (pico DTG a 293.3°C) correspondendo a degradação térmica das cadeias de quitosana [6].

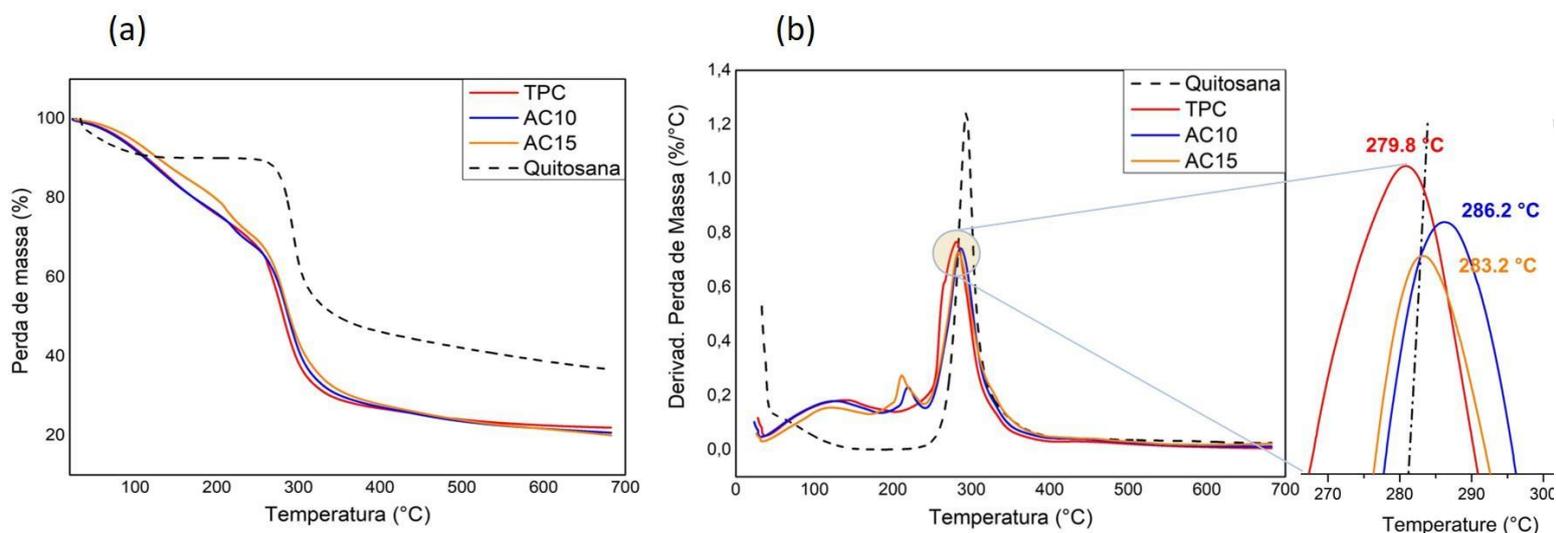


Figura 4.15 – (a) Curvas termogravimétricas das amostras TPC, AC10, AC15, glicerol, pó de quitosana e ácido cítrico e (b) curva da primeira derivada do TGA (curva DTG).

As amostras de quitosana processadas apresentam perfis termogravimétricos semelhantes ao do pó de quitosana. Entretanto as amostras reticuladas apresentaram 3 eventos térmicos enquanto que a amostra TPC apresentou 2 eventos térmicos. A primeira perda de massa ocorreu continuamente desde a temperatura ambiente até 203°C, 183°C e 171°C para TPC, AC10 e AC15, respectivamente, correspondendo a perda de água, glicerol e ácido acético (no caso da TPC) [1,35]. A amostra AC15 apresenta a perda completa de plastificantes em temperaturas menores que as outras amostras pois apresenta o menor teor de água e glicerol conforme a tabela 4.1. A segunda perda de massa evidenciada para as amostras reticuladas, tem início a 171°C e finaliza a 239°C (pico DTG a 211.1°C) para AC15 enquanto que para AC10 esse evento térmico ocorre entre 183°C a 240°C (pico DTG a 218.9°C). Considerando-se o termograma do AC (Figura C1), este segundo estágio de perda de peso está relacionado a degradação de segmentos do ácido cítrico livres ou enxertado à cadeia de quitosana (AC como grupo lateral). Como o pico DTG do AC ocorre a 206.3°C (Figura C1) o deslocamento deste pico para temperaturas superiores nas amostras reticuladas pode ser atribuído às ligações intermoleculares existentes nas amostras AC15 e AC10 aumentando a

estabilidade térmica do AC. O terceiro estágio de perda de peso observado nos termogramas das amostras processadas, e mais precisamente nas curvas DTG, é relacionado à degradação da cadeia do polissacarídeo mais precisamente à decomposição dos grupos laterais amina e acetilamina do biopolímero seguido pela degradação das ligações glicosídicas e degradação do éter cíclico presente no anel quitosana [103,105,108,118].

Para as amostras TPC, AC10 e AC15 a degradação térmica inicia-se a 203°C, 240°C e 239°C, respectivamente com picos DTG a 279.8°C, 286.2°C e 283.2°C respectivamente, enquanto que o pico DTG e início de degradação térmica para o pó de quitosana encontra-se a 293.3°C e 250°C, respectivamente. Com base nos resultados da TGA os materiais processados apresentam uma menor estabilidade térmica de cerca de 10 °C em relação ao pó de quitosana. Uma menor estabilidade térmica era esperada para os materiais processados uma vez que a ação do cisalhamento e da acidificação da quitosana resultam interações inter cadeia reduzidas [38] reduzindo naturalmente a estabilidade térmica dos polímeros, entretanto entre os materiais processados percebe-se que a presença do AC resultou numa maior estabilidade térmica de AC10 e AC15, em relação à TPC. Uma vez que o teor molar de AC foi inferior ao teor molar de HAc, a saber, 1.575 mmol de HAc / 1 g de quitosana; 0.78 mmol de AC / 1 g de quitosana e 0.52 mmol de AC / 1g de quitosana para TPC, AC15 e AC10, respectivamente, possivelmente ocorreu um menor efeito de hidrólise ácida pelo AC em relação a HAc. Além disso houve um alto consumo de grupos carboxílicos na reação de reticulação (comprovado pela análise FTIR) resultando em baixa quantidade de íons H_3O^+ livres, em relação ao material processado com HAc. Os íons hidrônios no material pode hidrolisar o polissacarídeo ao longo do tempo de armazenamento. Outra possível explicação para a discreta melhor estabilidade térmica dos materiais contendo AC baseia-se na rede de interações intermoleculares gerada em razão da ocorrência das reticulações químicas que aproximam as cadeias e diminuem a movimentação dos segmentos próximos às reticulações químicas. De forma geral, pode-se concluir que o AC não resultou em alterações significativas na estabilidade térmica dos materiais processados além das alterações esperadas em virtude do processamento térmico do

biopolímero resultando em materiais com estabilidade térmica mais próximas a do pó de quitosana.

4.1.8 Avaliação dos materiais obtidos

Baseados nos resultados obtidos na etapa de obtenção dos materiais conclui-se que o material com 15 pcr de AC apresentou o melhor conjunto de propriedades visando-se uma aplicação biomédica. Apesar de todos os materiais apresentarem boa integridade estrutural em meio úmido, o AC15 apresentou coesão morfológica, maiores propriedades mecânicas em relação ao material de referência, bem como maior capacidade de absorção de água o que é uma vantagem para um melhor desempenho em aplicações como coberturas de feridas e como dispositivo para liberação controlada de fármacos. Os achados morfológicos significaram uma contribuição adicional à ciência dos polissacarídeos, especificamente da quitosana, e dão suporte ao entendimento do alto incremento mecânico alcançado pelos materiais à base de quitosana termomecanicamente processados. Diante disso o material AC15 foi selecionado para prosseguir para a etapa 2 desta tese, na qual o AC15 e o material de referencia (TPC) serão analisados quanto à metodologia de neutralização, recuperação de glicerol e caracterização final. Os resultados serão comparados com aqueles dos materiais como obtidos (materiais “originais”) e discutidos em função de seu desempenho com relação à aplicação pretendida.

4.2 Neutralização dos materiais

Devido à necessidade do uso de um ácido orgânico no processamento da quitosana para o para interromper as fortes interações intermoleculares que leva à baixa processabilidade deste material, uma acidez residual nos materiais é inevitável. Nesta parte da pesquisa uma nova abordagem de neutralização dos materiais à base de quitosana em meio tamponado e posterior recuperação do glicerol será avaliada bem como seus respectivos efeitos no material selecionado na seção 4.1 (AC15) como candidato promissor a ser utilizado em

aplicações biomédicas e comparado ao material de referência (TPC) neutralizado com base na mesma metodologia.

4.2.1 Teor de plastificantes

Após a neutralização dos materiais AC15 e TPC, dependendo do tempo de imersão em glicerol as amostras apresentaram flexibilidades distintas perceptíveis à manipulação das mesmas. As amostras de AC15 com maiores tempos de imersão foram extremamente flexíveis enquanto que àquelas com menor tempo de imersão mostraram-se bastante rígidas com quinças perfurantes. As amostras TPC também apresentaram a mesma tendência, entretanto mostraram-se mais rígidas que as amostras AC15 com mesmo tempo de imersão em glicerol. Essa diferença está intimamente ligada ao teor de plastificantes (água e glicerol) nas amostras. Na tabela 4.2 podem ser visualizados os teores de água e de glicerol para cada condição de imersão em glicerol após a neutralização.

Tabela 4.2 – Teor de água, glicerol e total de plastificantes nas amostras neutralizadas em diferentes tempos de imersão em glicerol e nas amostras originais (antes da neutralização). Valores em vermelho destacam os teores dos materiais originais e os valores em negrito destacam a composição que mais se aproximam do valor do material original de referência.

Tipo de plastificante	Material	Pré- neutralizaçã o	2 min	1 min	30 seg	5 seg
Teor de glicerol (%)	TPC	31,58 ± 0,34	41,53 ± 2,35	21,67 ± 0,95	17,23 ± 0,95	---
	AC15	26,97 ± 0,69	48,50 ± 3,62	31,86 ± 0,50	25,20 ± 2,59	14,79 ± 0,87

Teor de água (%)	TPC	19,93 ± 0,74	17,68 ± 0,76	10,09 ± 0,50	8,90 ± 0,23
	AC15	16,82 ± 0,79	21,07 ± 0,79	13,41 ± 0,33	10,86 ± 0,80
Total de plastificantes (%)	TPC	51,51	59,20	31,75	26,13
	AC15	43,79	69,58	45,27	36,06

Naturalmente quanto maior o tempo de imersão maior o teor de glicerol nas amostras. Entretanto assim como observado na análise de capacidade de absorção de água das amostras não neutralizadas (seção 4.1.6) as amostras contendo ácido cítrico apresentaram maiores capacidades de absorção de glicerol. De maneira similar ao que ocorre no AC15 original, para o AC15 neutralizado o glicerol (com tamanho hidrodinâmico menor que o tamanho do agente de reticulação) consegue permear entre as cadeias de quitosana apesar da restrição estérica imposta pelas reticulações químicas. Dessa forma os espaços entre as cadeias reticuladas atuam como armadilhas que podem reter maiores quantidades de glicerol de forma que o glicerol seja estabilizado pelas interações entre o biopolímero e o AC ambos de caráter hidrofílico (figura 4.16) [5]. Possivelmente há uma densidade de reticulação limite onde o comportamento de aprisionamento de água e glicerol se inverte, apesar da grande hidrofilicidade promovida pela presença do AC, devido à alta densidade de cadeias poliméricas dificultando a difusão de plastificantes e, por motivos estéricos, o material passa a não mais apresentar essa capacidade superior de reter água e glicerol em relação às amostras não reticuladas. Em outras palavras, possivelmente há uma concentração de AC limite onde o comportamento de absorção de água e glicerol pelo material sejam inferiores a absorção em materiais análogos não reticulados. Essa hipótese será investigada em estudos posteriores. Por hora as interações entre os plastificantes e o AC

aliadas a um limite inferior de densidade de reticulações leva a uma maior higroscopicidade a AC15 em relação à TPC.

Clasen e colaboradores verificaram que em quitosanas de alta massa molar a densidade de entrelaçamentos das cadeias poliméricas não se altera com a presença de glicerol, apenas aumenta as larguras das malhas da rede ao dilatá-las [59]. Além disso, os autores verificaram que os entrelaçamentos da rede de quitosana são estáveis em solução aquosa. Entretanto com o intumescimento e evaporação do excesso de água novos pontos de entrelaçamentos podem ser formados, especialmente no material livre de reticulações (TPC) e, conseqüentemente, maior grau de liberdade molecular, diminuindo a capacidade de absorção de glicerol mesmo em maiores tempos de imersão no plastificante não volátil, como pode-se ver esquematicamente na figura 4.16.

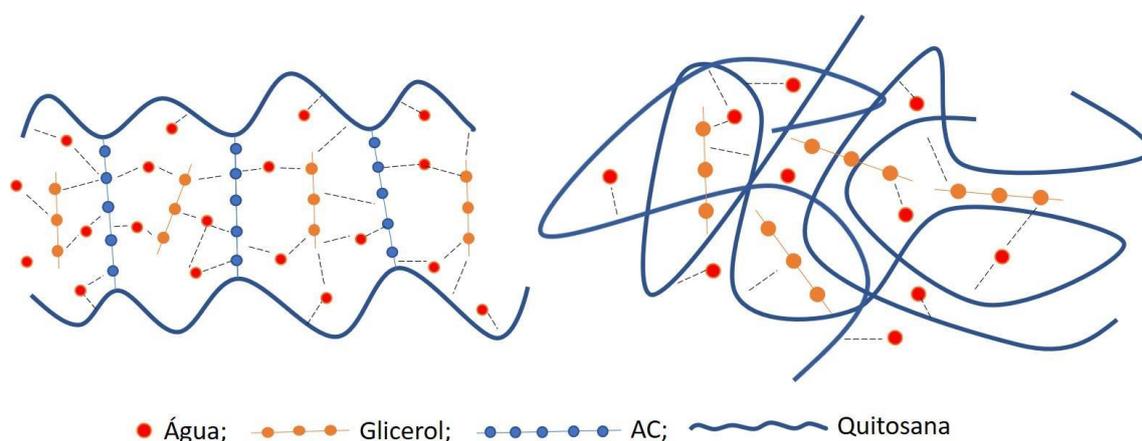


Figura 4.16 – Esquema representativo do (a) inchamento da quitosana reticulada com AC e aprisionamento de moléculas de água e glicerol interagindo fisicamente com a quitosana e o AC e (b) inchamento quitosana termoplástica em maiores dimensões e menor capacidade de absorção de água e glicerol na ausência da interação com AC e sem os pontos de aprisionamento molecular entre os pontos de reticulação.

Quanto ao teor de água percebe-se que há uma influência direta desta variável com o teor de glicerol. Para um mesmo tipo de material quanto maior o teor de glicerol maior a quantidade de água dessa amostra no equilíbrio (após estabilização em UR controlada) resultando em materiais com alta concentração

total de plastificantes (água + glicerol). Estes resultados eram esperados devido à alta hidrofiliabilidade do glicerol e resultaram em consequências na morfologia e nas propriedades mecânicas dos materiais como será visto nas próximas seções.

4.2.2 Morfologia

As imagens da superfície de fratura de AC15 após o banho em glicerol por tempos diferentes indicam que o teor de plastificantes implicam em alterações morfológicas importantes (figuras 4.17 e 4.18). Por questões de restrições no tempo de agendamento para análise no MEV durante o período pandêmico apenas a imagem de TPC com tempo de imersão em glicerol de 2 min foi analisada. Este material foi escolhido pois é o que apresenta os teores de plastificantes mais próximos ao do TPC original. Apesar do elevado nível de absorção de água que as amostras rapidamente apresentam em solução PBS, após a etapa de neutralização em PBS, secagem em condições ambiente e tempo de estabilização em UR controlada (50%) todas as amostras revelaram uma morfologia compatível com a morfologia de uma quitosana semicristalina, que consiste numa morfologia em camadas (regiões cristalinas) e regiões lisas (maior conteúdo amorfo) [1,27], como discutido anteriormente.

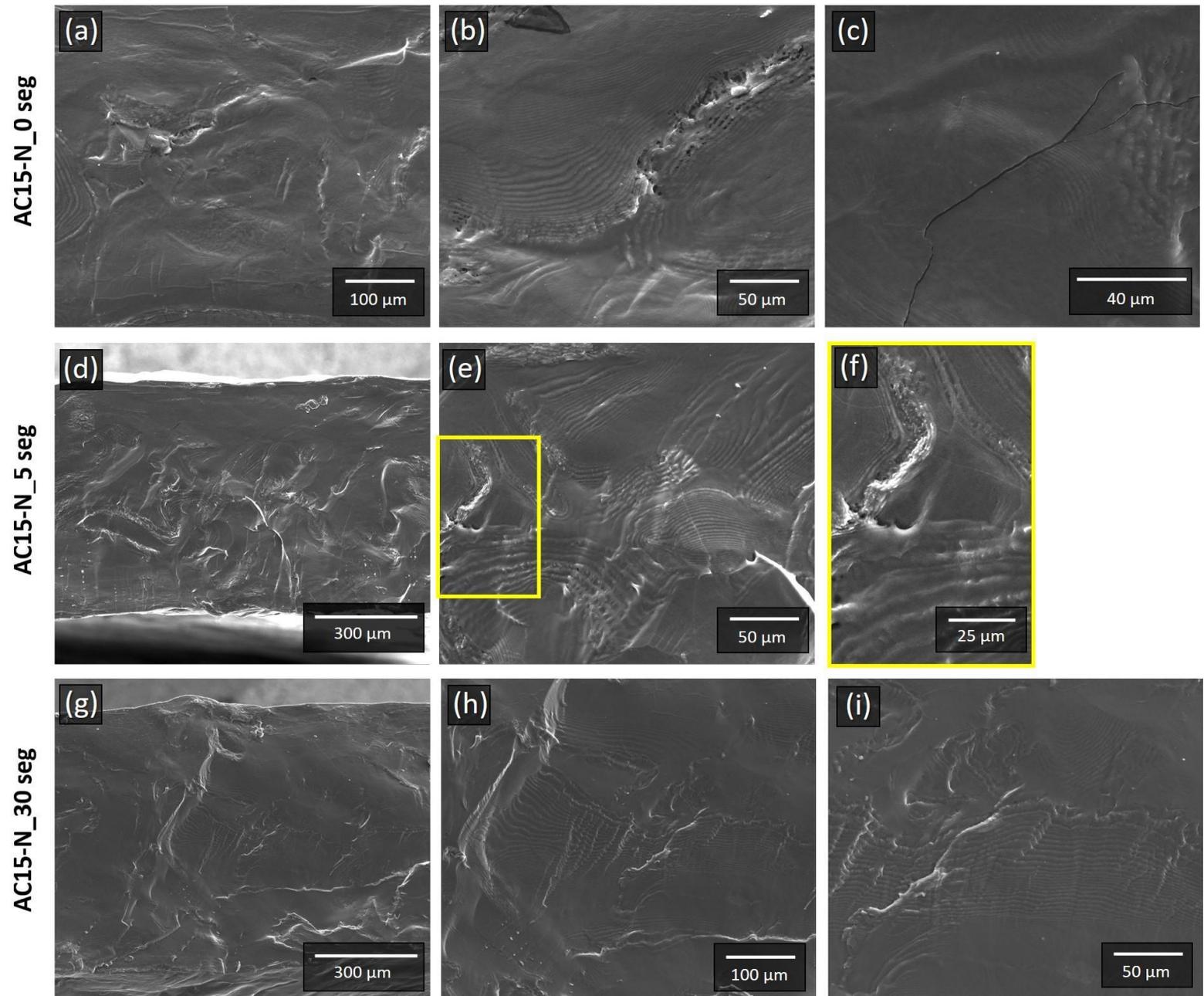


Figura 4.17 – Imagens de MEV de AC15 imerso em glicerol por (a – c) 0 seg exibindo cavidades entre as camadas e trinca; (d – f) 5 seg exibindo quantidade reduzida de cavidades entre as camadas e; (g – i) 30 seg sem evidências de falhas morfológicas.

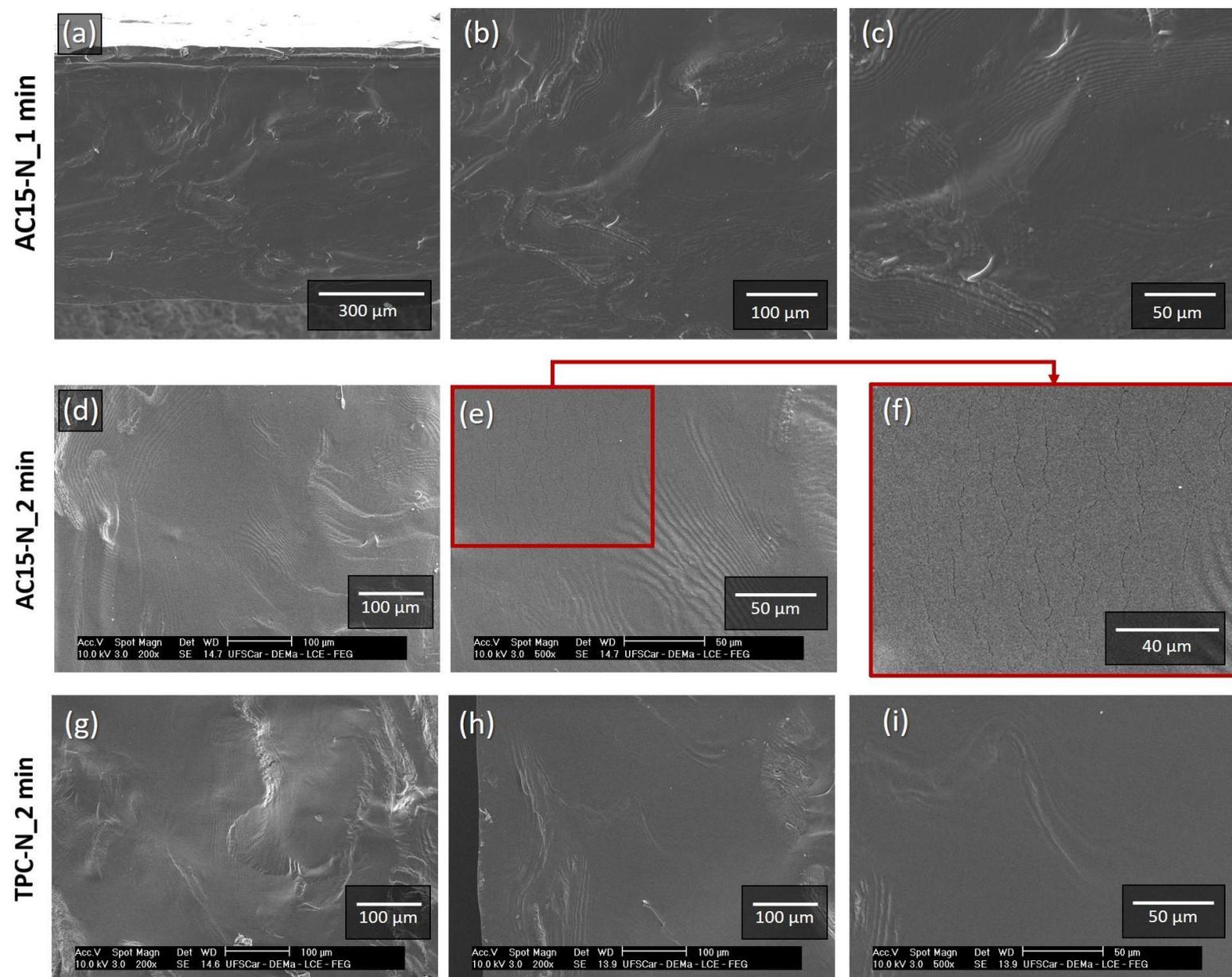


Figura 4.18 – Imagens de MEV de AC15 imerso em glicerol por (a – c) 1 min sem evidências de falhas morfológicas; (d – f) 2 min exibindo descontinuidades na fase amorfa do material e; (g – i) TPC imerso em glicerol por 2 min sem evidências de falhas morfológicas.

Para AC15 neutralizado os tempos 0 e 5 seg de imersão em glicerol (fig. 4.17 a-f) resultou em morfologias com descontinuidades (na forma de cavidades) localizadas entre as camadas de microfibras de quitosana. Esses espaços são normalmente preenchidos por material amorfo garantindo a continuidade da amostra resultando numa morfologia coesa, como pode ser visto claramente na

figura 4.17 i e em diversas referências na literatura [1,27,56,113]. Além das cavidades entre as camadas as imagens da amostra sem recuperação de glicerol (fig. 4.17 a-c) evidencia a ocorrência de fissuras já observadas em quitosanas mecanicamente processadas devido à alta fragilidade intrínseca da quitosana [54]. Essas fissuras podem ter sido formadas durante a evaporação do excesso de água pelo efeito de contração do material na ausência de glicerol.

Apesar do baixo tempo de imersão em glicerol (5 seg) o segundo grupo de imagens (fig. 4.17 d-f) evidenciou que a presença de aproximadamente 15% de glicerol foi suficiente para gerar uma morfologia com integridade muito superior àquela sem a presença de glicerol com ocorrência reduzida de cavidades. É relatado que a presença de glicerol em amostras de quitosana termomecanicamente processadas auxilia na formação de uma morfologia coesa e está associado a uma morfologia com menor densidade de estruturas em camadas [6,38]. Isso ocorre porque o glicerol como plastificante com diâmetro hidrodinâmico muito maior que o diâmetro da água (cerca de 0,31 nm) é capaz de promover um maior espaçamento entre as cadeias de quitosana [1] favorecendo o “deslizamento” intercadeias de forma a uniformizar o volume interno do material minimizando as cavidades pelo preenchimento de material amorfo entre as camadas de fibras de quitosana. A tendência de diminuição das cavidades com o aumento do teor de glicerol é observada nos materiais que passaram por maiores tempos de imersão em glicerol (30 e 60 seg que geraram amostras com 25,20 e 31,86 % de glicerol, respectivamente). Nessas amostras a morfologia visualizada (fig 4.17 g-i e 4.18 a-c) é mais suave (lisa), à medida que o teor de glicerol aumenta, e sem evidências de cavidades.

Todavia a amostra AC15 que foi imersa em glicerol por 2 minutos e, conseqüentemente absorveu um elevado teor de glicerol (48,50% de glicerol) e também apresentou um maior teor de água no equilíbrio (21,07% de água após a estabilização) resultando num total de plastificantes muito elevado; apresentando descontinuidades na fase amorfa do material. Este alto teor de plastificantes ocasionou uma inevitável separação de fases com fases ricas em glicerol que pôde ser verificada nas figuras 4.18 e-f na forma de finas microfissuras. Ou seja, existe um intervalo de composição onde o teor de glicerol

pode favorecer a morfologia das amostras de quitosana reticuladas processadas termomecanicamente. Para AC15 verificou-se que os teores entre 25 e 31% de glicerol encontra-se neste intervalo.

A morfologia da amostra TPC imersa em glicerol por 2 minutos apresentou-se contínua e lisa com poucas evidências de cavidades entre as camadas fibrosas e sem evidências de microfissuras por separação de fases. A menor capacidade de absorção de glicerol de TPC leva a necessidade de maiores tempos de imersão em glicerol para se alcançar teores de glicerol que a amostra AC15 alcança em menor tempo de imersão. Este fato constitui-se uma vantagem do material contendo AC principalmente considerando-se uma linha de produção para estes materiais.

4.2.3 Propriedades mecânicas

Devido às restrições impostas pela pandemia do SARS-COV-2, a impossibilidade de obter imagens de MEV de todas as amostras de TPC neutralizadas com diferentes teores de glicerol impossibilitou uma análise morfológica sobre os tempos de imersão em glicerol inferiores a 2 min. Dessa forma a determinação das propriedades mecânicas para as demais composições de TPC não poderiam ser relacionadas às suas respectivas morfologias e as análises seriam incompletas. Considerando-se que as amostras TPC tem função principal de servir de parâmetro para as propriedades das amostras AC15, nesta etapa da pesquisa focou-se na avaliação das propriedades mecânicas apenas das amostras AC15 neutralizadas com diferentes teores de plastificantes com referência à amostra AC15 como obtida originalmente (não neutralizadas).

As propriedades mecânicas de AC15 após a neutralização em solução tampão PBS e recuperação do glicerol por 5, 30, 60 e 120 seg de imersão em glicerol foram obtidas e relacionadas ao teor de plastificantes e respectivas morfologias. As curvas representativas para cada condição são apresentadas na figura 4.19. Observa-se que a curva do material com o menor teor de plastificante apresenta alterações em relação à curva padrão do material original (AC15) o qual apresenta perfil semelhante ao de um polímero termoplástico e não mais elastomérico como no caso da curva de AC15. Um notável aumento do módulo

de elasticidade observável como a inclinação inicial das curvas na figura 4.19 é verificado. Este aumento é compatível com o aspecto rígido do material ao ser manipulado. Outra diferença notável é o aparecimento de um ponto de escoamento definido e um limite de resistência à tração superior ao limite de escoamento. Estas características indicam que apesar de rígido o material apresenta tenacidade podendo ter perfil de comportamento mecânico semelhante ao de um termoplástico como o policarbonato, por exemplo [53]. O alto módulo e elevada tensão na ruptura é atribuído às fortes interações intermoleculares entre as cadeias de quitosana [27,51] quando o teor de plastificante é baixo. Possivelmente as falhas verificadas na morfologia do material nesta formulação impediu que o material apresentasse maiores limite de resistência à tração.

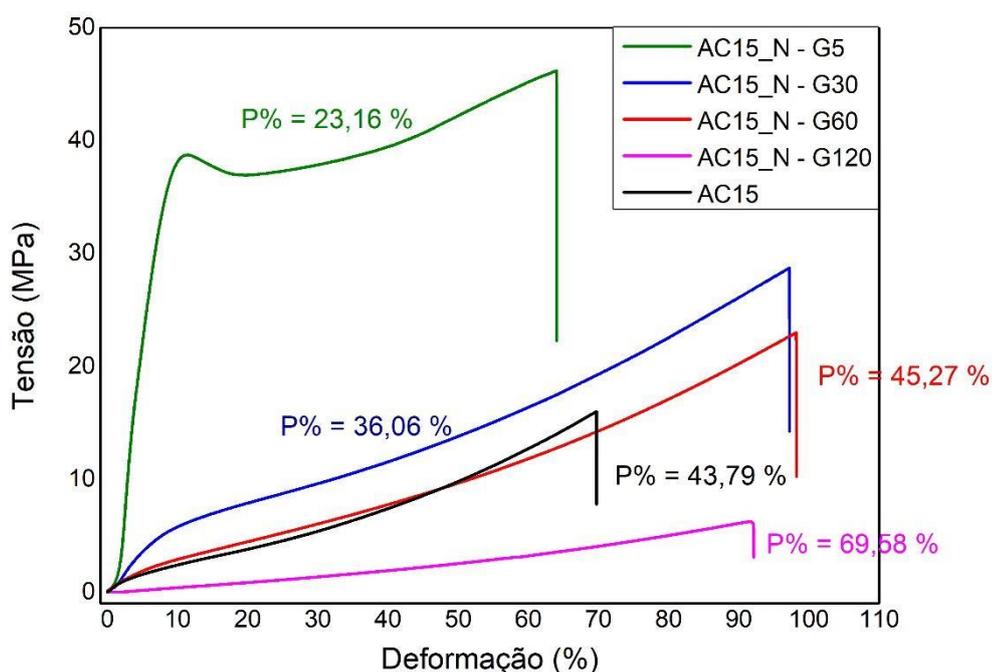


Figura 4.19 – Curvas representativas dos materiais neutralizados em PBS após imersão em glicerol por tempos diferentes e estabilização em UR = 50%. Os percentuais P% indicam o teor total de plastificantes para cada condição de imersão em glicerol.

Quando o teor de plastificante aumenta em consequência de maiores tempos de imersão em glicerol, o perfil do comportamento mecânico volta a apresentar similaridades com o perfil da curva do material original (AC15 – curva preta). Além disso, à medida que o teor de plastificante aumenta o módulo e a resistência a tração na ruptura diminui. Este comportamento é esperado uma vez que os plastificantes interagem com as cadeias do biopolímero interrompendo as fortes interações intermoleculares intrínsecas da quitosana permitindo maior escoamento entre as cadeias e maior mobilidade molecular localizadas em pontos onde as cadeias estão livres de reticulação química. Com relação à deformabilidade, esta cresce quando o teor de plastificante atinge valores entre 36 e 45%. Quando há um excesso de plastificantes (~69%) este excedente está associado às pequenas microfissuras observadas por MEV (Figura 4.18 e e f) ocasionadas pela separação de fases com fases ricas em glicerol e, conseqüentemente à menor resistência à tração. Clansen e colaboradores também verificaram que as propriedades mecânicas de membranas de quitosana não reticulada processadas por *casting* também diminuem com o aumento do teor de glicerol, com exceção da elongação à ruptura que aumenta com o aumento do teor de glicerol [119]. Eles afirmam que o módulo de Young como uma medida para a rigidez é um critério chave para a aplicabilidade de uma membrana e indicam que um módulo acima de 755 MPa tornam os materiais inviáveis para uma aplicabilidade desenvolva. Além disso os autores também indicam o limite inferior de 500 KPa para aplicabilidade destes materiais na pele humana. Uma deformabilidade alta também é requerida uma vez que fica possível controlar a deformação com rapidez suficiente antes da superação do nível de tensão de ruptura, para evitar o rompimento do material no limite final de deformabilidade [119]. Segundo os limites empíricos de Clasen todos os materiais AC15 neutralizados com glicerol recuperado obtidos nesta pesquisa se encontram dentro do limite de aplicabilidade, entretanto o material com teor de plastificantes de 23,16 % é bastante rígido para uma aplicabilidade real ($E = 626,3 \pm 87,8$ MPa).

A tabela 4.3 apresenta os valores do módulo de elasticidade, resistência à tração na ruptura e elongação na ruptura de AC15 neutralizados com diferentes

teores de glicerol. Dentre os materiais obtidos aqueles com teor de plastificantes em 45% apresentam módulos de elasticidade, resistência mecânica e ductilidade mais próximos do material original superando-o em duas das propriedades mecânicas avaliadas, a saber, a resistência à tração e ductilidade. Estas propriedades superiores após a neutralização e replastificação podem estar associadas a possíveis interações físicas entre os grupos fosfatos da solução PBS e será avaliado em trabalhos futuros.

Tabela 4.3 – Valores do módulo de elasticidade, resistência à tração na ruptura e alongação na ruptura de AC15 neutralizados com diferentes teores de glicerol.

Material	Teor de plastificantes (%)	Morfologia contínua	Módulo de elasticidade (MPa)	Resistência à tração na ruptura (MPa)	Elongação na ruptura (%)
AC15	43,79	SIM	53,7 ± 2,6	17,0 ± 2,0	68,3 ± 6,5
AC15_N-G5	23,16	NÃO	626,3 ± 87,8	41,5 ± 4,3	42,2 ± 0,2
AC15_N-G30	36,06	SIM	76,5 ± 17,6	27,7 ± 0,7	95,1 ± 4,5
AC15_N-G60	45,27	SIM	41,7 ± 9,6	20,6 ± 2,1	95,3 ± 12,1
AC15_N-G120	69,58	NÃO	4,2 ± 0,3	5,9 ± 0,4	91,1 ± 2,4

Outro possível motivo pelo qual o material neutralizado com 45,27 % de plastificantes ter apresentado maior resistência à tração em relação ao material original pode estar relacionado a um maior número de entrelaçamentos das cadeias na conformação molecular de equilíbrio como efeito do inchamento excessivo durante a neutralização em PBS. O menor valor no módulo de

elasticidade e maior alongação na ruptura está coerente com o teor ligeiramente maior de plastificantes nesta amostra em relação ao material de referência.

Quanto à aplicabilidade como coberturas de feridas, o biomaterial deve resistir às deformações exercida pela pele, ser resistente e ter fácil manuseio [41]. É relatado que em testes de tração o módulo elástico da pele pode variar entre 4,6 e 20 MPa [120], a tensão de ruptura varia entre 2,5 a 16 MPa [89] e alongação na ruptura de aproximadamente 70%, ressaltando-se que esses valores são dependentes da idade, etnia, lesões anteriores e fatores genéticos [121]. A partir desses valores é possível se afirmar que os materiais com teores de plastificantes variando entre 36 e 69% apresentaram-se flexíveis com resistência ao manuseio e propriedades mecânicas adequadas para utilização em tecidos moles como a pele atuando como coberturas de feridas cutâneas.

4.2.4 Degradação *in vitro*

A quitosana é prontamente degradada por enzimas, particularmente a lisozima, através da clivagem das ligações glicosídicas e está naturalmente presente em várias partes do corpo humano e tecidos, inclusive a pele [6,122]. Um material de cobertura de feridas ideal deve apresentar degradação gradual e reabsorção da matriz pelo hospedeiro [123]. A degradação enzimática das membranas desenvolvidas foi investigada usando lisozima a principal responsável pela hidrólise enzimática *in vivo* em materiais à base de quitosana [123]. Essa enzima está presente no soro humano em concentrações na faixa de 7 a 13 mg / L [123]. Uma diminuição na degradação *in vitro*, portanto, é bem vinda em materiais projetados para utilização em tempos prolongados. O conhecimento sobre a degradação de um material pela lisozima, portanto, é de relevante importância para a aplicações biomédicas especialmente no gerenciamento de feridas.

Após 7 dias em condições fisiológicas de temperatura e pH a amostra TPC apresentou uma degradação de $16,97 \pm 0,48\%$ em relação à sua massa seca enquanto AC15 apresentou um valor ligeiramente inferior de $14,46 \pm 1,14\%$ de degradação *in vitro*. Em hidrogéis de quitosana a perda de 15% em massa foi alcançada com apenas 10h de ensaio em condições fisiológicas e concentração

de enzima de 4 mg / mL e sua completa degradação ocorreu entre 54 e 110 h [6]. A baixa degradabilidade da quitosana processada termomecanicamente é atribuída à alta densidade de quitosana promovida pela termoprensagem, e pela reticulação química no caso de AC15. Apesar da maior capacidade de intumescimento, e conseqüentemente, maior quantidade de enzimas na rede intumescida de AC15 a reticulação química manteve a perda de massa inferior à do material livre de reticulações. Em ambos os casos a degradabilidade *in vitro* de AC15 e TPC é considerada muito boa, visto que nenhum polímero sintético foi adicionado à formulação favorecendo o uso dos materiais em tempos prolongados até, pelo menos 7 dias. Visando uma aplicação como cobertura de ferimentos sabe-se que uma cobertura de feridas ideal deve ser de fácil aplicação, remoção indolor e exigindo menos trocas (e, conseqüentemente, menos recursos humanos) [124]. Como o tratamento de feridas crônicas com múltiplas (e frequentemente dolorosas) trocas de coberturas de feridas não são incomuns, algumas coberturas especiais devem preferencialmente ser deixadas no local por vários dias e o material com baixa degradabilidade pode ser um candidato viável para aplicações prolongadas.

4.2.5 Capacidade de absorção de água

A capacidade de reter água dos biomateriais é outra característica essencial dos materiais poliméricos para aplicação na cicatrização de feridas. A capacidade de reter e absorver água é importante para a absorção de fluidos corporais, metabólitos e exsudatos [125].

A curva de absorção de água de TPC e AC15 apresentaram pequenas alterações após a neutralização em meio PBS (Figura 4.20). No material original o ponto de inflexão da curva ocorre em 30 min ao passo que nos materiais neutralizados esta mudança no comportamento de absorção ocorre após 90 min do início do ensaio. Além disso ambos os materiais neutralizados parecem absorver água numa taxa semelhante entre 300 e 1440 min. Além disso, o TPC neutralizado em PBS apresentou um leve aumento na absorção de água em relação ao material original (curva tracejada preta) enquanto que o AC15 neutralizado no mesmo meio apresentou uma diminuição na absorção de água

em relação ao AC15 original. Essa alteração está relacionada com a entrada dos íons fosfatos do tampão PBS nos materiais. Ao passo que a presença dos íons fosfatos adsorvidos no TPC auxilia no aumento da higroscopicidade do material, no AC15 a presença dos íons fosfatos interferem na forte interação entre o ácido cítrico e a água, uma vez que se trata de um íon com carga negativa, os fosfatos interagem mais intensamente com o ácido cítrico enxertado do que a água. Apesar da diminuição da higroscopicidade do AC15 este material ainda apresenta uma discreta vantagem na capacidade de absorção de água pela capacidade de aprisionamento de água entre os pontos de reticulação garantindo a vantagem da quitosana processada com AC em aplicações que requeiram uma maior higroscopicidade. Estes resultados continuam indicando que, após a neutralização, o AC15 pode ser útil em aplicações de cicatrização de feridas onde o biomaterial deve ser capaz de absorver grandes quantidades de exsudatos.

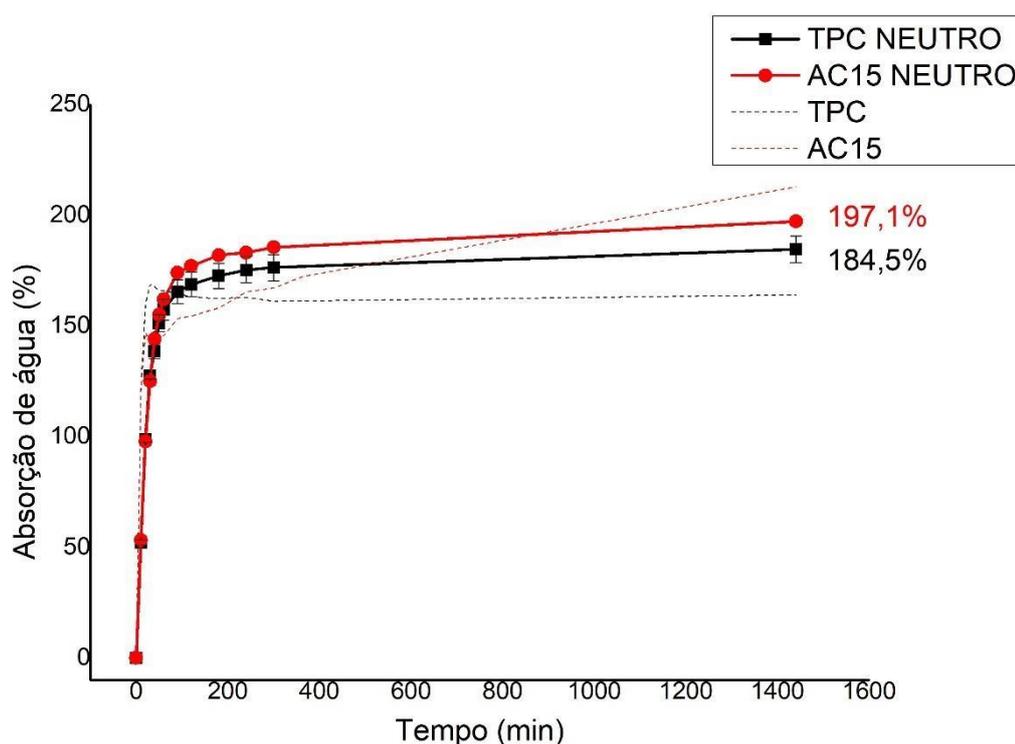


Figura 4.20 – Curvas de absorção de água em solução de PBS a 37° C das placas de quitosana TPC e AC15 neutralizadas.

4.2.6 Permeação ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água é definida como a facilidade da umidade em penetrar e passar pela porção hidrofílica do material [126]. Uma vez que uma das principais funções de uma cobertura de feridas é controlar a taxa de transmissão de vapor de água (TVA) da pele ferida [127], o conhecimento da permeabilidade ao vapor de água de um biomaterial projetado para uso como cobertura de feridas é de relevante importância. Quando uma injúria ocorre no tecido cutâneo a função de controlar os fluidos corpóreos é alterada resultando numa alta perda desses fluidos por evaporação. A velocidade da cicatrização e a qualidade do tecido final são otimizadas por um microambiente úmido que é o ambiente propício para uma proliferação adequada de fibroblastos que auxiliam o processo normal de cicatrização [128]. Por outro lado, um biomaterial com uma baixa TVA pode gerar a oclusão da ferida com possibilidade de maceração do tecido lesionado, acarretando em demora na cicatrização e desconforto para o paciente. Uma baixa TVA associada a uma alta absorção hídrica pode levar à elevação da cobertura nas extremidades resultando em exposição das bordas da ferida e conseqüentemente abertura a entrada de microrganismos e possíveis infecções secundárias [129]. Dessa forma, a permanência da umidade no canal da ferida e seu controle são essenciais, pois influenciam diretamente na cicatrização. Por isso, um cobertura ideal seria aquela cujo leito da ferida permaneça úmido sem retenção completa do exsudato [130,131]. A capacidade de transportar vapor de água é, portanto, uma função importante da cobertura de feridas e uma avaliação pré-clínica valiosa é a medição da taxa de transmissão de vapor de água (WVTR) desse biomaterial [131].

O ensaio de permeação ao vapor de água forneceu os gráficos da perda de massa de água em função do tempo através de cada placa de TPC e AC15 avaliada. A partir destes gráficos as taxas da perda de massa de água foram estimadas e a PVA para cada material foi obtida (Figura 4.21 e Tabela 4.4). Os dados de perda de massa a cada medida bem como o resumo dos dados utilizados para determinação dos valores de PVA e TVA constam na Tabela E1 e no Quadro E1 (Apêndice E). Os valores de PVA para TPC e AC15 foram de $8,78 \times 10^{-6}$ e $8,22 \times 10^{-6}$ g / m x h x Pa, respectivamente. Valores mais elevados

foram obtidos para filmes de quitosana feitos por evaporação do solvente onde o valor de $302,0 \times 10^{-6} \text{ g / m} \times \text{h} \times \text{Pa}$ foi obtido no ensaio de permeação baseado no método da água [126]. Uma vez que uma estrutura de rede mais densa diminui a PVA [119], a alta PVA dos materiais obtidos por casting deve-se principalmente à sua estrutura macro e microporosa. Portanto os valores aparentemente baixos obtidos para TPC e AC15 se justificam pela alta densidade dos materiais desenvolvidos nesta pesquisa. Uma cobertura de feridas com alta permeação hídrica pode resultar na desidratação da região lesionada e deve ser utilizada apenas em feridas altamente exsudativas. Portanto a escolha de uma cobertura deve estar relacionada ao tipo de injúria e à quantidade de fluido que cada ferimento libera.

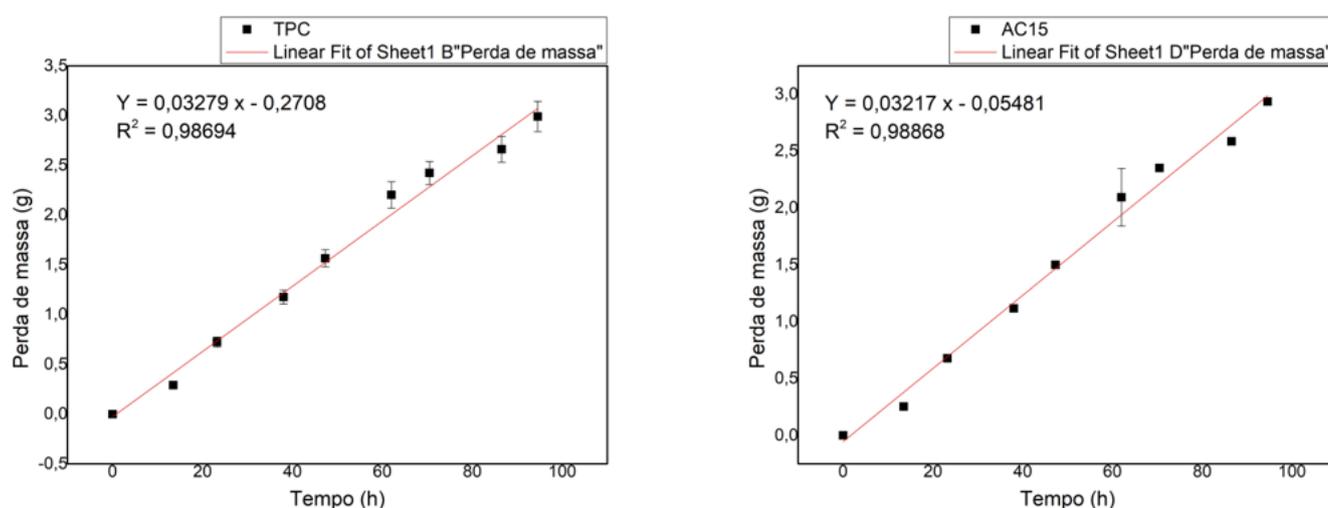


Figura 4.21 – Gráfico da perda de massa de água através de TPC e AC15 ao longo do tempo à temperatura e umidade relativa média de 18,06 °C e 59,3 %, respectivamente.

Tabela 4.4 – Valores de Perda de massa total ao longo do ensaio, PVA e TVA estimada para placas com 700 e 200 μm de espessuras para TPC e AC15.

Amostra	Perda de massa (g / 94,57 h)	PVA (g / m x h x Pa)	TVA - 700 μm (g / m ² x dia)	TVA (200 μm (g / m ² x dia)
TPC	2,99 \pm 0,15	8,78 x 10 ⁻⁶	252,82	884,84
AC15	2,94 \pm 0,01	8,22 x 10 ⁻⁶	236,70	828,44

Como a PVA é uma propriedade intrínseca ao material enquanto que a TVA é uma propriedade extrínseca dependente da espessura do material e o desempenho em termos das propriedades de barreira de uma cobertura de feridas é geralmente avaliada a partir da TVA [128–130,132,133], a transmissão do vapor de água através das placas TPC e AC15 com 700 μm (espessura aproximada dos materiais obtidos) foram estimadas a partir da equação 3.11 resultando numa TVA de 252,82 e 236,70 g / m² x dia para TPC e AC15, respectivamente. Considerando-se que grande parte dos dispositivos utilizados como coberturas tem espessura inferior à dos materiais obtidos (aproximadamente 700 μm) nesta pesquisa estimou-se os valores da transmissão de vapor de água de 884,84 e 828,44 g / m² x dia para placas de TPC e AC15 ambas com espessuras de 200 μm , respectivamente. Membranas assimétricas de quitosana / glucomanana de konjac projetadas para atuar como cobertura de feridas de alto desempenho apresentaram transmissão de vapor de água de 261,8 g / m² x dia [132]. Este valor se assemelha aos valores estimados nesta pesquisa para as placas de 700 μm de espessura estando de acordo com a faixa de valores de coberturas comerciais (76 – 9360 g / m² x dia) [134].

Apesar dos valores de PVA e TVA serem dados importantes para um biomaterial com potencial aplicação como cobertura de feridas, essas propriedades devem ser avaliadas em conjunto com a capacidade de absorção hídrica do material. A capacidade de drenagem pode ser considerada como a diferença entre a absorção de água e a transmissão de vapor de água num

determinado Δt . Wong *apud* Queen e colaboradores sugere que um nível de 50% entre a capacidade de absorção hídrica (ou capacidade de retenção) de uma cobertura de feridas e a taxa de transmissão de água é suficiente para fornecer uma umidade adequada e evitar a desidratação da ferida [131]. Considerando-se a densidade obtida para TPC e AC15 (Tabela 4.1), estima-se uma massa de 253,80 e 264,40 g para placas (1 m X 1 m) com 200 μm de espessura de TPC e AC15, respectivamente. De acordo com a capacidade de absorção de água em solução PBS (Figura 4.20) uma placa (1 m X 1 m) de 200 μm de espessura de TPC e AC15 são capazes de absorver aproximadamente 468,26 e 521,13 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$. Esses valores fornecem uma retenção hídrica negativa (-416,58 e -307,31 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$) o que significa uma alta capacidade de drenagem de fluidos onde os materiais e a ferida estariam desidratados. Assim para se obter uma capacidade de retenção de 50% como proposto por Wong *apud* Queen e colaboradores o material é hábil para aplicação num ferimento com taxa de exsudação ou perda de exsudatos de 1118,97 e 1088,97 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$ para TPC e AC15, respectivamente. Este cálculo foi feito a partir da metade da capacidade de absorção de água em 24 h + TVA do material para um balanço de retenção hídrica de 50% da capacidade de absorção de água de cada material. Avalia-se, portanto, que em termos de desempenho em relação às propriedades de permeação e transmissão de vapor de água ambos os materiais TPC e AC15 apresentam atuações semelhantes.

Para as placas de TPC e AC15 (1 m X 1m) com 700 μm de espessura a massa estimada é de 888,30 e 925,40 g, respectivamente. Esses materiais são capazes de absorver respectivamente 1638,91 e 1823,96 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$ de forma que a retenção hídrica para placas com 700 μm de espessura é positiva de 1386,09 e 1587,26 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$, para TPC e AC15, respectivamente. Esses valores correspondem a uma capacidade de retenção de fluidos de 84,57 e 87,02 % e, portanto, uma drenagem de apenas 15,43 e 12,98 % para TPC e AC15 respectivamente. Para se obter uma retenção hídrica de 50% uma placa de 700 μm de espessura deve ser aplicada em ferimentos com taxa de exsudação de 1072,28 e 1148,68 g $\text{H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$ para TPC e AC15, respectivamente. Dessa forma, percebe-se que a menor TVA encontrada para

os materiais espessos é compensada pela maior capacidade de absorção hídrica, gerando materiais com capacidade de aplicação semelhantes.

Para um entendimento prático desses valores de TVA a tabela 4.5 exhibe valores de perda de água em peles com diferentes níveis de injúrias provocadas por queimaduras.

Tabela 4.5 – Perda de água em pele com diferentes injúrias [135].

Condições do tecido	Perda de água (g / m ² x dia)	Nível de exsudação	Referência
Pele íntegra	204,0 ± 12,00	Baixo	[50]
Queimadura de 1°	278,4 ± 26,4	Baixo	[57]
Queimadura de segundo grau	4274,4 ± 132,0	Alto	[57]
Queimadura de terceiro grau	3436,8 ± 108,0	Alto	[57]
Tecido de granulação	5138,4 ± 201,6	Alto	[57]

Considerando-se que a TVA da pele saudável está em torno de 204 g H₂O / m² x dia [128] as placas de TPC e AC15 com 700 e 200 µm de espessura desenvolvidas nesta tese devem ser aplicadas em ferimentos com produção moderada de exsudatos. Se a aplicabilidade das placas de quitosanas fossem avaliadas apenas em função da TVA os materiais espessos deveriam ser aplicados apenas em ferimentos com baixa produção de exsudatos enquanto que os materiais mais finos poderiam ser aplicados em ferimentos de baixa a moderada produção de exsudatos, entretanto o balanço entre a capacidade de absorção hídrica e a TVA são fundamentais, como explicado anteriormente.

Clasen e colaboradores verificaram a influência do teor de glicerol em filmes de quitosana sobre a permeabilidade ao vapor de água. Eles concluíram que o aumento do teor de glicerol está relacionado ao aumento do volume livre da cadeia de quitosana e, conseqüentemente, a uma estrutura de rede menos densa e, resultando em valores crescentes de permeabilidade à medida que o teor de glicerol aumenta (figura 4.24) [119]. Ou seja, as taxas de TVA para as placas de quitosana também podem ser maiores e reguladas de acordo com a

concentração de glicerol nos materiais processados termomecanicamente a partir imersão do material em glicerol por tempos determinados após a etapa de neutralização para alcançar o teor de glicerol projetado.

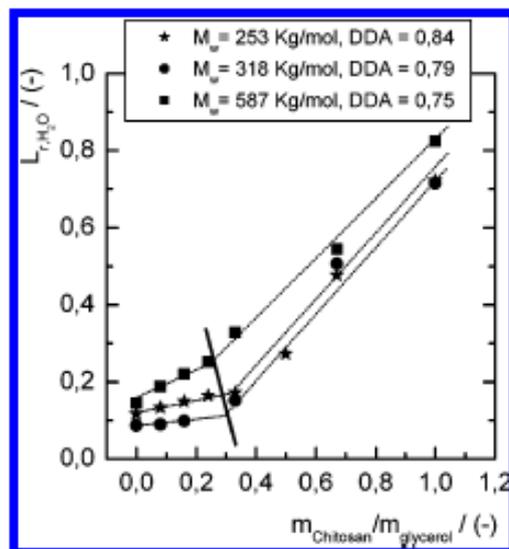


Figura 4.22 - Permeabilidade relativa ao vapor de água L_{r,H_2O} de membranas de diferentes amostras de quitosana e diferentes teores de glicerol [119].

Considerando-se o gráfico obtido por Clansen e colaboradores (figura 4.22) e que as medidas os valores de TVA obtidos nesta pesquisa foram tomadas a partir do material neutralizado (sem glicerol) para se verificar a TVA associada apenas à matriz polimérica sem influência do plastificante, a permeabilidade encontrada para TPC e AC15 pode ser modulada pelo teor do plastificante não volátil tendo seus valores significativamente aumentados quando o teor de glicerol é maior que 30%, de acordo com a figura 4.22 [119]. Sendo assim as placas de quitosana termomecanicamente processadas obtidas nesta tese podem alcançar maiores taxas de transmissão de vapor de água moduladas pelo teor de glicerol. O que torna a metodologia de fabricação, neutralização e recuperação do glicerol desenvolvida nesta tese útil para confecção de um material versátil quanto a suas propriedades de permeação e, portanto, quanto à sua aplicabilidade.

4.2.7 Avaliação da incorporação e liberação do fármaco cloridrato de tetraciclina *in vitro*

Uma cobertura de feridas antimicrobiana ideal manter um longo período de liberação controlada do medicamento para evitar a troca frequente da cobertura e reduzir o risco de exposição excessiva dos pacientes a excessos de agentes antimicrobianos [6]. Dessa forma, o cloridrato de tetraciclina (CT), um antibiótico de amplo espectro, foi usado como um modelo de droga antibacteriana para se avaliar a capacidade de incorporação (ou capacidade de carga) nas placas de quitosana e a sua respectiva liberação *in vitro* das matrizes AC15 e TPC.

A figura 4.23 exibe a curva de calibração das soluções do cloridrato de tetraciclina em solução PBS a 37° C obtida no intervalo entre 0,58 e 10,03 µL / mL e a equação da reta para determinação das concentrações do fármaco em função de sua respectiva absorbância ($R^2 = 0,99934$).

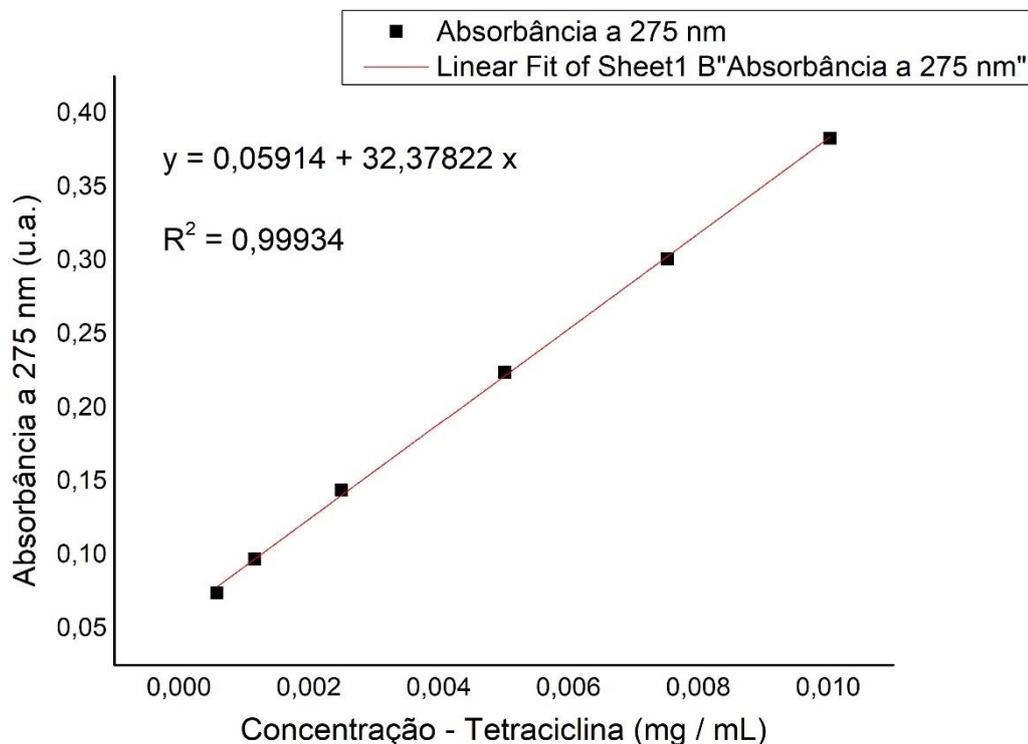


Figura 4.23 – Curva de calibração de soluções de cloridrato de tetraciclina em fluido PBS a 37° C em concentrações variando entre 0,58 e 10,03 µL / mL.

A capacidade de incorporação do CT nas matrizes de TPC e AC15 (figura 4.24) foi obtida a partir da massa liberada do fármaco por miligrama do material da matriz ao longo de 198 h, ou seja, 8,25 dias (figura 4.25). Apesar do perfil de liberação ainda apresentar uma tendência crescente e, conseqüentemente, do material ainda estar liberando o fármaco, a partir de 8 dias do início do monitoramento as medidas espectrofotométricas precisaram ser interrompidas e assumiu-se a massa total de CT adsorvida como a massa total liberada até este momento.

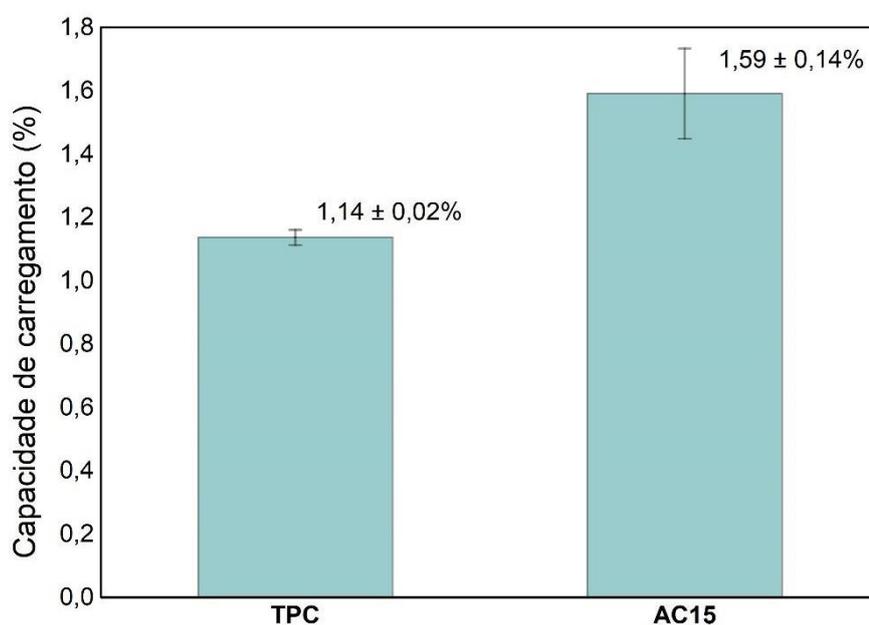


Figura 4.24 – Capacidade de carregamento da tetraciclina dissolvida em PBS (1 mg / mL) nas amostras de TPC e AC15 a 50°C por 3 h.

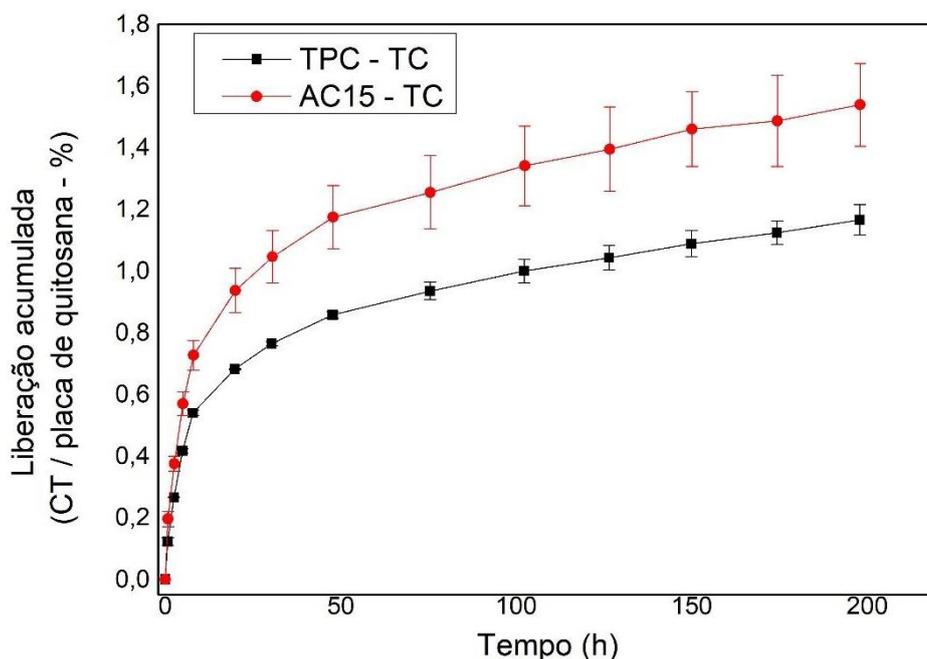


Figura 4.25 – Curva de liberação do cloridrato de tetraciclina por massa de TPC ou AC15 (pH = 7,4) em função do tempo de incubação a 37°C.

A quantidade de CT incorporada às placas de quitosana por massa do material foi maior para as amostras de AC15 do que para as amostras de TPC (figura 4.24). É relatado que a estrutura química de tetraciclina em pH 7,4 se apresenta principalmente na forma de sal interno (*zwitterion*), ou seja, são eletricamente neutras mas possuem cargas opostas [136]. Este fato é particularmente interessante pois o forte caráter hidrofílico da tetraciclina corrobora para uma maior interação do fármaco com AC15 de caráter mais hidrofílico em relação ao TPC, seja através do grupo amina da quitosana com carga parcial negativa (mesmo que em pH 7,4 não estão protonadas, NH_2), seja através do grupo ácido do AC com maior pKa (pKa = 6,40 [58]) que em pH 7,4 ainda apresenta uma parcela desses grupos na forma molecular (protonadas, COOH) com carga parcial positiva.

Hidrogéis de quitosana reticulada com ácido 1,3,5-benzil tricarbóxico (BTC) tiveram adicionados à sua composição o corante hidrofílico (Rodamina B) e o corante hidrofóbico (Oil Red O) como compostos modelos para obtenção do perfil de liberação. A capacidade de incorporação dos corantes modelos atingiu

valores de 0,35 e 1,53% para os corantes hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente [98]. Nesta pesquisa observa-se que AC15 apresentou uma capacidade de incorporação do cloridrato de tetraciclina semelhante a incorporação do corante hidrofílico no hidrogel de quitosana. Mesmo apesar da forma de carregamento por imersão das placas de quitosana e não por adição do fármaco à formulação dos materiais, ambos os materiais TPC e AC15 apresentaram uma capacidade de incorporação do cloridrato de tetraciclina satisfatória pois como TPC e AC15 apresentam uma capacidade de absorção de água limitada em relação aos hidrogéis, os valores alcançados possivelmente se devem às interações moleculares entre os materiais e a tetraciclina, especialmente entre o fármaco e o AC15 contendo AC.

A figura 4.26 apresenta o perfil de liberação da tetraciclina das matrizes de TPC e AC15 ($m_{\text{fármaco liberado}} / m_{\text{fármaco incorporado}}$ em função do tempo), observa-se que ambos os materiais apresentam o mesmo perfil de liberação, ou seja, apresentam uma liberação de CT, em relação a massa total do fármaco incorporado, praticamente idêntica (figura 4.26). Entretanto como AC15 apresenta uma capacidade de incorporação de tetraciclina por mg de quitosana superior a TPC (figura 4.24), a liberação em massa de CT a cada intervalo de tempo é maior que a liberação de TPC (figura 4.25).

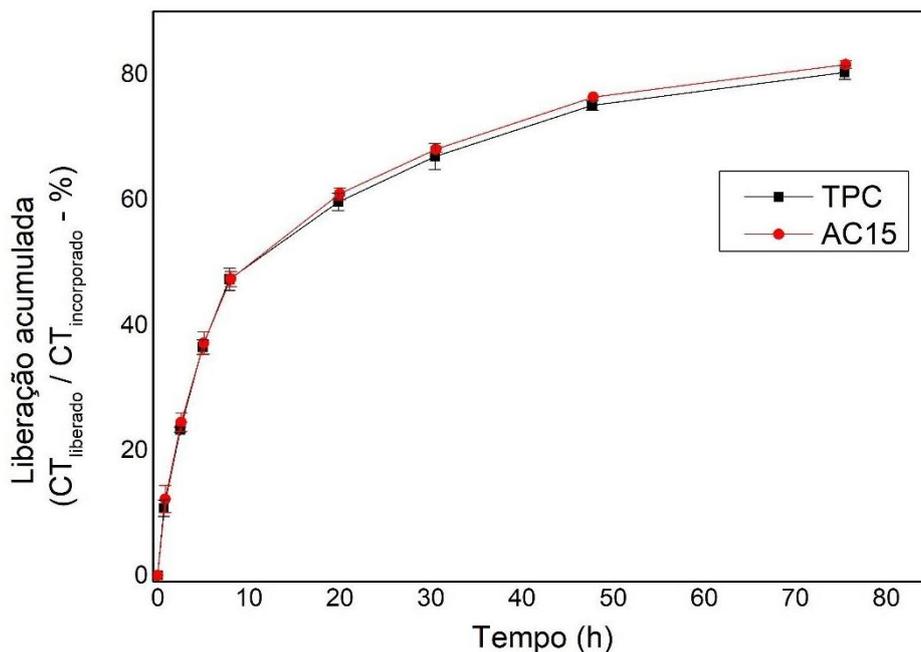


Figura 4.26 – Perfil de liberação do cloridrato de tetraciclina em solução PBS (pH = 7,4) a 37° C nas primeiras 75 h.

Nas figuras 4.25 e 4.26, observa-se uma liberação rápida (ou liberação de explosão) nas primeiras 8 horas de ensaio (efeito *burst* [6,137]) liberando um teor de 47% da tetraciclina incorporada nas respectivas matrizes seguida de uma liberação mais lenta e controlada por mais de 8 dias (figura 4.25). Considerando um uso mais curto (aproximadamente 3 dias) observa-se uma liberação de aproximadamente 80% após 75 h do ensaio *in vitro*. Os materiais obtidos nesta tese apresentam uma liberação controlada por períodos superiores aos hidrogéis à base de quitosana relatados na literatura que atingem uma liberação sustentada por poucos dias/horas [102,123,127,128]. Hidrogéis de carboximetilquitosana e alginato reticulados com genipina, por exemplo, apresentaram uma liberação de aproximadamente 90% de albumina de soro bovino (BSA) durante um período de 300 min (5 h) [95]. Filmes de quitosana contendo nanopartículas lipídicas carregadas com fluconazol apresentou liberação entre 100 e 60% de fluconazol nas primeiras 2 horas de ensaio [97].

Chen e colaboradores relacionaram o aumento do teor de quitosana em filmes de quitosana reticuladas com AC a uma liberação mais lenta ao longo de

24 h [6]. Corroborando com Chen e colaboradores quando o teor de quitosana na formulação de hidrogéis do biopolímero reticulado com BTC aumenta em 5 vezes, a liberação de Rodamina B diminuiu de 75 para 45% em 20 min [98]. Na presente pesquisa, a densidade de AC15 é ligeiramente superior a densidade de TPC (tabela 4.1), assim a maior capacidade de absorção de água pela AC15 favorece a incorporação de maior quantidade do fármaco hidrossolúvel resultando em perfis de liberação ligeiramente superior para o material reticulado (figuras 4.25 e 4.26).

Em suma, apesar da existência de reticulação química na estrutura da quitosana, no caso deste estudo não ter apresentado grande diferença no perfil de liberação (figura 4.26), a presença do AC favoreceu o maior teor de fármaco incorporado à estrutura do material (figura 4.24) uma vez que a tetraciclina é hidrofílica e de caráter iônico apresenta maiores possibilidades de interação com o AC presente na amostra. Em contrapartida a maior capacidade de absorção de água de AC15 também favorece uma maior solubilização do fármaco hidrossolúvel tornando o perfil de liberação praticamente idêntico ao perfil de liberação de TPC (figura 4.26). Dessa forma, entende-se que a maior capacidade de incorporação do CT na matriz de AC15 favorece uma maior entrega mássica do fármaco (figura 4.25) e constitui maior vantagem do material processado com AC para aplicações biomédicas onde a incorporação de um fármaco hidrofílico é requerida como no caso de dispositivos de liberação controlada e cobertura de feridas avançada.

4.2.8 Atividade antimicrobiana

A eficácia antimicrobiana de TPC, AC15 e dos materiais carregados com cloridrato de tetraciclina (CT) foi avaliada qualitativamente por meio do teste de halo de difusão ou halo de inibição. *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 25923, um patógeno Gram-positivo, foi escolhido para este estudo devido à sua presença frequente em feridas cutâneas [123]. A figura 4.27 mostra as imagens da zona de inibição do experimento em duplicata. Não foram observados halos de inibição para TPC e AC15 neutralizadas em pH 7,4 nas duas espessuras testadas (200 e 700 μm). Entretanto ambos TPC quanto AC15 carregados com

cloridrato de tetraciclina (TPC-CT e AC15-CT) apresentaram halos de inibição semelhantes, maiores inclusive que o padrão de antibiótico (gentamicina, disco central).

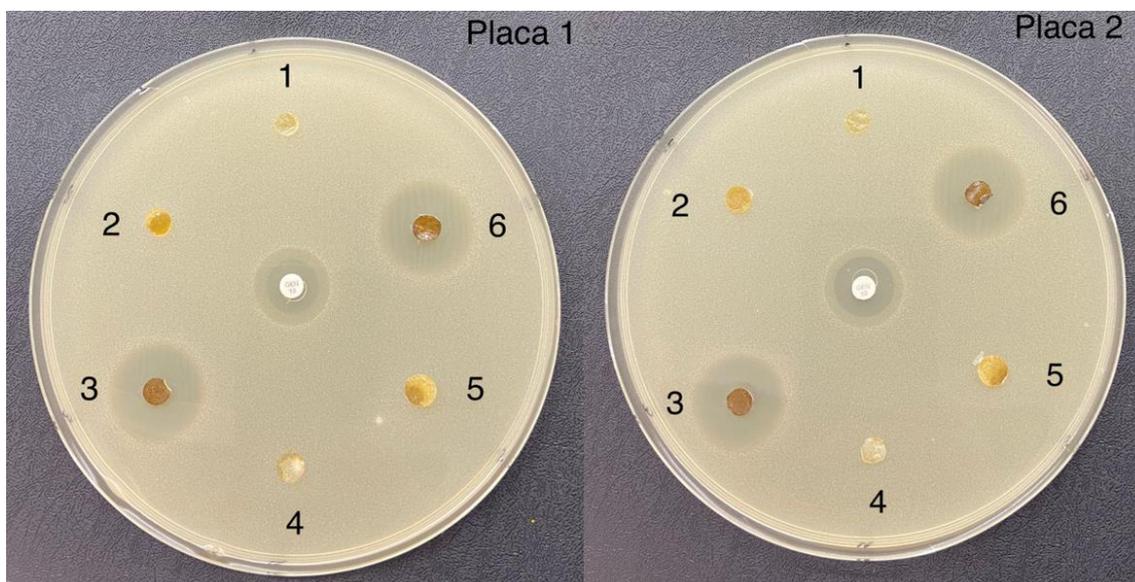


Figura 4.27 – Imagens das zonas de inibição (duplicata) de (1) TPC 200 μm ; (2) TPC 700 μm ; (3) TPC-CT 200 μm ; (4) AC15 200 μm ; (5) AC15 700 μm ; e (6) AC15-CT 200 μm contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

É relatado na literatura que o mecanismo mais aceito para a atividade antimicrobiana da quitosana é a partir dos grupos amina protonados através da mudança na permeabilidade celular devido às interações entre a carga positiva da quitosana e as paredes celulares bacterianas de carga negativa, resultando em quebra da parede celular (*lise celular*) e morte [123], o que não ocorre em $\text{pH} = 7,4$ uma vez que a quitosana não está protonada. Além disso como o material apresenta alta integridade estrutural mesmo quando intumescido, não ocorre difusão das cadeias de quitosana através do meio de cultura entretanto a quitosana no estado sólido apresenta atividade antimicrobiana de contato (*contact killer*) [6], ou seja, o microrganismo é inativado em contato com os materiais à base de quitosana. Entretanto quando os materiais são carregados com CT nas condições estudadas nesta tese, o fármaco é liberado no meio circundante desempenhando um papel inibidor matando os micróbios. Apesar

de AC15 possuir uma maior capacidade de carregamento e liberar maior quantidade de fármaco que TPC no teste qualitativo ambos os materiais carregados com CT apresentaram desempenhos semelhantes sendo ambos agentes eficazes para liberação controlada do cloridrato de tetraciclina, sendo capazes de liberar o fármaco em períodos superiores a 8 dias como verificado no perfil de liberação (figuras 4.25 e 4.26) Os diâmetros médios das zonas de inibição das amostras TPC fino (1), TPC espesso (2), TPC-CT (3), AC15 fino (4), AC15 espesso (5) e AC15-CT (6) foram avaliadas pelo teste de halo de difusão (ou halo de inibição) estão resumidos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Diâmetros da zona de inibição dos materiais carregados com fármaco antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Amostra	Espessura do halo de inibição (mm)
Padrão - Gentamicina	7,2 ± 0,3
TPC-CT	8,9 ± 0,3
AC15-CT	8,7 ± 0,4

Verifica-se que as médias do halo de inibição de AC15-CT foi ligeiramente inferior ao halo de inibição de TPC-CT apesar da maior capacidade de liberação do fármaco de AC15. Possivelmente este resultado se deve a falta do completo contato entre o disco de AC15-CT e o meio de cultura uma vez que estas amostras não estão planas. A parte que não teve contato com o meio de cultura deixou de liberar tetraciclina e possivelmente geraria um halo de inibição maior que o apresentado para TPC-CT, caso houvesse o completo contato do material no meio de cultura. Este resultado qualitativo, portanto, não invalida os testes anteriores, mas reforça o potencial de ambos os materiais serem utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos.

5 CONCLUSÕES

Placas de quitosana reticulada foram eficientemente produzidas através do processamento termomecânico na presença de AC. Após a etapa de neutralização e recuperação do plastificante os materiais apresentaram pH fisiológico, estabilidade hidrolítica sem diminuição de suas propriedades mecânicas, pelo contrário, o material reticulado com teor semelhante de plastificante apresentou maiores flexibilidade e resistência mecânica após a etapa de neutralização e recuperação do glicerol. Além disso o desempenho *in vitro* evidenciou que o material final tem potencial para aplicação em feridas moderadamente exsudativas e liberação controlada de fármaco por 8 dias.

A hipótese de que o AC poderia exercer dupla função atuando como agente desestruturante e agente reticulante foi comprovada ao desempenhar cada função em etapas específicas durante o processamento termomecânico. Durante a etapa do cisalhamento no misturador interno o AC atuou como agente desestruturante uma vez que o material após esta etapa apresentou bandas de amina protonada e bandas de íons carboxilatos no espectro FTIR. Na etapa de termoprensagem a 130 °C o AC atuou como agente de reticulação química da quitosana que pode ser comprovado pela diminuição da banda relativa ao grupo amina associada ao aumento da banda relativa ao grupo amida indicando o consumo dos grupos amina e a formação de grupos amidas entre o AC e a quitosana. A ausência de bandas relativas a grupos ácido carboxílico no espectro FTIR dos materiais reticulados indica que o AC atuou eficazmente como agente reticulante da quitosana após a etapa de termoprensagem. Além disso a diminuição da cristalinidade relativa dos materiais no pós processamento corroboram que o AC é um excelente agente desestruturante para a quitosana durante o processamento termomecânico

A análise morfológica das fraturas dúcteis obtidas após o tratamento criogênico de curto tempo (10 minutos) evidenciou imagens inéditas que revelaram a existência de estruturas fibrosas em diferentes níveis hierárquicos tal como relatado na literatura recente para estruturas geradas pelo processamento termomecânico da quitosana termoplástica. Além disso nas amostras AC15 (15 pcr de AC) foram reveladas estruturas fibrosas com

dimensões acima daquelas já relatadas na literatura, o que pode ter gerado o reforço mecânico superior observado para estas amostras. No entanto, maiores investigações são necessárias para elucidar os mecanismos de formação destas estruturas hierarquicamente organizadas.

A concentração de 15 pcr resultou num material reticulado com maior conteúdo amorfo com baixa capacidade de recristalização além de uma morfologia coesa em relação ao material tradicionalmente processado com ácido acético (HAc), não sendo observadas trincas e fissuras na análise morfológica da superfície criada sob fratura frágil. Assim, dentre as formulações avaliadas, a formulação da amostra AC15 (15 pcr de AC) foi selecionada para a etapa de neutralização desta tese por também apresentar maiores capacidades de absorção de água, maior estabilidade dimensional, maior densidade, maiores resistência à tração e flexibilidade e morfologia coesa delineando-se uma possível aplicação como curativo de feridas cutâneas e como um dispositivo de liberação controlada de fármacos nas quais a absorção de água é um parâmetro de relevante importância.

Concluiu-se na primeira parte da pesquisa que o ácido cítrico pode ser substituído pelo ácido acético no processamento termomecânico da quitosana com vantagens, uma vez que o teor de ácido cítrico 3 vezes menor em mols em relação ao ácido acético é capaz de promover maior desestruturação do pó da quitosana, materiais com propriedades mecânicas otimizadas e propriedades físico-químicas mais adequadas para uso como biomateriais.

A metodologia para neutralização dos materiais AC15 e TPC e recuperação do glicerol perdido por solubilização no meio neutralizante, surpreendentemente não acarretou em prejuízos quanto à integridade dos materiais. A neutralização em meio tampão fosfato salino (pH = 7,4) gerou materiais neutros (pH = 7,4) com maior resistência à tração e maior flexibilidade em comparação com o material original mesmo com teores equivalentes de glicerol em comparação com os materiais originais. Estes resultados foram indícios de uma hidrólise alcalina mínima. Além disso o teor de plastificante foi dependente do tempo de imersão dos materiais em glicerol e o material

reticulado apresentou uma absorção de glicerol mais rápida que o material de referência devido a sua maior hidrofiliabilidade.

O ensaio de degradação *in vitro* na presença de lisozima em condições fisiológicas de temperatura e pH mostraram uma baixa degradabilidade para ambos os materiais TPC e AC15 com vantagem para AC15 que apresentou menor degradabilidade devido às reticulações químicas entre as cadeias de quitosana podendo, ambos os materiais, atuarem por no mínimo 7 dias sem grandes perdas de massa.

A determinação da permeabilidade dos materiais indicou uma menor capacidade de transmissão de vapor de água para AC15, devido à maior densidade dos materiais reticulados. O balanço entre a capacidade de absorção de água e a transmissibilidade de vapor de água, entretanto, indicou que TPC e AC15 com 200 μm de espessura apresentam potencial para serem aplicados como curativo cutâneo em feridas com níveis de exsudação de 1118,97 e 1088,97 $\text{g H}_2\text{O} / \text{m}^2 \times \text{dia}$, respectivamente.

Em acordo com a maior capacidade de absorção de água de AC15, este material também apresentou uma capacidade de incorporação do antibiótico cloridrato de tetraciclina superior à capacidade de TPC a 50° C por 3 h, entretanto ambos os materiais apresentaram perfis de liberação percentual praticamente idênticos. A maior capacidade de incorporação do fármaco por AC15, entretanto, favorece a liberação de uma quantidade mássica superior. Além disso ambos os materiais apresentaram uma liberação controlada por 8 dias fazendo destes materiais hábeis dispositivos de liberação controlada por período superior às membranas de quitosana relatadas pela literatura.

Constatou-se que em pH fisiológico ambos os materiais não apresentaram atividade antimicrobiana por difusão em meio ágar. Entretanto os materiais com antibiótico incorporado apresentaram um nítido halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), comprovando o desempenho de ambos os materiais como um possível dispositivo de liberação controlada de fármacos.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Estudar o processo de recristalização da quitosana termomecanicamente processada em busca de compreender porque os materiais contendo AC recristalizam em estruturas superiores em relação aos materiais contendo HAc.

Realizar a análise morfológica e o ensaio mecânico de tração nas amostras processadas com HAc neutralizadas em meio tamponado com diferentes teores de glicerol recuperado.

Obter o ensaio de citotoxicidade das amostras processadas termomecanicamente e prosseguir para os ensaios *in vivo* e clínico.

Incluir na composição dos materiais um agente porogênico e avaliar a viabilidade dos materiais como *scaffolds* para aplicação em engenharia de tecidos cartilagosos.

Obter blendas com outros biopolímeros a fim de se obter novas funcionalidades e conseqüentemente novas aplicabilidades.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Q. Meng, M.C. Heuzey, P.J. Carreau, Hierarchical structure and physicochemical properties of plasticized chitosan, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 1216–1224. <https://doi.org/10.1021/bm401792u>.
- [2] H.P. Hentze, M. Antonietti, Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications, *Rev. Mol. Biotechnol.* 90 (2002) 27–53. [https://doi.org/10.1016/S1389-0352\(01\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0352(01)00046-0).
- [3] V. Epure, M. Griffon, E. Pollet, L. Avérous, Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.003>.
- [4] A. SANTIAGO, G. GALED, B. MIRALLES, A. HERAS, I. PANOS, - Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin, *Carbohydr. Polym.* 62 (2005) 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.019>.
- [5] M.C. Bezerra, G.A. Duarte, S.I. Talabi, A.A. Lucas, Microstructure and properties of thermomechanically processed chitosan citrate-based materials, *Carbohydr. Polym.* 278 (2022) 118984. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118984>.
- [6] H. Chen, B. Li, B. Feng, H. Wang, H. Yuan, Z. Xu, Tetracycline hydrochloride loaded citric acid functionalized chitosan hydrogel for wound healing, *RSC Adv.* 9 (2019) 19523–19530. <https://doi.org/10.1039/c9ra02628b>.
- [7] A.L.R. Pires, A.C.K. Bierhalz, Â.M. Moraes, BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO, *Quantum Inf. Process.* 17 (2015) 957–971. <https://doi.org/10.1007/s11128-018-1930-x>.
- [8] X. Dong, Q. Cheng, Y. Long, C. Xu, H. Fang, Y. Chen, H. Dai, A chitosan based scaffold with enhanced mechanical and biocompatible performance for biomedical applications, *Polym. Degrad. Stab.* 181 (2020) 109322. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109322>.
- [9] J.Y. Lai, Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross-linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 10970–10985. <https://doi.org/10.3390/ijms130910970>.

- [10] A. Madni, R. Khan, M. Ikram, S.S. Naz, T. Khan, F. Wahid, Fabrication and characterization of chitosan–Vitamin C–lactic acid composite membrane for potential skin tissue engineering, *Int. J. Polym. Sci.* 24 (2019) 191–203. <https://doi.org/10.1155/2019/4362395>.
- [11] M.A. Shamekhi, A. Rabiee, H. Mirzadeh, H. Mahdavi, D. Mohebbi-Kalhari, M. Baghaban Eslaminejad, Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 80 (2017) 532–542. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.194>.
- [12] A. Kaviani, S.M. Zebarjad, S. Javadpour, M. Ayatollahi, R. Bazargan-Lari, Fabrication and characterization of low-cost freeze-gelated chitosan/collagen/hydroxyapatite hydrogel nanocomposite scaffold, *Int. J. Polym. Anal. Charact.* 24 (2019) 191–203.
- [13] Z. Sen Shen, X. Cui, R.X. Hou, Q. Li, H.X. Deng, J. Fu, Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering, *RSC Adv.* 5 (2015) 55640–55647. <https://doi.org/10.1039/c5ra06835e>.
- [14] O.J. Fergal, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today.* 14 (2011) 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [15] V.H. Sangeetha, H. Deka, T.O. Varghese, S.K. Nayak, State of the Art and Future Prospectives of Poly(Lactic Acid) Based Blends and Composites, *Polym. Compos.* 39 (2016) 81–101. <https://doi.org/10.1002/pc>.
- [16] B. Imre B.; Pukánszky, Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019>.
- [17] M.B. Dreifke, A.A. Jayasuriya, A.C. Jayasuriya, Current wound healing procedures and potential care, *Mater. Sci. Eng. C.* 48 (2015) 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068>.
- [18] H.T. Peng, P.N. Shek, Novel wound sealants: Biomaterials and applications, *Expert Rev. Med. Devices.* 7 (2010) 639–659. <https://doi.org/10.1586/erd.10.40>.
- [19] R. Gallardo-rivera, M.D.L.Á. Aguilar-santamaría, P. Silva-bermúdez, J.

- García-lópez, A. Tecante, C. Velasquillo, A. Román-guerrero, C. Pérez-Alonso, H. Vázquez-Torres, K. Shirai, Polyelectrolyte complex of Aloe vera , chitosan , and alginate produced fibroblast and lymphocyte viabilities and migration, *Carbohydr. Polym.* 192 (2018) 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.044>.
- [20] M. Chang, Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: A perspective, *Pharmacol Res.* 107 (2016) 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.008>.
- [21] M.M. Islam, M. Shahruzzaman, S. Biswas, M. Nurus Sakib, T.U. Rashid, Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>.
- [22] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- [23] K. V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan, Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>.
- [24] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>.
- [25] E.S. de Alvarenga, C. Pereira de Oliveira, C. Roberto Bellato, An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 1155–1160. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.037>.
- [26] I. Bano, M. Arshad, T. Yasin, M.A. Ghauri, M. Younus, Chitosan: A potential biopolymer for wound management, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>.
- [27] M. Matet, M.C. Heuzey, E. Pollet, A. Ajji, L. Avérous, Innovative thermoplastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.052>.
- [28] K. Okuyama, K. Noguchi, T. Miyazawa, T. Yui, K. Ogawa, Molecular and

- crystal structure of hydrated chitosan, *Macromolecules*. 30 (1997) 5849–5855. <https://doi.org/10.1021/ma970509n>.
- [29] K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, K. Ogawa, Structural diversity of chitosan and its complexes, *Carbohydr. Polym.* 41 (2000) 237–247. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00142-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00142-3).
- [30] M. Matet, M.C. Heuzey, A. Ajji, Morphology and antibacterial properties of plasticized chitosan/metallocene polyethylene blends, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 5427–5440. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8255-7>.
- [31] K. Ziani, J. Oses, V. Coma, J.I. Maté, Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation, *LWT - Food Sci. Technol.* 41 (2008) 2159–2165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.023>.
- [32] P. Kolhe, R.M. Kannan, Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 173–180. <https://doi.org/10.1021/bm025689+>.
- [33] M. Zhang, X.H. Li, Y.D. Gong, N.M. Zhao, X.F. Zhang, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, *Biomaterials*. 23 (2002) 2641–2648. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00403-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00403-3).
- [34] M. Kammoun, M. Haddar, T.K. Kallel, M. Dammak, A. Sayari, Biological properties and biodegradation studies of chitosan biofilms plasticized with PEG and glycerol, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.025>.
- [35] K.M. Dang, R. Yoksan, Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan, *Carbohydr. Polym.* 115 (2015) 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.005>.
- [36] J.F. Fundo, R. Fernandes, P.M. Almeida, A. Carvalho, G. Feio, C.L.M. Silva, M.A.C. Quintas, Molecular mobility, composition and structure analysis in glycerol plasticised chitosan films, *Food Chem.* 144 (2014) 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.127>.
- [37] Suyatma Nugraha E, Tighzert Lan, Copinet Alain, Coma Véronique, Effects

- of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical , Thermal , and Surface Properties of Chitosan Films, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3950–3957. <https://doi.org/10.1021/jf048790>.
- [38] P. Chen, F. Xie, F. Tang, T. McNally, Influence of plasticiser type and nanoclay on the properties of chitosan-based materials, *Eur. Polym. J.* 144 (2021) 110225. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110225>.
- [39] I. Quijada-Garrido, V. Iglesias-González, J.M. Mazón-Arechederra, J.M. Barrales-Rienda, The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol), *Carbohydr. Polym.* 68 (2007) 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.025>.
- [40] P. Guerrero, A. Muxika, I. Zarandona, K. de la Caba, Crosslinking of chitosan films processed by compression molding, *Carbohydr. Polym.* 206 (2019) 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.064>.
- [41] R. Priyadarshi, Sauraj, B. Kumar, Y.S. Negi, Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life, *Carbohydr. Polym.* 195 (2018) 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>.
- [42] D. Nataraj, S. Sakkara, M. Meghwal, N. Reddy, Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.187>.
- [43] M. Cai, J. Gong, J. Cao, Y. Chen, X. Luo, In situ chemically crosslinked chitosan membrane by adipic acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 128 (2013) 3308–3314. <https://doi.org/10.1002/app.38527>.
- [44] B.M. Simões, C. Cagnin, F. Yamashita, J.B. Olivato, P.S. Garcia, S.M. de Oliveira, M.V. Eiras Grossmann, Citric acid as crosslinking agent in starch/xanthan gum hydrogels produced by extrusion and thermopressing, *Lwt.* 125 (2020) 108950. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108950>.
- [45] K. Wilpiszewska, Z. Czech, Citric acid modified potato starch films containing microcrystalline cellulose reinforcement - Properties and

- application, *Starch/Staerke*. 66 (2014) 660–667. <https://doi.org/10.1002/star.201300093>.
- [46] H. Wu, Y. Lei, J. Lu, R. Zhu, D. Xiao, C. Jiao, R. Xia, Z. Zhang, G. Shen, Y. Liu, S. Li, M. Li, Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films, *Food Hydrocoll.* 97 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>.
- [47] L. Avérous, C. Fringant, L. Moro, Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites, *Polymer (Guildf)*. 42 (2001) 6565–6572. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00125-2).
- [48] H. Chen, H. Wang, B. Li, B. Feng, X. He, W. Fu, H. Yuan, Z. Xu, Enhanced chondrogenic differentiation of human mesenchymal stems cells on citric acid-modified chitosan hydrogel for tracheal cartilage regeneration applications, *RSC Adv.* 8 (2018) 16910–16917. <https://doi.org/10.1039/c8ra00808f>.
- [49] A. Apelblat, *Citric Acid*, 1st ed., Springer International Publishing, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11233-6>.
- [50] G. Garrido, C. Ràfols, E. Bosch, Acidity constants in methanol/water mixtures of polycarboxylic acids used in drug salt preparations: Potentiometric determination of aqueous pK a values of quetiapine formulated as hemifumarate, *Eur. J. Pharm. Sci.* 28 (2006) 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.01.005>.
- [51] P. Chen, F. Xie, F. Tang, T. McNally, Unexpected Plasticization Effects on the Structure and Properties of Polyelectrolyte Complexed Chitosan/Alginate Materials, *ACS Appl. Polym. Mater.* 2 (2020) 2957–2966. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00433>.
- [52] D.F. Xie, V.P. Martino, P. Sangwan, C. Way, G.A. Cash, E. Pollet, K.M. Dean, P.J. Halley, L. Avérous, Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nano-biocomposites, *Polymer (Guildf)*. 54 (2013) 3654–3662. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.05.017>.
- [53] W.D.C. Jr, D.G. Reyhwinch, *Ciência E Engenharia De Materiais Uma Introdução*, 8 edição, 2012. <https://doi.org/978-8521637288>.
- [54] J.F. Mendes, R.T. Paschoalin, V.B. Carmona, A.R. Sena Neto, A.C.P.

- Marques, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, E.S. Medeiros, J.E. Oliveira, Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion, *Carbohydr. Polym.* 137 (2016) 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.093>.
- [55] P. Chen, F. Xie, F. Tang, T. McNally, Structure and properties of thermomechanically processed chitosan/carboxymethyl cellulose/graphene oxide polyelectrolyte complexed bionanocomposites, *Int. J. Biol. Macromol.* 158 (2020) 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.259>.
- [56] Y. Chen, Q. Duan, L. Yu, F. Xie, Thermomechanically processed chitosan:gelatin films being transparent, mechanically robust and less hygroscopic, *Carbohydr. Polym.* 272 (2021) 118522. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118522>.
- [57] Y. Zhang, B.-L. Liu, L.-J. Wang, Y.-H. Deng, S.-Y. Zhou, J.-W. Feng, Preparation structure and properties of acid aqueous solution plasticized thermoplastic chitosan, *Polymers (Basel)*. 11 (2019) 818. <https://doi.org/doi:10.3390/polym11050818>.
- [58] L. Avérous, Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review, *J. Macromol. Sci. Part c Polym. Rev.* 44 (2004) 231–274. <https://doi.org/10.1081/MC-200029326>.
- [59] C. Clasen, T. Wilhelms, W. Kulicke, Formation and Characterization of Chitosan Membranes, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 3210–3222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bm060486x>.
- [60] D. Raabe, C. Sachs, P. Romano, The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material, *Acta Mater.* 53 (2005) 4281–4292. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2005.05.027>.
- [61] R.P. Kambour, A review of Craze and Fracture in Thermoplastics, *J Polym Sci, Part D, Macromol Rev.* 7 (1973) 1–154. <https://doi.org/10.1002/pol.1973.230070101>.
- [62] R.N. Haward, R.J. Young, *The physics of glassy polymers*, Second Edi, Springer Science & Business Media, 1997. <https://doi.org/10.1007/978-94->

- 011--5850-3.
- [63] R. Estevez, M.G.A. Tijssens, E. Van Der Giessen, Modeling of the competition between shear yielding and crazing in glassy polymers, *J. Mech. Phys. Solids*. 48 (2000) 2585–2617. [https://doi.org/10.1016/S0022-5096\(00\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5096(00)00016-8).
- [64] R.S. Yamakawa, *Uso do método do trabalho essencial de fratura (EWF) para avaliar a tenacidade de blendas poliméricas*, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- [65] Guanghui Gao, J. Zhang, H. Yang, C. Zhou, H. Zhang, Deformation mechanism of polystyrene toughened with sub-micrometer monodisperse rubber particles, *Polym. Int.* 55 (2006) 1215–1221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.2065>.
- [66] T.H. Tran, H.-L. Nguyen, L.T. Hao, H. Kong, J.M. Park, S.-H. Jung, H.G. Cha, J.Y. Lee, H. Kim, S.Y. Hwang, J. Park, D.X. Oh, A ball milling-based one-step transformation of chitin biomass to organo-dispersible strong nanofibers passing highly time and energy consuming processes, *Int. J. Biol. Macromol.* 125 (2019) 660–667. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.086>.
- [67] Sebastião Vicente Canevarolo Junior, *Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, Terceira e, São Paulo, 2010.
- [68] A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, A. Muxika, Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>.
- [69] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, 22 (2001) 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00183-6).
- [70] P.R. Sivashankari, M. Prabakaran, Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1382–1389. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043>.
- [71] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36

- (2011) 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.
- [72] S. Ahmed, S. Ikram, Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing, *Achiev. Life Sci.* 10 (2016) 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>.
- [73] O. Lopez, M.A. Garcia, M.A. Villar, A. Gentili, M.S. Rodriguez, L. Albertengo, Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan, *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014) 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.024>.
- [74] C. Tangsadthakun, S. Kanokpanont, N. Sanchavanakit, R. Pichyangkura, T. Banaprasert, Y. Tabata, S. Damrongsakkul, The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 18 (2007) 147–163. <https://doi.org/10.1163/156856207779116694>.
- [75] B. Duan, L. Wu, X. Li, X. Yuan, X. Li, Y. Zhang, K. Yao, Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 18 (2007) 95–115. <https://doi.org/10.1163/156856207779146105>.
- [76] A.A. Nada, E.A. Ali, A.A.F. Soliman, Biocompatible chitosan-based hydrogel with tunable mechanical and physical properties formed at body temperature, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.093>.
- [77] A. Ali, S. Ahmed, A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
- [78] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.002>.
- [79] A. Anitha, S. Sowmya, P.T.S. Kumar, S. Deepthi, K.P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, R. Jayakumar, Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 1644–1667. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>.
- [80] WHO, INJURIES VIOLENCE THE FACTS The magnitude and causes of

- injuries, Geneva World Heal. Organ. (2014) 20. http://www.who.int/violence_injury_prevention/media/news/2015/Injury_violence_facts_2014/en/.
- [81] T.G. Sahana, P.D. Rekha, Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering, *Mol. Biol. Rep.* 45 (2018) 2857–2867. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4296-3>.
- [82] C. Choi, J.P. Nam, J.W. Nah, Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials, *J. Ind. Eng. Chem.* 33 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.10.028>.
- [83] Z. Zhou, Y. Liu, X. Chen, C. Feng, X. Cheng, D. Yan, M. Kong, Biomaterials based on N,N,N -trimethyl chitosan fibers in wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.036>.
- [84] Z. Zhou, Y. Liu, X. Chen, C. Feng, X. Cheng, D. Yan, M. Kong, Biomaterials based on N,N,N -trimethyl chitosan fibers in wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.036>.
- [85] V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan, Chitosan as a starting material for wound healing applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>.
- [86] T. Dai, M. Tanaka, Y. Huang, Chitosan preparations for wounds and burns : antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9 (2011) 857–879. <https://doi.org/10.1586/ERI.11.59>.
- [87] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>.
- [88] T. Dai, M. Tanaka, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 9 (2011) 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>.
- [89] L. Wang, E. Khor, A. Wee, L.Y. Lim, Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing, *J. Biomed. Mater. Res.* 63 (2002) 610–618. <https://doi.org/10.1002/jbm.10382>.

- [90] S.M. Matalqah, K. Aiedeh, N.M. Mhaidat, K.H. Alzoubi, Y. Bustanji, I. Hamad, Chitosan Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System: A Review Article, *Curr. Drug Targets.* 21 (2020) 1613–1624. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200711172536>.
- [91] M.V. Junqueira, M.L. Bruschi, A Review About the Drug Delivery from Microsponges, *AAPS PharmSciTech.* 19 (2018) 1501–1511. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0976-5>.
- [92] N.Y. Abu-Thabit, A.S.H. Makhlof, Historical development of drug delivery systems: From conventional macroscale to controlled, targeted, and responsive nanoscale systems, in: *Stimuli Responsive Polym. Nanocarriers Drug Deliv. Appl. Vol. 1 Types Triggers*, Woodhead Publishing, 2018: pp. 3–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00001-1>.
- [93] R.R. H., E. M., A. arjmand A., Ö. A., Controlled Drug Delivery Systems, in: *A Rev. Biomater. Their Appl. Drug Deliv.*, SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology, Singapore, 2018: pp. 31–41. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-0503-9_4.
- [94] R.R. H., E. M., A. arjmand A., Ö. A., Classification of Drug Delivery Systems, in: *A Rev. Biomater. Their Appl. Drug Deliv.*, SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology, Singapore, 2018: pp. 9–25. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-0503-9_2.
- [95] S.C. Chen, Y.C. Wu, F.L. Mi, Y.H. Lin, L.C. Yu, H.W. Sung, A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery, *J. Control. Release.* 96 (2004) 285–300. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.002>.
- [96] R. Trastullo, A. Abruzzo, B. Saladini, M.C. Gallucci, T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, Design and evaluation of buccal films as paediatric dosage form for transmucosal delivery of ondansetron, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 105 (2016) 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.026>.
- [97] P. Kraisit, E. Yonemochi, T. Furuishi, J. Mahadlek, S. Limmatvapirat, Chitosan film containing antifungal agent-loaded SLNs for the treatment of candidiasis using a Box-Behnken design, *Carbohydr. Polym.* 283 (2022)

119178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119178>.
- [98] Y. Yang, G. Chen, P. Murray, H. Zhang, Porous chitosan by crosslinking with tricarboxylic acid and tuneable release, *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 432. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2252-z>.
- [99] A.C.M. Fonseca, Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosanas extraídas dos rejeitos da indústria pesqueira da região de Cananéia - SP, Universidade de São Paulo, 2016.
- [100] W. Zou, Y. Chen, X. Zhang, J. Li, L. Sun, Z. Gui, B. Du, S. Chen, Cytocompatible chitosan based multi-network hydrogels with antimicrobial, cell anti-adhesive and mechanical properties, *Carbohydr. Polym.* 202 (2018) 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.124>.
- [101] F.R. Marin, L.R. Angelocci, M.A. Coelho Filho, N.A. Villa Nova, Construção e avaliação de psicrômetro aspirado de termopar, *Sci. Agric.* 58 (2001) 839–844. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000400028>.
- [102] M. Matet, M.C. Heuzey, A. Ajji, Morphology and antibacterial properties of plasticized chitosan/metalocene polyethylene blends, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 5427–5440. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8255-7>.
- [103] H. Wu, Y. Lei, J. Lu, R. Zhu, D. Xiao, C. Jiao, R. Xia, Z. Zhang, G. Shen, Y. Liu, S. Li, M. Li, Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films, *Food Hydrocoll.* 97 (2019) 105208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>.
- [104] J.N. Silva, M.C. Bezerra, P.M.A. Farias, Novel and simple route for the synthesis of core-shell chitosan-gold nanocomposites, *Mater. Chem. Phys.* 135 (2012) 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.04.016>.
- [105] X. Dou, Q. Li, Q. Wu, L. Duan, S. Zhou, Y. Zhang, Effects of lactic acid and mixed acid aqueous solutions on the preparation, structure and properties of thermoplastic chitosan, *Eur. Polym. J.* 134 (2020) 109850. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109850>.
- [106] M.R. Kasaai, A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 71 (2008) 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.009>.

- [107] P. Cazón, G. Velazquez, J.A. Ramírez, M. Vázquez, Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review, *Food Hydrocoll.* 68 (2017) 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>.
- [108] R. Priyadarshi, Sauraj, B. Kumar, Y.S. Negi, Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life, *Carbohydr. Polym.* 195 (2018) 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>.
- [109] G. Solomons, C. Fryhle, *Química Orgânica, Sétima Edi, LTC*, 2002.
- [110] K.I. Takei, R. Takahashi, T. Noguchi, Correlation between the hydrogen-bond structures and the C=O stretching frequencies of carboxylic acids as studied by density functional theory calculations: Theoretical basis for interpretation of infrared bands of carboxylic groups in proteins, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 6725–6731. <https://doi.org/10.1021/jp801151k>.
- [111] F.S. Kittur, A.B. Vishu Kumar, R.N. Tharanathan, Low molecular weight chitosans - Preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1283–1290. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00175-7).
- [112] F.M. Peres, *Desenvolvimento de métodos alternativos para a avaliação da resistência à fratura por fluência de resinas de polietileno utilizadas para a extrusão de tubos de água*, Universidade de São Paulo, 2005. <https://doi.org/10.11606/D.3.2005.tde-08112005-092736>.
- [113] L. Cano, E. Pollet, L. Avérous, A. Tercjak, Effect of TiO₂ nanoparticles on the properties of thermoplastic chitosan-based nano-biocomposites obtained by mechanical kneading, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 93 (2017) 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.11.012>.
- [114] P. Hiranpattanakul, T. Jongjitpissamai, S. Aungwerojanawit, W. Tachaboonyakiat, Fabrication of a chitin/chitosan hydrocolloid wound dressing and evaluation of its bioactive properties, *Res. Chem. Intermed.* 44 (2018) 4913–4928. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3344-x>.
- [115] L. Sun, J. Sun, L. Chen, P. Niu, X. Yang, Y. Guo, Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material, *Carbohydr. Polym.* 163

- (2017) 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.016>.
- [116] K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*. 18 (1997) 567–575.
- [117] A.M. Senna, A.J. De Menezes, V.R. Botaro, Estudo da densidade de ligações cruzadas em géis superabsorventes obtidos do acetato de celulose, *Polímeros*. 23 (2013) 59–64. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000078>.
- [118] S. Mathew, T.E. Abraham, Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films, *Food Hydrocoll.* 22 (2008) 826–835. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.03.012>.
- [119] C. Clasen, T. Wilhelms, W.M. Kulicke, Formation and characterization of chitosan membranes, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 3210–3222. <https://doi.org/10.1021/bm060486x>.
- [120] J.F.M. Manschot, A.J.M. Brakkee, The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin in vivo—II. The model, *J. Biomech.* 19 (1986) 517–521.
- [121] S. Luebberding, N. Krueger, M. Kerscher, Mechanical properties of human skin in vivo: A comparative evaluation in 300 men and women, *Ski. Res. Technol.* 20 (2014) 127–135. <https://doi.org/10.1111/srt.12094>.
- [122] G.W. Ruas, Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2010.
- [123] S.S. Silva, E.G. Popa, M.E. Gomes, M. Cerqueira, A.P. Marques, S.G. Caridade, P. Teixeira, C. Sousa, J.F. Mano, R.L. Reis, An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine, *Acta Biomater.* 9 (2013) 6790–6797. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.027>.
- [124] P.G.H.W.A. Morrison, Current concepts in wound dressings, *Aust. Prescr.* 19 (1996) 11–13. <https://doi.org/10.18773/austprescr.1996.011>.
- [125] M. Nieto-Suárez;, M.A. López-Quintela;, M. Lazzari, Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin Scaffolds by ice segregation induced self-assembly, *Carbohydr. Polym.* 141 (2016) 175–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.064>.

- [126] S. Khoshgozaran-abras, M.H. Azizi, Z. Hamidy, N. Bagheripoor-Fallah, Mechanical , physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2058–2062. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.020>.
- [127] P. Wu, E.A. Nelson, W.H. Reid, C. V. Ruckley, J.D.S. Gaylor, Water vapour transmission rates in burns and chronic leg ulcers: Influence of wound dressings and comparison with in vitro evaluation, *Biomaterials.* 17 (1996) 1373–1377. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87277-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87277-2).
- [128] O. Castaño, S. Pérez-Amodio, C. Navarro-Requena, M.Á. Mateos-Timoneda, E. Engel, Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 129 (2018) 95–117. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.012>.
- [129] T. Martins, Desenvolvimento e caracterização de matrizes compósitas tridimensionais flexíveis de quitosana/vidro bioativo para aplicação potencial no tratamento e regeneração de lesões cutâneas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- [130] J.C. Nery, Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2014.
- [131] J.M.C. D. Queen, J.D.S. Gaylor, J.H. Evans, The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressing, *Biomaterials.* 8 (1987) 367–371. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(87\)90007-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(87)90007-X).
- [132] G.M. Genevro, Desenvolvimento de materiais microestruturados a partir de biopolímeros para obtenção de curativos de alto desempenho, Universidade estadual de Campinas, 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2017.987947>.
- [133] Q. Luo, W. Yuan, Y. Liu, K. Li, D. Jiang, X. Tang, X. Chen, W. Chen, D. Hou, X. Shen, Q. Liu, H. Xie, Q. Wang, Y. He, W. Ge, Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2017) 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.142>.

- [134] P. Wu, A.C. Fisher, P.P. Foo, D. Queen, J.D.S. Gaylor, In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings, *Biomaterials*. 16 (1995) 171–175. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)92114-L](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)92114-L).
- [135] L.O. Lamke, G.E. Nilsson, H.L. Reithner, The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns, *Burns*. 3 (1977) 159–165. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(77\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(77)90004-3).
- [136] K.D.R. Anandalakshmi, Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019) 815–829. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.027>.
- [137] N. Bhattarai, H.R. Ramay, J. Gunn, F.A. Matsen, M. Zhang, PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release, *J. Control. Release*. 103 (2005) 609–624. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.12.019>.
- [138] M. Iriti, E.M. Varoni, Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 2935–2944. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3571-7>.
- [139] D. Ailincăi, L. Marin, S. Morariu, M. Mares, A.-C. Bostanaru, M. Pinteala, B.C. Simionescu, M. Barboiu, Dual crosslinked iminoboronate-chitosan hydrogels with strong antifungal activity against *Candida* planktonic yeasts and biofilms, *Carbohydr. Polym.* 152 (2016) 306–316. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>.
- [140] L. Huang, T. Dai, Y. Xuan, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy against bacterial burn infections, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 3432–3438. <https://doi.org/10.1128/AAC.01803-10>.
- [141] G. Piette, Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan - based Antimicrobial Packaging Films Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-based Antimicrobial Packaging Films, (2017). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13584.x>.
- [142] V.M. Correlo, L.F. Boesel, M. Bhattacharya, J.F. Mano, N.M. Neves, R.L.

- Reis, Properties of melt processed chitosan and aliphatic polyester blends, *Mater. Sci. Eng. A.* 403 (2005) 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.04.055>.
- [143] P. Bie, P. Liu, L. Yu, X. Li, L. Chen, F. Xie, The properties of antimicrobial films derived from poly(lactic acid)/starch/chitosan blended matrix, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 959–966. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.004>.
- [144] J. Bonilla, E. Fortunati, M. Vargas, A. Chiralt, J.M. Kenny, Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films, *J. Food Eng.* 119 (2013) 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.026>.
- [145] L.A. Bosworth, S. Downes, Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds, *Polym. Degrad. Stab.* 95 (2010) 2269–2276. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.09.007>.
- [146] A.E.H. Rolim, A.A. Rosa, F. P. Carvalho, C.C. Costa, F. Paim, Artigo Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo, 10 (2018).
- [147] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>.
- [148] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 292–312. <https://doi.org/10.3390/md8020292>.
- [149] J. Kwan Hwang, H.H. Shin, Rheological properties of chitosan solutions, *Aust. Rheol. J.* 12 (2000) 175–179. <https://pdfs.semanticscholar.org/89e5/8dad66b01f4427f34dc75ec3eb6ed8e576c0.pdf>.
- [150] N. Nishi, S. Tokura, K. Nishimura, I. Azuma, Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by o-(carboxymethyl)chitins, *Carbohydr. Res.* 146 (1986) 251–258.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)85044-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)85044-3).

- [151] Y. Shibata, L.A. Foster, J.F. Bradfield, Q.N. Myrvik, Oral Administration of Chitin Down-Regulates Serum IgE Levels and Lung Eosinophilia in the Allergic Mouse, *J. Immunol.* 164 (2014) 1314–1321. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1314>.

APÊNDICE A

Espectros no infravermelho do ácido cítrico, quitosana, TPC, AC5, AC10 e AC15

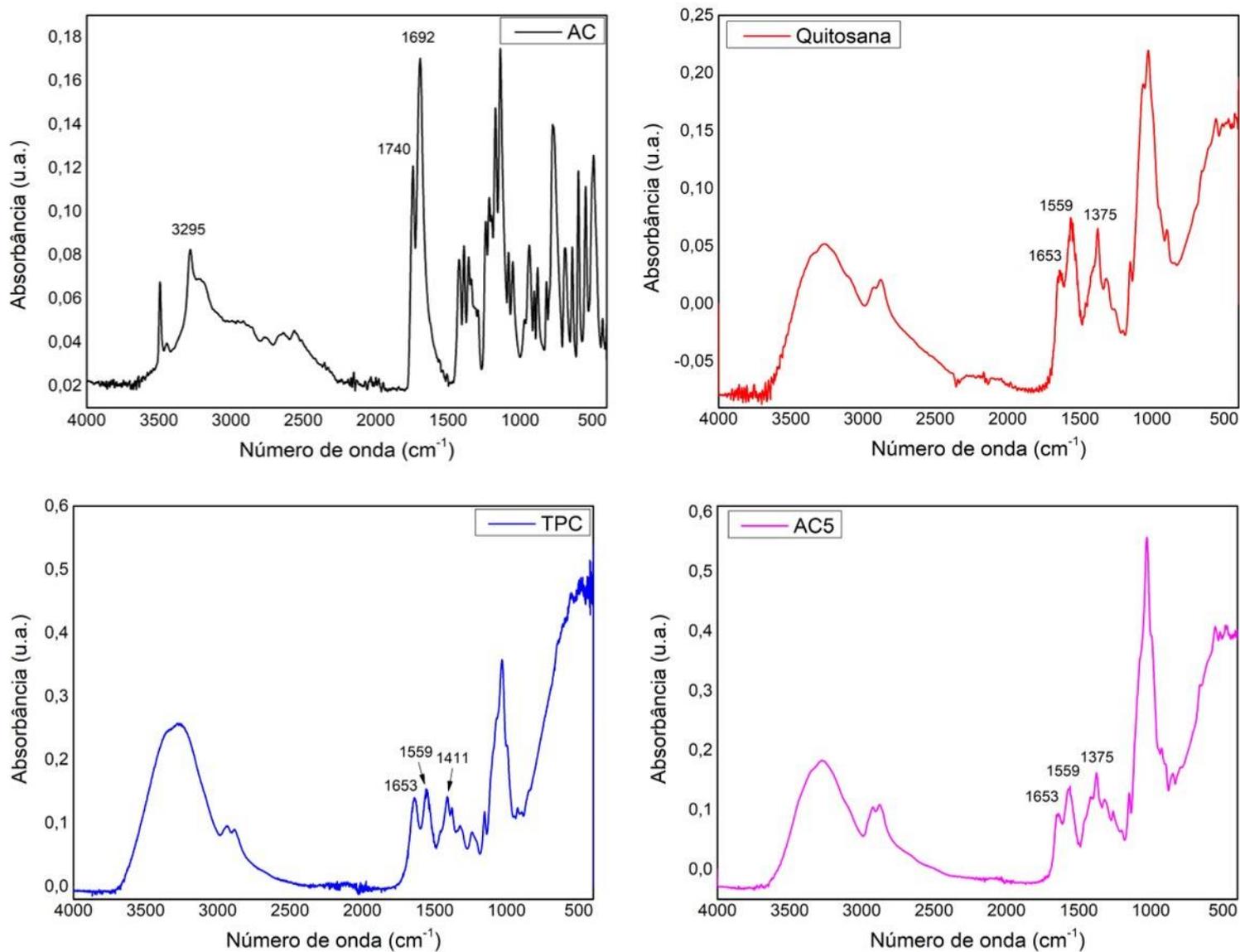


Figura A1 - Espectros no infravermelho do ácido cítrico, quitosana, TPC, AC5, AC10 e AC15.

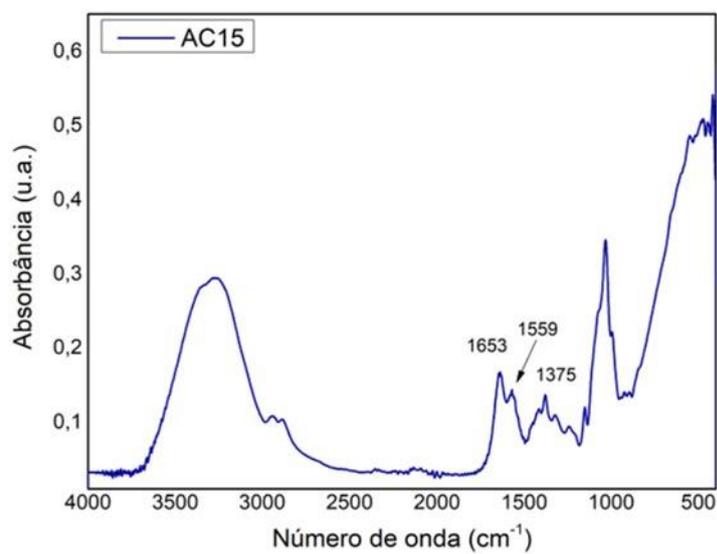
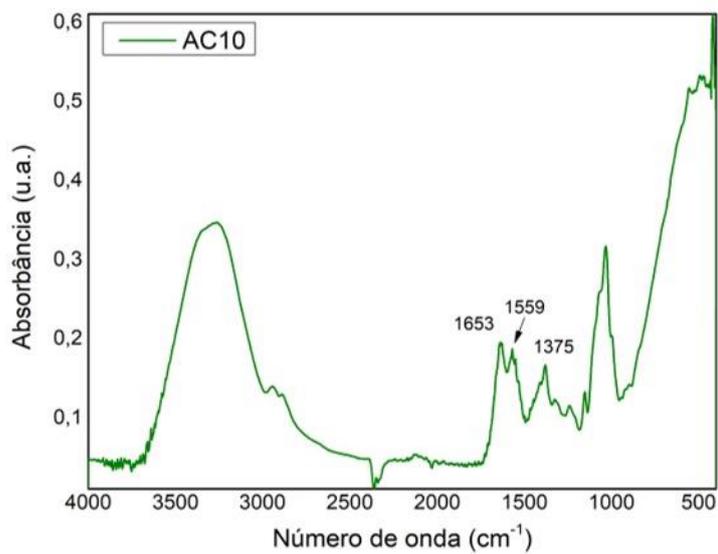


Figura A2 – Espectros no infravermelho de AC10 e AC15.

APÊNDICE B

Imagens de MEV das superfícies das amostras AC10 (direita) e TPC (esquerda)

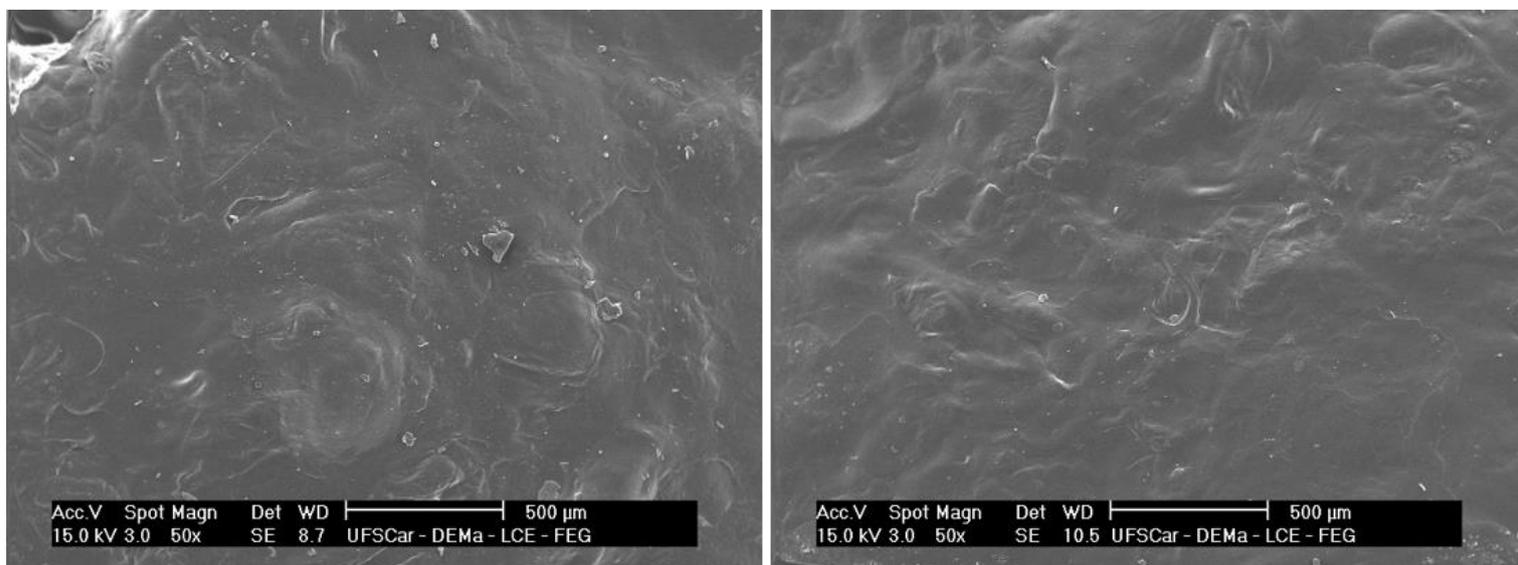


Figura B1 – Imagens de MEV das superfícies das amostras AC10 (direita) e TPC (esquerda)

APÊNDICE C

Curvas do ensaio mecânico de tração das amostras TPC, AC10 e AC15 após estabilização por 30 dias sob UR = 50% (Figura C1) e após intumescimento sob condições fisiológicas de temperatura e pH (Figura C2).

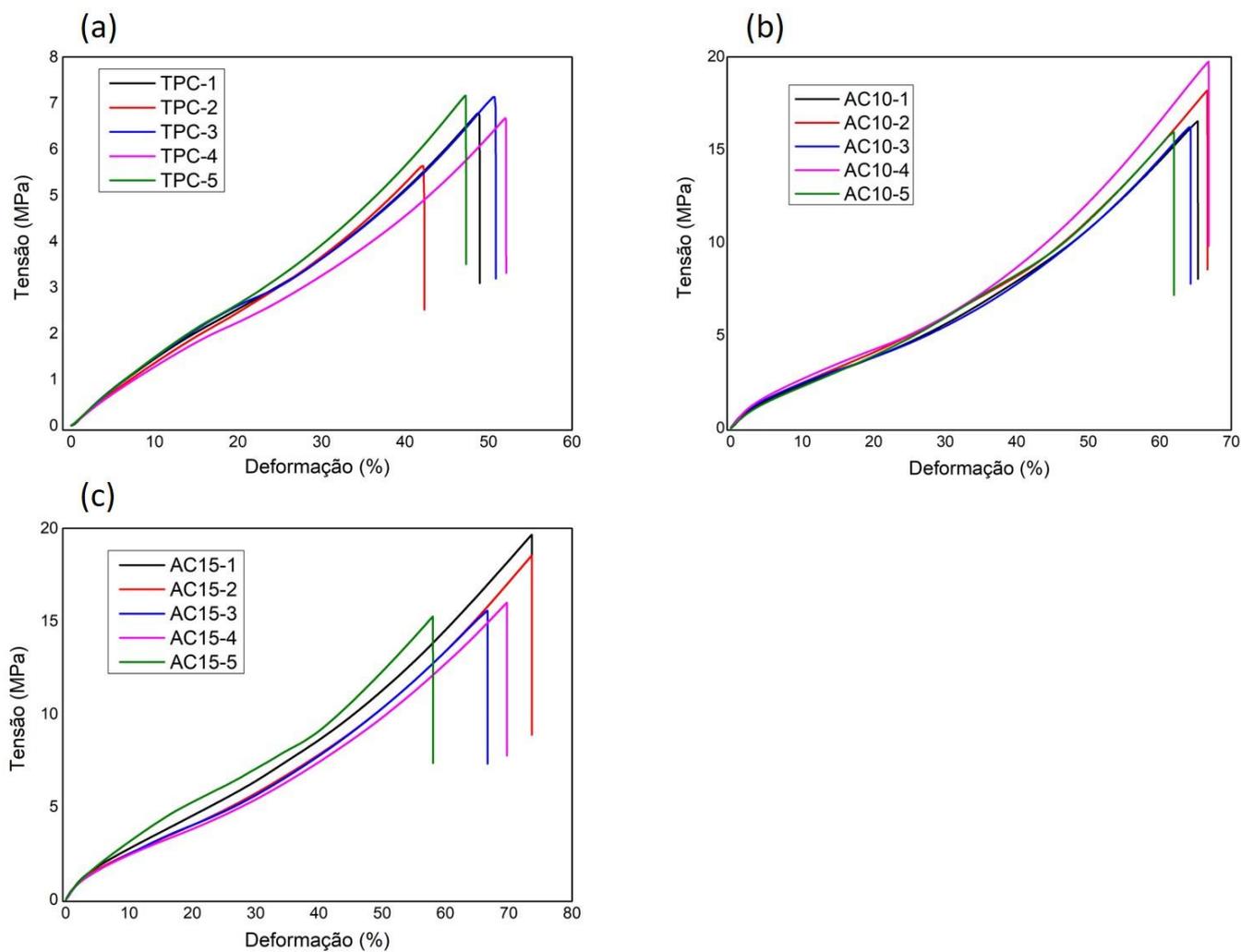


Figura C1 – Curvas tensão x deformação de todas as réplicas de (a) TPC; (b) AC10 e (c) AC15

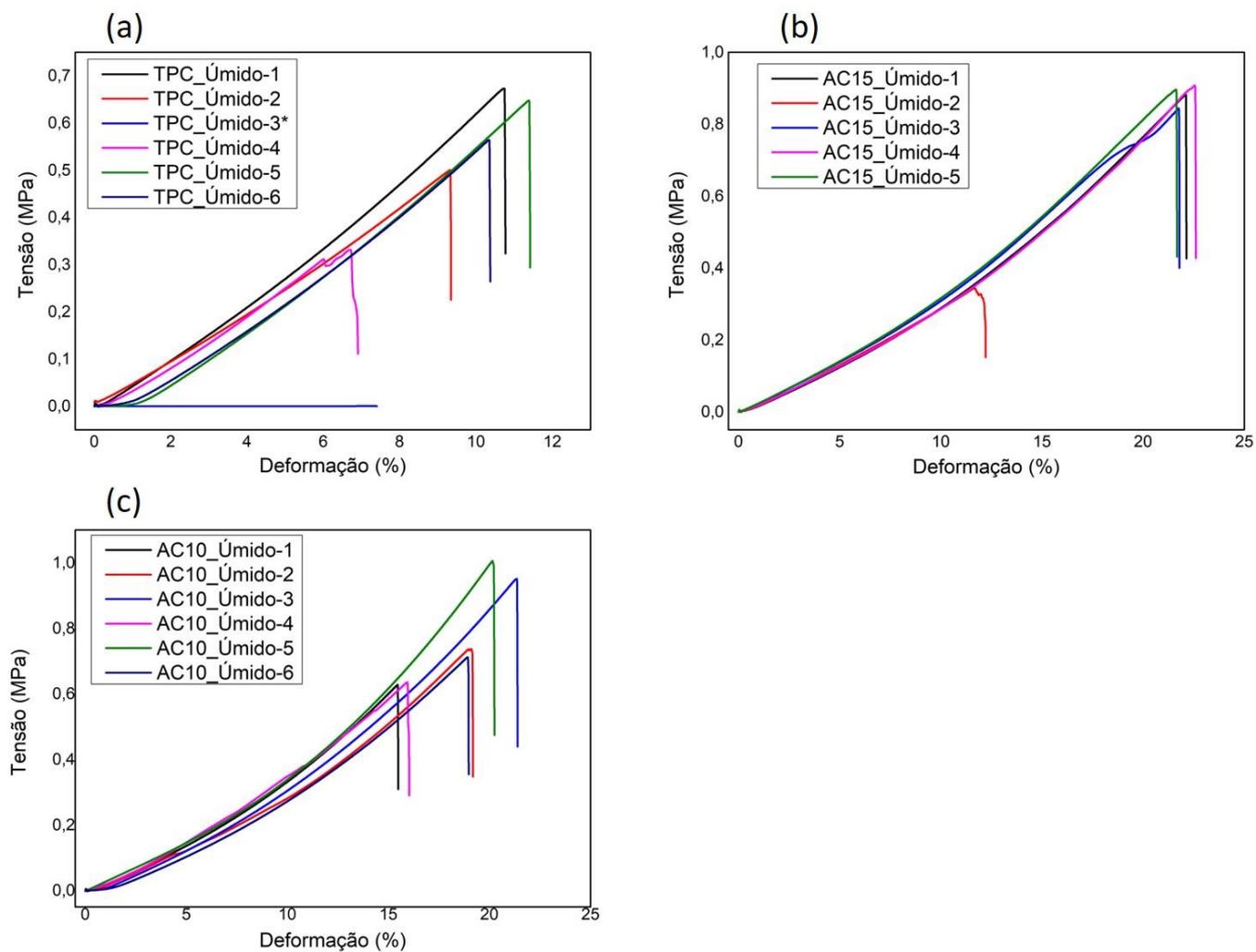


Figura C2 - Curvas tensão x deformação de todas as réplicas de (a) TPC; (b) AC10 e (c) AC15 após intumescimento em solução PBS (pH 7,4) e 37°C por 40h.

APÊNDICE D

Curvas termogravimétricas do glicerol e do ácido cítrico.

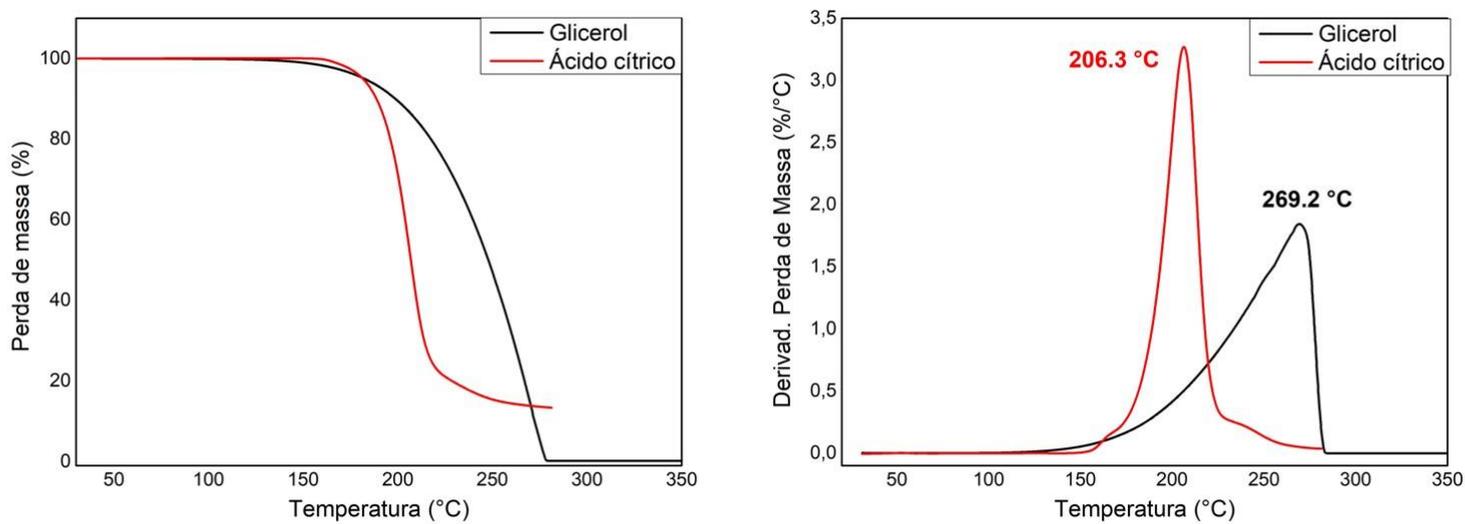


Figura D1 – Curvas termogravimétricas (à esquerda) e curva DTG (à direita) do AC e glicerol.

APÊNDICE E

Dados obtidos a partir do ensaio de Permeação ao vapor de água – PVA

Tabela E1 - Média da perda de massa a cada medida para TPC e AC15.

Tempo (h)	Perda de massa média (g)	Desvio padrão (g)	Perda de massa média (g)	Desvio padrão (g)
	TPC		AC15	
0	0	0	0	0
13,5	0,291166667	0,023452576	0,253933333	0,005700292
23,25	0,7252	0,050530882	0,678533333	0,018020081
38	1,1769	0,069369518	1,117933333	0,006011933
47,28	1,5668	0,086792396	1,499966667	0,006653069
62	2,202966667	0,134416157	2,094566667	0,253691256
70,5	2,423066667	0,11591783	2,352566667	0,016302556
86,5	2,662533333	0,129417245	2,5866	0,020954474
94,57	2,9911	0,151864051	2,9361	0,005781868

Quadro E1 - Resumo dos dados utilizados para determinação dos valores de PVA e TVA para TPC e AC15.

Medidas (unidade)	TPC	AC15
A (m ²)	0,001948	0,001948
$\Delta P = [S \times (R_1 - R_2)]$ (Pa)	840,0073	840,0073
X (μm)	437,89 \pm 27,70	417,61 \pm 20,11
Taxa (gráfico) (g / h)	0,0328 \pm 0,00133	0,0322 \pm 0,00122
PVA (g x mm / m ² x h x Pa)	8,78 x 10 ⁻³	8,22 x 10 ⁻³
TVA _{700 μm} (g / h x m ²)	252,82	236,70
TVA _{200 μm} (g / h x m ²)	884,84	828,44

ANEXO A

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA QUITOSANA

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da quitosana é, sem dúvida, uma das propriedades mais requeridas em pesquisas que envolvem aplicações biológicas. A quitosana como agente antimicrobiano tem recebido considerável atenção nos últimos anos. A quitosana e seus derivados mostraram razoável atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos, como bactérias, fungos e vírus [7,9,153].

A atividade antimicrobiana da quitosana depende principalmente da sua massa molar e concentração. A quitosana de baixa massa molar tem fortes propriedades antibacterianas. Foi verificada a atividade antibacteriana da quitosana de baixa massa molar contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores observaram que o efeito da resistência antimicrobiana permaneceu mesmo após alguns meses. Da mesma forma, propriedades antifúngicas da quitosana de baixa massa molar foram estudadas contra fungos hepatocarcinogênicos [26].

Verificou-se que uma bandagem de acetato de quitosana aumentou significativamente a taxa de sobrevivência de camundongos com queimaduras de terceiro grau altamente infectadas com 10^7 CFU (unidades formadoras de colônia) de *Pseudomonas aeruginosa* em comparação com controles não tratados (73,3% versus 13,3%; $P < 0,0002$) [140].

O tipo de ácido utilizado exerce influência nas propriedades biológicas dos filmes de quitosana. Filmes de quitosana contendo ácido acético ou ácido propiônico, com ou sem adição de ácido láurico ou cinamaldeído, foram projetados para melhorar a vida útil de carnes refrigeradas processadas e embaladas a vácuo. A aplicação dos filmes atrasou ou inibiu completamente as bactérias entéricas, *Lactobacillus sakei* e *Serratia liquefaciens* em produtos cárneos. Entretanto filmes preparados com ácido propiônico foram mais efetivos que filmes contendo ácido acético para redução do crescimento de *L. sakei*, com o resultado oposto observado para *S. liquefaciens* [141].

Diversos autores sintetizaram blendas e compósitos com a quitosana devido a seu misto de propriedades de biodegradação, biocompatibilidade e, principalmente, a atividade antimicrobiana [64, 92, 156–158,159].

Biodegradabilidade e Capacidade de Reabsorção

Antes de aprofundar a explanação é importante estabelecer os conceitos envolvidos. Existe uma grande confusão na literatura no emprego do termo biodegradabilidade. Há dois conceitos que se misturam que são a biodegradação e a biorreabsorção. A IUPAC determina que Polímeros Biodegradáveis são macromoléculas susceptíveis à degradação por atividade biológica (microrganismos) com diminuição da massa molar. A norma ISO 15488 (importante na concepção e no projeto de embalagens biodegradáveis) estabelece ainda “o requisito para que uma embalagem seja considerada biodegradável e compostável é que a mineralização dos materiais da embalagem atinja 90% ou mais de conversão do carbono orgânico disponível em dióxido de carbono, em 180 dias”. Assim ao se falar de um material biodegradável fala-se de uma degradação no meio ambiente. O termo correto para se falar em degradação em meio fisiológico é a biorreabsorvibilidade.

A quitosana é um material biodegradável e biorreabsorvível podendo ser utilizada tanto em formulações que devem ser degradadas *in vivo* quanto em formulações para a rápida degradação no meio ambiente. A biorreabsorção consiste na reabsorção, ou seja, na eliminação por rotas metabólicas, dos resíduos poliméricos após degradação (enzimática) *in vivo*, [145]. A quitosana quando submetida ao meio fisiológico é degradada por ação de hidrólise pela enzima lisozima, que é normalmente produzida pelos macrófagos [146], sendo caracterizada, portanto, como um material polimérico biorreabsorvível.

Citocompatibilidade, Bioatividade e Biocompatibilidade

A biocompatibilidade pressupõe que a aplicação clínica de um material não causa reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente. Entre os materiais biocompatíveis encontram-se os bioativos e os bioinertes. A

bioatividade por sua vez é a propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. Os filmes de quitosana são biomateriais muito bons para cicatrização superficial de feridas [69]. Uma vez colocados na ferida, aderem aos fibroblastos e favorecem a proliferação de queratinócitos e, portanto, a regeneração epidérmica, sendo, portanto, bioativa. Os monômeros de quitosana também ajudam na deposição ordenada de colágeno e estimulam o aumento do nível de síntese de ácido hialurônico natural no local da ferida. A quitosana fornece uma matriz celulósica para a regeneração dos tecidos da pele e ativa os macrófagos para interromper a atividade anormal do crescimento. Isso ajuda na cicatrização mais rápida da ferida e na prevenção da cicatriz hipertrófica [26]

A citocompatibilidade da quitosana foi observada *in vitro* com células miocárdicas, endoteliais e epiteliais, fibroblastos, hepatócitos, condrócitos e queratinócitos. À medida que o grau de desacetilação do polímero aumenta, as interações entre a quitosana e as células aumentam e, com auxílio dos grupos amino livres, a adesão e proliferação celular aumentam em função do GD [88, 90].

Não Alergenicidade

Uma das grandes preocupações da utilização da quitosana é o fator alergênico inerente aos crustáceos, fonte de onde o material é extraído. Uma pequena parte da literatura dedicada ao estudo da quitosana a descreve como não alergênica [93, 107, 162].

Nos organismos vivos a quitina ocorre em estruturas complexas com outros compostos orgânicos e inorgânicos. Muzzarelli realizou uma extensa revisão sobre a não alergenicidade e capacidades imunoadjuvantes da quitina e quitosana [148]. Em sua explanação o autor explica que o caráter alergênico dos crustáceos é devido a alguns constituintes proteicos que compõem o exoesqueleto dos crustáceos numa estrutura compósita e que esses componentes proteicos são desestruturados e eliminados no processo de extração da quitina.

Além disso, quase três décadas atrás, Suzuki et al. e Nishimura et al. demonstraram que a quitina e os derivados de quitina estimulam os macrófagos a produzir citocinas que conferem atividade antitumoral e resistência inespecífica ao hospedeiro contra infecções bacterianas e virais [163, 164]. Foi demonstrado que citocinas do tipo I reduzem a resposta imune alérgica tipo 2 [151]. Todos esses achados configuram a quitina e seus derivados, a quitosana portanto, como materiais não alergênicos e como adjuvantes imunológicos.

Influência do Grau de Desacetilação e Massa Molar Sobre as Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Quitosana (Relação Estrutura-Propriedade)

Os parâmetros estruturais tais como GD e a massa molar afetam diretamente as propriedades biológicas, além das propriedades mecânicas como o alongação na ruptura e a resistência à tração, deste biopolímero [69]. Dash et al. reuniu alguns desses parâmetros e suas respectivas influências que estão apresentados na tabela AA1 [71].

Tabela AA1. Relação entre parâmetros estruturais e propriedades (Adaptado da ref [71]).

PROPRIEDADE	CARACTERÍSTICA ESTRUTURAL ^a
Físico-química	
Solubilidade	GD ↑ MM ↓
Cristalinidade	GD ↓ em valores GDs intermediários
Viscosidade	GD ↑ MM ↑
Biológica	
Biodegradabilidade	GD ↓ MM ↓
Biocompatibilidade	GD ↑
Mucoadesividade	GD ↑ MM ↑
Analgesia	GD ↑
Antimicrobiano	GD ↑ MM ↓

Aumento da permeação	GD ↑	MM ↓
Antioxidante	GD ↑	MM ↓
Hemostático	GD ↑	

^a ↑ - Diretamente proporcional à propriedade; ↓ inversamente proporcional à propriedade

Através do entendimento da versatilidade da quitosana através de seus parâmetros estruturais e da possibilidade de alteração estrutural (GD, MM e grupo funcional em quitosanas modificadas), este biopolímero pode ser utilizado ou modificado de forma a se obter materiais com características funcionais específicas ressaltadas. Dificilmente essa modulação anularia as outras tantas propriedades. A versatilidade da quitosana consiste em sua ampla funcionalidade, constando, portanto, como um material avançado e bastante sofisticado.