

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

LUIZ RICARDO FURLAN JUVENCIO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE
PVA/QUITOSANA/COLÁGENO VISANDO A APLICAÇÃO COMO CURATIVO
CUTÂNEO**

Sorocaba
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

LUIZ RICARDO FURLAN JUVENCIO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE
PVA/QUITOSANA/COLÁGENO VISANDO A APLICAÇÃO COMO CURATIVO
CUTÂNEO**

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

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida de
Rezende Duek

Co-orientador: Prof^º. Dr^º. Daniel Komatsu

Sorocaba
2017

Furlan Juvencio, Luiz Ricardo

Preparação e Caracterização de Filme de PVA/Quitosana/Colágeno
Visando a Aplicação como Curativo Cutâneo / Luiz Ricardo Furlan Juvencio.

-- 2017.

69 f. : 30 cm.

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

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca examinadora: Sônia Maria Malmonge, Walter Ruggeri Waldman

Bibliografia

1. Filme de PVA/Quitosana/Colágeno. 2. Curativo Cutâneo. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIZ RICARDO FURLAN JUVENCIO

**”PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE
PVA/QUITOSANA/COLÁGENO VISANDO A APLICAÇÃO COMO
CURATIVO CUTÂNEO”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Materiais Funcionais e Polímeros de Fontes Renováveis, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 28 de junho de 2017.

Orientador(a)



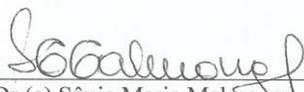
Prof. (a). Dr.(a) Eliana Aparecida de Rezende Duek
PUC – Pontifícia Universidade Católica, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof. (a) Dr. (a) Walter Ruggeri Waldman
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof. (a). Dr.(a) Sônia Maria Malmonge
UFABC – Universidade Federal do ABC, campus São Bernardo do Campo



Dedico este trabalho aos meus pais Valdir e Nadir e a todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram. Em especial a minha esposa Aline e minha querida filha Milena por representarem tanto em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Eliana Aparecida de Rezende Duek pela orientação, dedicação e apoio.

Ao Prof^º Dr^º Daniel Komatsu pela co-orientação, ajuda, dedicação e amizade.

À Prof^ª Dr^ª Marcia Adriana Tomaz Duarte pelas análises de DSC e TG no laboratório de materiais da UNISOCIESC.

Ao Prof^º Dr^º Domingos da Silva Leite pela análise antibiograma realizado no Laboratório de microbiologia da UNICAMP.

A todos do Laboratório Labiomat da PUC/SP Campus Sorocaba.

RESUMO

Uma das aplicações dos polímeros como biomateriais está fortemente associado ao tratamento de lesões da pele. Dentre os polímeros utilizados para esse fim o poli (álcool vinílico) (PVA) tem sido muito estudado devido às suas características de biocompatibilidade e atoxicidade, além da sua capacidade de processamento para a produção de hidrogéis, fibras, arcabouços e filmes. Além dos polímeros sintéticos, a utilização dos biopolímeros vem ganhando destaque e sendo atualmente bastante estudado. Dentre os biopolímeros destacam-se a quitosana que acelera a recuperação de lesões, estimula o sistema imunológico, fungistática e bacteriostática e o colágeno por sua forma de interação com os tecidos corpóreos e o favorecimento do crescimento celular. Com o objetivo de unir as características do PVA, quitosana e colágeno foram produzidos diferentes filmes: PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col. Estes foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) a qual indicou interação entre o PVA e a quitosana. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostrou que os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col apresentaram miscibilidade entre os materiais. A termogravimetria (TG) mostrou maior estabilidade térmica do PVA, após adição da quitosana. No teste de intumescimento os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col apresentaram um grau de intumescimento significativamente maior do que o filme de PVA. O ensaio de permeação de vapor de água mostrou que o filme de PVA apresentou o maior coeficiente de permeabilidade. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) não foi observado separação de fases entre os seus componentes. E, por fim, a análise antibiograma dos filmes não apresentou ação inibidora das bactérias analisadas. Portanto as características apresentadas estimulam a continuidade dos estudos para a aplicação do filme de PVA/Quit/Col na engenharia tecidual.

Palavras-chave: Curativo Cutâneo, PVA, Quitosana, Colágeno.

ABSTRACT

One of strong associations between polymers as biomaterials are in field of skin reparation. Polymers are utilized for this purpose, some such as poly (vynil alcohol) (PVA) are used due to characteristics such as biocompatibility, non-toxicity, in addition to their ability of processing for hydrogels, fibers, scaffolds and thin films. Beside synthetic polymers, utilization of biopolymers are growing and being developed. In biopolymers, chitosan stands out due the capability of hurry the wound regeneration, immunological stimulation, fungi and bacteria static action and the collagen due the interaction with body tissues and support to cell growth. With the objective to attach the properties of PVA, chitosan and collagen, three different types of films was made: PVA, PVA/Quit and PVA/Quit/Col. These films was characterized by Fourier Transform Infra-Red (FTIR) that indicates interactions between PVA and chitosan. Differential Scanning Calorimetry (DSC) showed the PVA/Quit and PVA/Quit/Col films have miscibility between the components. Thermogravimetric Analysis (TG) showed higher thermos stability of PVA after the addition of chitosan. Sweeling tests have demonstrated the films PVA/Quit and PVA/Quit/Col had higher swelling degrees than PVA. Water Vapor Permeation showed that PVA films have more permeability. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that does not have separation between components. By the end, antibiogram analysis does not showed inhibition of bacterial activity. Therefore, the characteristics presented in this work stimulates the searching of results and applications of PVA/Quit/Col films in tissue engineering.

Key words: Cutaneous Dressing, PVA, Chitosan, Collagen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos específicos	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	PELE	15
2.2	POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) – PVA	17
2.3	QUITOSANA	20
2.4	COLÁGENO	23
2.5	CRIORETICULAÇÃO	26
2.6	PVA, QUITOSANA E COLÁGENO NA ENGENHARIA TECIDUAL	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS	30
3.2	MÉTODOS	30
3.2.1	Preparação do filme de PVA	30
3.2.2	Preparação do filme de PVA/Quit	31
3.2.3	Preparação do filme PVA/Quit/Col	31
3.2.4	Liofilização dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col	32
3.2.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
3.2.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	33

3.2.7	Termogravimetria (TG).....	34
3.2.8	Grau de intumescimento.....	35
3.2.9	Permeação de vapor de água.....	35
3.2.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
3.2.11	Análise antibiograma	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	39
4.2	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	43
4.3	TERMOGRAVIMETRIA (TG)	47
4.4	GRAU DE INTUMESCIMENTO	49
4.5	PERMEAÇÃO DE VAPOR DE ÁGUA	52
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	55
4.7	ANÁLISE ANTIBIOGRAMA	57
5	CONCLUSÕES	59
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE - A.....	67

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais são definidos como qualquer substância ou combinação de substâncias, excluindo-se os medicamentos, de origem sintética ou natural, idealizado para ser utilizado por qualquer período de tempo, que possa aumentar ou substituir parcialmente ou integralmente qualquer tecido, órgão ou função do organismo humano, buscando melhorar ou, pelo menos, manter a qualidade de vida do paciente (HORN, 2008; RASIA, 2014).

A busca pelo aperfeiçoamento desses materiais é uma preocupação constante para a engenharia tecidual, que procura desenvolver materiais que possam reparar ossos danificados ou perdidos por lesões, traumas, doenças ou envelhecimento (PON-ON *et al.*, 2014), que auxiliem no tratamento de ferimentos de pele (FAN *et al.*, 2016; NETO, 2013) e possam também substituir partes de órgãos e tecidos de organismos vivos em função de acidentes ou tratamentos das mais diversas enfermidades (COSTA JR.; MANSUR, 2008). Trata-se, portanto, de uma área multidisciplinar composta pela atuação de diversos profissionais ligados as áreas da ciência dos materiais, medicina, biologia e engenharia, apresentando desde o seu início constantes evoluções e inovações (RATNER; BRYANT, 2004).

Os ferimentos de pele são considerados porta de entrada para corpos estranhos, os quais podem causar infecções levando ao óbito em casos mais graves. Segundo dados internacionais, as lesões por queimadura representam a terceira causa de morte acidental no mundo. No Brasil o valor gasto mensalmente para o tratamento das vítimas chega a um milhão de reais, pacientes internados custam, em média, por dia, R\$650,00, chegando a R\$1620,00 para aqueles que falecem. Estima-se que 1.000.000 de pessoas são vítimas de queimaduras por ano, das quais apenas 10% procuram atendimento médico-hospitalar. As maiores vítimas são crianças e embora os idosos representem apenas 10% dos casos, apresentam a maior taxa de

letalidade (GERVASI; TIBOLA; SCHENEIDER, 2014; POLYANA ALVES *et al.*, 2015; REMPEL; TIZZOT; VASCO, 2011).

A cicatrização dos ferimentos cutâneos tem sido favorecida pela utilização de diversos biopolímeros, como a quitosana e o colágeno (COSTA JR.; MANSUR, 2008; HORN, 2008; JODAR, 2014; NETO, 2013; RASIA, 2014), descritos como polímeros sintetizados quimicamente, mas que derivam de materiais biológicos iniciais, como açúcares, aminoácidos e óleos ou gorduras naturais, e polímeros produzidos pelos sistemas biológicos, como animais, plantas e microrganismos (JODAR, 2014).

Dentre os biomateriais mais utilizados, destacam-se: o poli (álcool vinílico) (PVA), apresentando boa resistência química, biocompatibilidade, atoxicidade e consistência macia quando produzido na forma de filme (SANTOS; SILVA; LEITE, 2016); a quitosana, por suas propriedades de acelerar a recuperação de lesões, estimular a ação do sistema imunológico, também apresenta biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser bacteriostática e fungistática (COSTA JR.; MANSUR, 2008); e o colágeno que tem como principal característica a sua forma de interação com os tecidos corpóreos, sua habilidade em favorecer o crescimento celular bem como, baixa toxicidade e resposta imunológica (HORN, 2008).

O método de crioreticulação é considerado o melhor método para a reticulação do PVA quando utilizado na engenharia tecidual. Trata-se de um processo físico que consiste em ciclos de congelamento/descongelamento. Este método oferece várias vantagens quando comparado a outros, como a reticulação química e a reticulação induzida por radiação (RICCIARDI *et al.*, 2004).

As propriedades apresentadas pelos biomateriais poli (álcool vinílico), quitosana e colágeno quando estes são utilizados na engenharia tecidual, mais especificamente na recuperação de lesões de pele, foram determinantes na escolha desses materiais para a produção

de um novo filme de PVA/Quit/Col pelo método de crioreticulação visando sua aplicação como curativo cutâneo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi preparar e caracterizar filmes compostos por poli (álcool vinílico), quitosana e colágeno visando a aplicação como curativo cutâneo.

1.1.2 Objetivos específicos

Preparar filme através da solubilização do PVA, quitosana e colágeno em uma única solução, seguida do método de crioreticulação para seu potencial uso como curativo cutâneo.

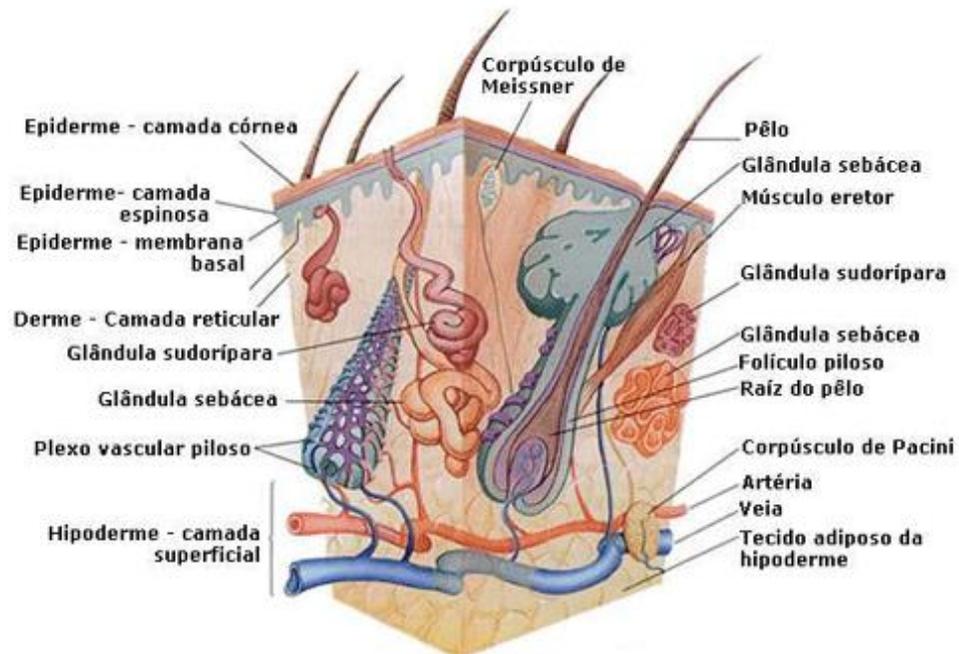
Caracterizar o filme obtido pelas técnicas de espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), intumescimento, ensaio de permeação de vapor de água, termogravimetria (TG) e análise antibiograma.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do nosso corpo e atua como barreira protetora contra agentes externos principalmente devido a sua densa camada córnea (FAN *et al.*, 2016). A pele, Fig. 1, constitui aproximadamente 16% (m/m) do peso corporal e tem por volta de 1,7m². Sua espessura pode variar entre 0,05 a 6mm dependendo do local do corpo, sua espessura é maior em regiões de constantes atritos e pressões e por ela circula um terço de todo volume sanguíneo. Sendo um dos órgãos mais ativo, a pele exerce várias funções, como barreira protetiva e perceptiva, secreção e excreção, hemorregulação e termorregulação, metabolização, formação da vitamina D, além de proteger o organismo dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (JODAR, 2014; NETO, 2013).

Figura 1. Estrutura da pele humana.



A constituição da pele é dividida em três camadas interdependentes, a hipoderme ou tecido subcutâneo (camada mais interna), a derme (camada intermediária) e a epiderme (camada mais externa) (NETO, 2013).

A epiderme, a mais complexa das camadas, atua principalmente como uma barreira protetora contra o ambiente externo, sua estrutura é composta por quatro camadas celulares: camada córnea, constituída por proteínas fibrosas resistentes e queratina, células mortas e anucleadas que previnem a perda de fluídos corpóreos; a camada granulosa tem como principal característica a presença dos grânulos de queratato-hialina, que participam da queratinização da epiderme, constituída ainda por células escuras e achatadas; camada espinhosa ou malpighiana, constituída por células com conformação poliédrica que se achatam até a epiderme, proporcionando resistência ao atrito devido as suas características; e a camada germinativa ou basal formada por células basais, que apresentam uma intensa atividade mitótica, originando às demais células epidérmicas e os melanócitos e queratinócitos, responsáveis pela produção de melanina e proteção contra a radiação ultravioleta (JODAR, 2014; NETO, 2013).

A derme, não possui organização regular como a epiderme sendo a principal responsável pela defesa imunológica, suporte da rede vascular e a termorregulação, por apresentar um tecido elástico e resistente, proporciona uma resistência física às agressões mecânicas ao corpo. Esta camada é composta por um sistema integrado de estruturas filamentosas, fibrosas e amorfas, onde estão acomodados nervos, anexos epidérmicos, vasos sanguíneos e linfáticos. Células dendríticas, histiócitos, mastócitos e fibroblastos, essenciais ao processo de cicatrização por sintetizarem e secretarem o colágeno e a elastina, também estão presentes. A derme apresenta uma espessura variável de no máximo 3 mm na parte inferior dos pés e pode ser dividida em três partes: zona adventicial; zona reticular ou profunda; e zona papilar ou superficial. A interação da epiderme com a derme é primordial na manutenção dos dois tecidos (JODAR, 2014; NETO, 2013).

A hipoderme exerce a função de modeladora do corpo, proporciona a mobilidade da pele em relação às estruturas adjacentes, atua como isolante térmico e reservatório de calor, além de proteger o organismo de pressões e traumas. Outra importante atribuição é a de órgão endócrino, liberando vários peptídeos bioativos, chamados de adipocinas, que além de influenciar as funções dos próprios adipócitos, influenciam outras vias metabólicas por meio da corrente sanguínea. A hipoderme também apresenta espessura variável e é composta pelos lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos linfáticos, sanguíneos e nervos (JODAR, 2014; NETO, 2013).

Os traumatismos agudos produzidos à pele podem levar a uma perda da sua função orgânica, tornando o organismo suscetível a infecções, desregulação térmica e perda de fluídos. Devido as funções vitais da pele como barreira química, física e bacteriana o processo de cicatrização é de fundamental importância para a sobrevivência. O processo de cicatrização é complexo e depende de um grande número de células e mediadores que interagem em uma sequência altamente sofisticada. Suas principais etapas são a inflamação, proliferação, epitelização, angiogênese, remodelação e cicatrização (SORG *et al.*, 2017). As etapas de cicatrização são favorecidas por curativos que produzem um ambiente úmido em torno do ferimento e a absorção dos exsudatos de sua superfície (KIM *et al.*, 2017).

2.2 POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) – PVA

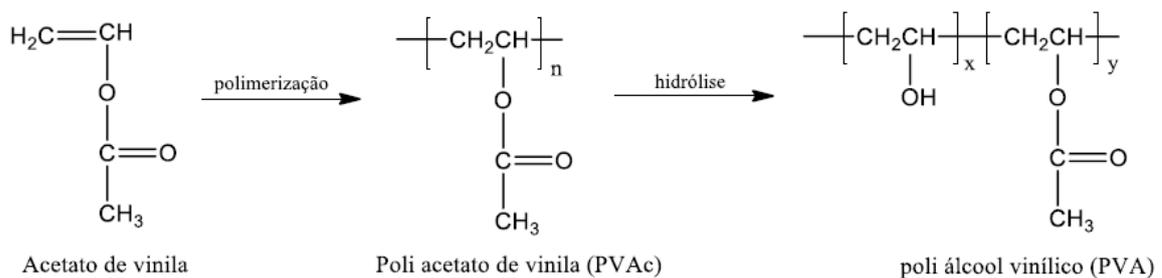
O PVA é um polímero sintético, semicristalino, termoplástico, atóxico, não iônico, biocompatível, com ótima processabilidade e propriedades para a formação de hidrogéis, fibras, filmes e arcabouços (COSTA JR.; MANSUR, 2008; FAN *et al.*, 2016; HONG, 2007; KANIMOZHI; KHALEEL BASHA; SUGANTHA KUMARI, 2016; PON-ON *et al.*, 2014;

RASIA, 2014; SANTOS; SILVA; LEITE, 2016). Apresenta também, propriedades elásticas, resistência térmica, química e mecânica (JODAR, 2014; RASIA, 2014).

A produção do PVA ocorre através da polimerização do monômero acetato de vinila para poli (acetato de vinila) (PVAc), seguido pela hidrólise dos grupos acetato formando uma cadeia polimérica com grupos hidroxilas pendentes, Fig. 2. Entretanto, a reação de hidrólise não é completa, formando, conseqüentemente, polímeros com diferentes graus de hidrólise dependendo da extensão da reação (JODAR, 2014; RASIA, 2014).

O PVA é um polímero solúvel em solventes hidrófilos e altamente polares, como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetamida, glicóis e principalmente em água. O grau de hidrólise, quantidade de grupos acetato no polímero e o grau de polimerização são fatores determinantes para as propriedades químicas, cristalinidade e a solubilidade desse polímero, que também é influenciada pela alteração da temperatura. A distribuição da massa molar é outro fator importante para as características do poli (álcool vinílico), afetando a difusibilidade, cristalinidade, adesão e força mecânica (JODAR, 2014; RASIA, 2014).

Figura 2. Reações para a obtenção do PVA.



Fonte: (JODAR, 2014).

O PVA é um dos polímeros sintéticos com maior versatilidade e pode ser utilizado de forma isolada ou associado a outros polímeros e materiais, em diferentes áreas e para os mais diversos fins. Destaca-se sua utilização para a produção de cartilagens e discos intervertebrais

artificiais, lentes de contato, cateteres, pele e pâncreas artificiais, membranas de diálise. Além disso, também é utilizado na forma de géis, hidrogéis e filmes para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e na produção de arcabouços para aplicações na engenharia de tecido ósseo (JODAR, 2014; PON-ON *et al.*, 2014). Além das aplicações anteriormente mencionadas, há também, um interesse crescente na utilização do PVA em curativos cutâneos, associados a outros materiais como a prata (HONG, 2007; MANSBRIDGE, 1998; SURUDŽIĆ *et al.*, 2016), quitosana (COSTA JR.; MANSUR, 2008; SANTOS; SILVA; LEITE, 2016) e dextrana com sulfadiazina de prata (JODAR, 2014).

Características como a grande capacidade de absorção de água e intumescimento em fluídos corpóreos e água, biocompatibilidade, mínima adesão celular, absorção de proteínas, consistência macia na forma de filmes, flexibilidade e elasticidade, demonstram sua capacidade de simular tecidos orgânicos e são de grande importância para a utilização desse polímero para aplicação como curativo cutâneo (COSTA JR.; MANSUR, 2008; JODAR, 2014; RASIA, 2014).

Dentre inúmeros trabalhos que usaram o PVA para o tratamento de ferimentos de pele Sung *et al.*, 2010 relataram o uso desse polímero na produção de hidrogéis associado a quitosana e a quitosana com o fármaco minociclina, ambos obtidos através de ciclos repetidos de congelamento/descongelamento – crioreticulação. Esses hidrogéis quando analisados *in vivo*, promoveram uma redução de até 90% no tamanho da ferida no dorso de ratos machos SD após 15 dias, valor significativamente maior quando comparado ao controle de gaze estéril e ao produto comercial MedifoamTM. O uso do hidrogel composto por 5% de PVA, 0,75% de quitosana e 0,25% do fármaco apresentou uma cicatrização melhorada em comparação aos demais curativos utilizados, sendo a cicatrização favorecida por um ambiente úmido em torno da ferida e a absorção do exsudado da sua superfície resultado das características do PVA (SUNG *et al.*, 2010).

2.3 QUITOSANA

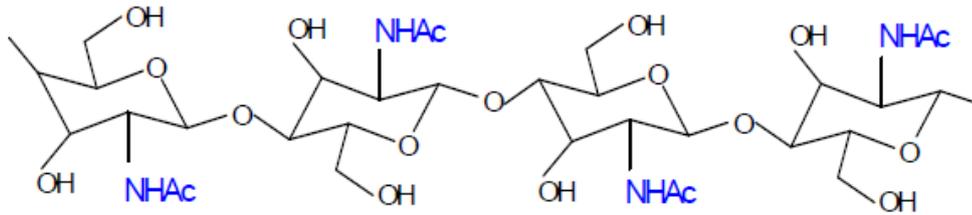
A quitosana, um polímero natural, utilizada como um biomaterial devido as suas variadas características, das quais se destacam: biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, propriedades curativas, antimicrobianas e hemostáticas, potencialidade na formação de complexos com polieletrólitos como as proteínas e polímeros e é suscetível a modificações químicas. Pode ser utilizada para a formação de géis, esponjas, filmes e soluções (HORN, 2008; NETO, 2013).

Composta por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e por 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose a quitosana é um heteropolissacarídeo, encontrado na natureza na parede celular de algumas espécies de fungos, porém, sua principal fonte de obtenção é através da desacetilação alcalina da quitina, encontrada no exoesqueleto de artrópodes como os insetos, na concha de crustáceos como o caranguejo, camarão e a lagosta, e na cutícula dos moluscos e anelídeos. A quitina apresenta até três formas diferentes de arranjo de suas cadeias, antiparalela, paralela e alternada, é o segundo polímero de maior abundância, apresenta uma estrutura linear formada por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4). Verifica-se no carbono 2 o grupo acetamida, conforme estrutura, Fig. 3, é muito similar com a da celulose, Fig. 4, o polímero mais abundante, onde encontramos o grupo hidroxila no lugar do grupo acetamida. Essa semelhança ocorre provavelmente devido os dois materiais exercerem a função de sustentação nos organismos dos quais fazem parte (COSTA JR.; MANSUR, 2008; RAVI KUMAR, 2000).

A desacetilação parcial da quitina, na obtenção da quitosana acontece em fases. A primeira consiste em solubilizar minerais como o fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e o carbonato de cálcio (CaCO_3) em ácido clorídrico (HCl). Na segunda, uma solução diluída de hidróxido de sódio (NaOH) remove as proteínas, esta solução é lavada e seca, e obtêm-se um material em

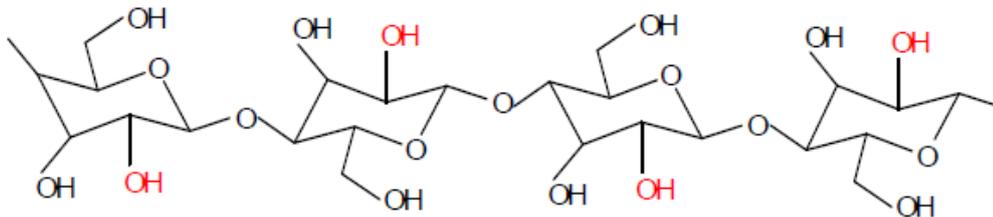
flocos. Por último o material obtido na segunda etapa é aquecido em uma solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH), provocando a hidrólise dos grupos *N*-acetil sendo às vezes necessário a remoção de pigmentos com o uso de solventes orgânicos (HORN, 2008).

Figura 3. Representação da estrutura da quitina.



Fonte: (HORN, 2008) – adaptada.

Figura 4. Representação da estrutura da celulose.



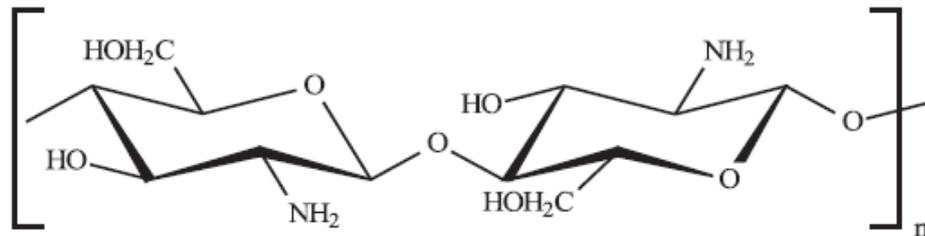
Fonte: (HORN, 2008) – adaptada.

As propriedades químicas e físicas da quitosana, Fig. 5, estão associados a distribuição da massa molar, a estrutura da cadeia que se define pela sequência das unidades monoméricas e a composição química, além do grau de acetilação. A solubilidade depende da quantidade dos grupos *N*-acetil e ocorre apenas em soluções ácidas, no qual os grupos amino são protonados (HORN, 2008).

Na engenharia tecidual a quitosana possui atividades biológicas que aceleram a recuperação de lesões, estimulam os efeitos do sistema imunológico, além de atuar como um composto bacteriostático e fungistático, inibindo a proliferação dos microrganismos através da formação de uma ligação entre os grupos amínicos protonados e os microrganismos,

ocasionando uma aglutinação das células microbianas, propriedades muito desejáveis no tratamento de ferimentos de pele (ALEMDAROĞLU *et al.*, 2006; BANO *et al.*, 2017; KEONG; HALIM, 2009).

Figura 5. Representação da estrutura da quitosana, n é o grau de polimerização.



Fonte: (ASSIS; VALMIR L. DA, 2003) – adaptada.

Para avaliar a capacidade da quitosana em acelerar a cicatrização de ferimentos cutâneos Ueno *et al.* 1999 trataram os ferimentos provocados no dorso de cães beagles com quitosana durante 15 dias e os compararam com um controle, no qual não houve nenhuma intervenção. Após 3 dias os ferimentos tratados com quitosana apresentaram uma maior infiltração de células polimorfonucleares (PMN) ativando a migração de células inflamatórias e macrófagos para a área do ferimento. Com 6 dias de tratamento o grupo tratado com quitosana apresentou um aumento significativo nas células mitóticas e na produção de fibroblastos de matriz extracelular. As análises com 9 dias de tratamento demonstraram um aumento significativamente maior na profundidade da camada de colágeno, identificado como do tipo III, no tecido de granulação e também um aumento no fornecimento de oxigênio e vitamina C que são necessários para a hidroxilação de resíduos de prolina e lisina na formação do procolágeno. Os resultados demonstram que a quitosana é capaz de acelerar a recuperação de ferimentos cutâneos (UENO *et al.*, 1999).

2.4 COLÁGENO

O colágeno, termo usado para dar nome a uma família de 27 proteínas animais isoformas é o composto mais abundante dos tecidos conjuntivos, como os dentes, tendões, ossos, cartilagens, veias, músculos e pele. Suas propriedades como biomaterial estão fortemente associadas à sua forma de interação com os tecidos do corpo, fornecendo resistência, elasticidade e contribuindo para a integridade das estruturas anatômicas das quais faz parte. Esse biopolímero possui características atóxicas, baixa resposta imunológica, além de favorecer o crescimento celular, apresenta aplicações bem-sucedidas como veículo para proteínas, genes e fármacos e como substituto de ligamentos, vasos sanguíneos e pele humana (DA SILVA; PENNA, 2012; RUSZCZAK, 2003).

As fibras de colágeno começam a se formar, principalmente, durante o desenvolvimento do tecido embrionário e durante o preparo da regeneração. Estas fibras contém cadeias peptídicas de aminoácidos como a lisina, glicina, prolina, hidroxiprolina, hidroxilisina e alanina. As fibras de colágeno, são essas cadeias organizadas de forma paralela a um eixo, o que proporciona a resistência e elasticidade as estruturas, mencionada anteriormente. A molécula de colágeno com massa molar de 300.000 Dalton e comprimento de 280nm, se estabiliza através de ligações intermoleculares como a ligação de hidrogênio. O colágeno apresenta uma sequência de aminoácidos na forma de uma unidade tripeptídica, glicina-X-hidroxiprolina ou glicina-X-prolina, o X representa um dos 20 aminoácidos padrão. Em cada uma de suas moléculas o colágeno pode apresentar até três cadeias diferentes que unidas produzirão o procolágeno (DA SILVA; PENNA, 2012; HORN, 2008).

O procolágeno apresenta em suas extremidades duas estruturas globulares de peptídeos com carbono (C-) e nitrogênio (N-) terminais. Após ser secretado na matriz celular o procolágeno, através da ação das enzimas C- e N- peptidases passa por um processo de clivagem

das duas estruturas globulares ligadas as suas extremidades, formando o tropocolágeno, que apresenta forma helicoidal e se enrola uns aos outros gerando a hélice tripla (DA SILVA; PENNA, 2012; HORN, 2008).

A união de moléculas de tropocolágeno pela forma de conformação torsa através de associações lado a lado, que se estabilizam por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, formam as fibrilas. Na união das fibrilas aparecem ligações cruzadas covalentes intermoleculares, formadas por ligações peptídicas que promovem a interação entre os grupos aminos livres e os grupos aldeídos, e são essas ligações cruzadas que propiciam a força tensora e a estabilidade para as fibrilas.

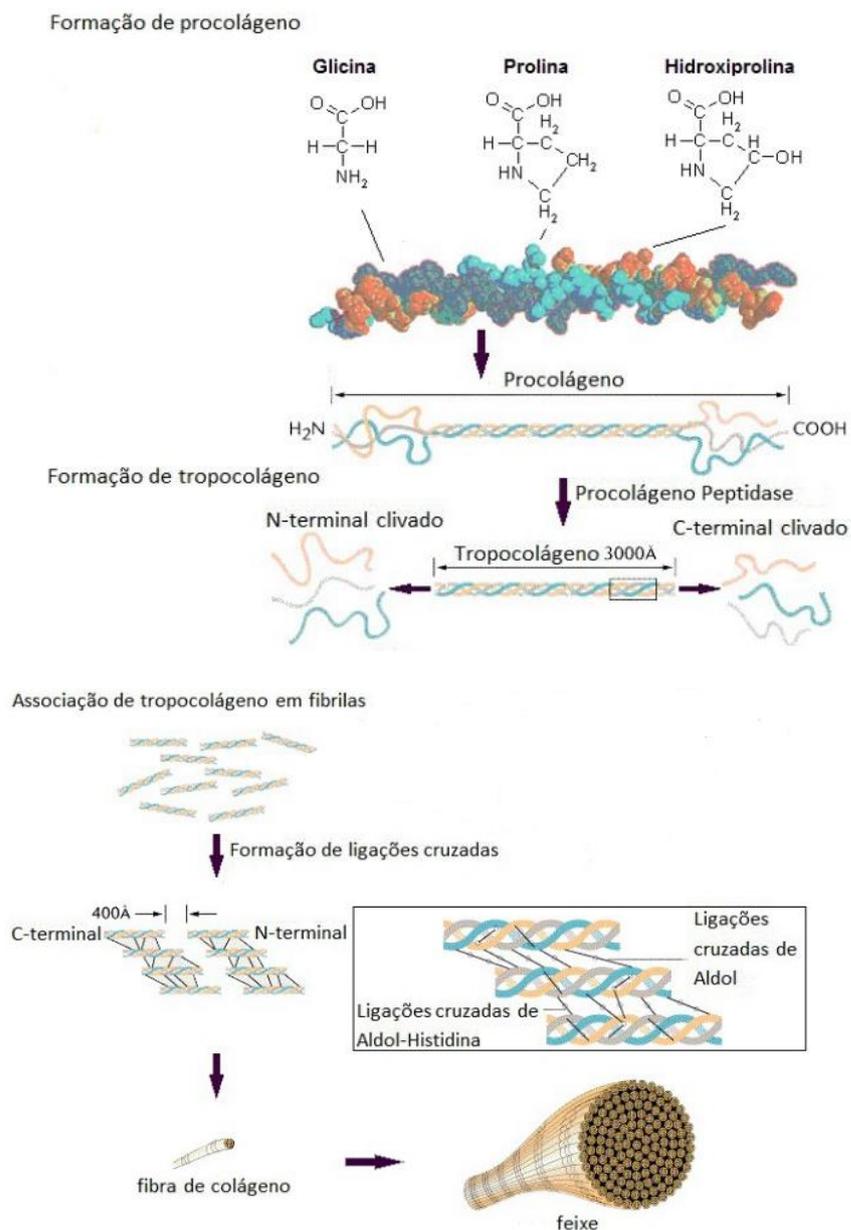
As fibras de colágeno são formadas através da união de um conjunto de fibrilas, estas fibras também se organizam e formam os feixes, Fig. 6 (DA SILVA; PENNA, 2012; HORN, 2008).

O colágeno pode ser extraído dos tecidos de várias espécies de animais, como os peixes, suínos e bovinos, através de tratamentos químicos e térmicos. No Brasil é obtido, principalmente, de subprodutos da indústria da carne, como resíduos do tecido subcutâneo e derme (DA SILVA; PENNA, 2012).

Quando havia poucos dados objetivos e quantitativos disponíveis sobre a capacidade dos biomateriais em reduzir a contração e o tempo de cicatrização de ferimentos cutâneos Leipziger *et al.* 1985 estudaram a utilização de dois curativos poliméricos oclusivos, poliuretano permeável a O₂ (PUF) e hidrocolóide impermeável a O₂ (HCD), e um curativo de matriz de colágeno no tratamento de um total de 96 ferimentos provocados em 16 suínos domésticos, os ferimentos do grupo controle não foram submetidos a nenhum tratamento. Os estudos demonstraram que os curativos PUF e HCD aumentaram a taxa de reparação dérmica, mas não melhoraram a contração do ferimento quando comparado ao grupo controle. Os ferimentos tratados com a matriz de colágeno apresentaram uma maior taxa de reparação dérmica em

relação ao controle e o mais importante reduziu significativamente a contração do ferimento em relação a todos os grupos. A matriz de colágeno foi degradada ao longo do processo de cicatrização (LEIPZIGER *et al.*, 1985). A sequência de resposta celular, absorção e remodelação dessa matriz de colágeno é idêntica ao mecanismo de cicatrização dos ferimentos cutâneos (PACHENCE, 1996).

Figura 6. Representação do processo de formação do colágeno.



Fonte: (DA SILVA; PENNA, 2012) – adaptada.

2.5 CRIORETICULAÇÃO

Diferentes métodos de reticulação podem ser realizados na obtenção de curativos cutâneos poliméricos, dos quais se deseja alcançar propriedades que possam manter úmido o local do ferimento evitando o seu ressecamento, absorver o exsudato, proteger contra a infecção lateral, minimizar a necrose, estimular a cicatrização e principalmente apresentar boa biocompatibilidade e não ser tóxico (KAMOUN *et al.*, 2015).

A reticulação do PVA pode ser realizada principalmente por reticulação química utilizando, por exemplo, glutaraldeído (PEPPAS; HANSEN, 1982), hexametileno diisocianato (KRUMOVA *et al.*, 2000), reticulação induzida por radiação gama (EL SALMAWI, 2007; PARK; NHO, 2003) ou ainda reticulação física que consiste na repetição de ciclos de congelamento e descongelamento, processo denominado crioreticulação (HASSAN; PEPPAS, 2000a).

O melhor método utilizado para a reticulação do PVA quando este polímero é utilizado na engenharia tecidual é a crioreticulação (RICCIARDI *et al.*, 2004). A reticulação química pode conter agentes químicos tóxicos, afetar a natureza das substâncias associadas com o PVA (KAMOUN *et al.*, 2015) e ainda estarem sujeitos ao processo de lixiviação (HASSAN; PEPPAS, 2000b).

Hassan e Peppas 2000b prepararam hidrogéis de PVA variando os seguintes parâmetros: concentração das soluções aquosas, número dos ciclos de congelamento e descongelamento e a massa molar do PVA. Suas análises mostraram a existência de uma relação direta entre o aumento no número de ciclos de congelamento e descongelamento com o grau da reticulação física, o aumento de ciclos também serviu para reforçar os cristais existentes dentro da estrutura. Amostras submetidas a menos ciclos apresentaram um maior grau de intumescimento. O aumento da concentração das soluções de PVA resultaram em um aumento no grau de

crystalinidade e na estabilidade em relação ao intumescimento. E por último, um aumento na massa molar do PVA produziu cristais com espessuras maiores e um alargamento da distribuição do tamanho do cristal consequência do aumento da cadeia do PVA.

2.6 PVA, QUITOSANA E COLÁGENO NA ENGENHARIA TECIDUAL

Na literatura é possível encontrar muitos trabalhos que relatam a associação do poli (álcool vinílico) com a quitosana para aplicação biomédica. Visando aplicação no tratamento de ferimentos cutâneos Costa-Júnior *et al.* 2009 relataram a síntese, caracterização e análise de biocompatibilidade de filmes não reticulados e reticulados quimicamente com diferentes proporções de PVA e quitosana para um prospectivo uso na engenharia tecidual. Os resultados da viabilidade celular, determinado pelo ensaio MTT, demonstraram que todas as matrizes de PVA/quitosana, reticuladas quimicamente ou não, apresentavam boa biocompatibilidade. As matrizes de PVA/quitosana foram ainda semeadas com células VERO que também apresentaram boa adesão, morfologia e propagação. As células VERO espalharam-se regularmente pelas matrizes comprovando além da biocompatibilidade a não citotoxicidade das amostras (DE SOUZA COSTA-JÚNIOR; PEREIRA; MANSUR, 2009).

Outro trabalho também associou o uso do PVA com a quitosana e PVA, quitosana e o fármaco minociclina visando sua aplicação no tratamento de ferimentos de pele. O trabalho desenvolvido por Sung *et al.* 2010 tratou ferimentos no dorso de ratos SD com hidrogéis reticulados por ciclos repetidos de congelamento/descongelamento. Esses hidrogéis promoveram uma redução no tamanho do ferimento em até 90% após 15 dias de uso, valor significativamente maior que o controle. O hidrogel composto por PVA, quitosana e fármaco apresentou cicatrização com aspecto melhorado quando comparado aos demais curativos. Esta cicatrização melhorada foi atribuída às características dos hidrogéis utilizados pois foram

capazes de desenvolver um ambiente úmido e absorver o exsudado da superfície do ferimento (SUNG *et al.*, 2010).

Depois de produzir nanofibras pelo processo *eletrospinning* a partir de soluções de colágeno puro, PVA/quitosana e PVA/quitosana/colágeno Lin *et al.*, 2013 avaliaram essas matrizes nanofibrosas quanto ao seu potencial uso como substituto de pele. Após lavados e expostos a luz UV discos de cada uma das matrizes foram semeados com células de fibroblastos com o tempo de cultura de 10 dias. As análises demonstraram que as células aderiram, infiltraram e se proliferaram nas três superfícies nanofibrosas e a maioria das células tinham forma fusiforme típica do fibroblasto após o quarto dia. O crescimento do fibroblasto foi significativamente maior para a matriz de PVA/colágeno entre os dias 4 e 7, mas após 10 dias o número de células nas três matrizes era semelhante. A ligação celular e a proliferação na superfície dependem da topografia e da absorção de proteínas séricas, que por sua vez dependem da carga superficial, da composição e da humidade (LIN *et al.*, 2013). As superfícies com características microscópicas mais finas e maior rigidez são consideradas mais favoráveis para a ligação e proliferação celular. Todas as três matrizes do estudo apresentaram topografia similar. A matriz de PVA/Colágeno obteve o maior intumescimento e demonstrou uma adsorção de proteína sérica melhorada em sua superfície, promovendo maior crescimento celular durante os primeiros sete dias. Após 10 dias as células haviam coberto a maioria das superfícies das matrizes atenuando o crescimento devido à inibição do contato, portanto nesse momento a quantidade de células das três superfícies eram semelhantes. Os autores concluíram afirmando que as características apresentadas pelas matrizes nanofibrosas permitiram o uso destas para a recuperação da pele e tecidos (LIN *et al.*, 2013).

Peng *et al.*, 2011 prepararam hidrogéis a partir de soluções de PVA e colágeno através do processo de liofilização. Para verificar a segurança biológica do hidrogel foram avaliados a viabilidade e o crescimento celular pelo ensaio MTT e o teste de Alamar Blue, o teste de

micronúcleos foi utilizado para verificar a genotoxicidade e o teste de sensibilidade para detectar a resposta alérgica a pele. Os resultados não demonstraram citotoxicidade significativa contra as células de fibroblastos, a frequência dos micronúcleos não apontou efeitos genotóxicos e, também, não foi observado resposta alérgica na aplicação a longo prazo. Esses resultados sugerem que o hidrogel de PVA/colágeno tem potencial para ser usado na engenharia tecidual (PENG; SHEN, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: poli (álcool vinílico) 99+% hidrolisado com massa molar (M_w) 85,0-124,0.10³g/mol (Sigma-Aldrich), quitosana em pó (Polymar), ácido acético glacial P. A. (Ecibra), colágeno com concentração de 6mg/mL (Sigma-Aldrich), ágar de Mueller Hinton, solução salina estéril de NaCl - 0,85%, pentóxido de fósforo (Sigma-Aldrich), água destilada e ultra purificada. Também foram utilizadas as culturas *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, e os agentes antimicrobianos Tobramicina 10µg e Ampicilina 10µg. Todos os materiais utilizados não passaram por processos de purificação adicionais.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação do filme de PVA

O filme de PVA, Fig. 7A, foi preparado pela adição de 3,2g de PVA à 40mL de água ultra purificada com temperatura de 80°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e sob agitação magnética sendo que a adição do PVA ocorreu em duas etapas, onde a segunda parte do material só foi adicionada após a total solubilização da primeira. A temperatura e a agitação magnética foram mantidas até a obtenção de uma mistura homogênea. A solução resultante foi vertida em duas placas de Petri e levadas ao *freezer* com temperatura de -15°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) para o processo de congelamento *overnight* e posterior descongelamento de 8 horas. Repetiu-se este procedimento mais uma vez. Os dois

processos de congelamento-descongelamento foram realizados para a crioreticulação do material.

3.2.2 Preparação do filme de PVA/Quit

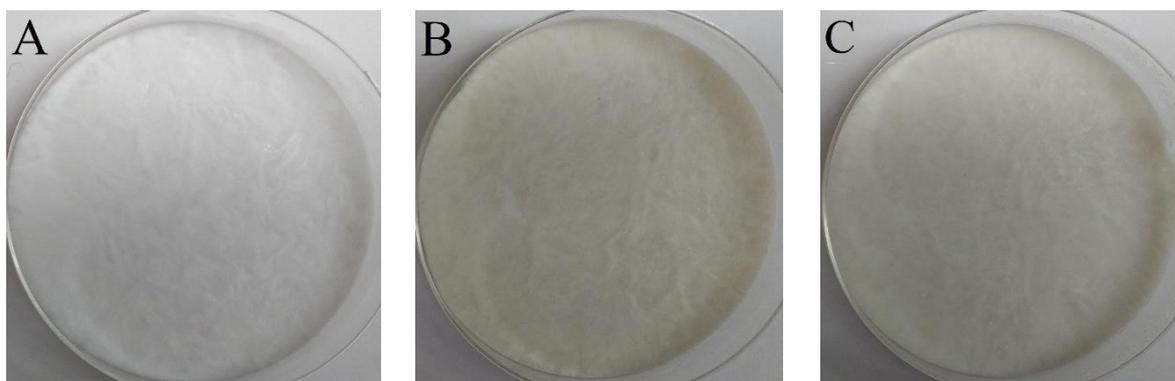
O filme de PVA/Quit, Fig. 7B, foi obtido através da solubilização do PVA e da quitosana em uma mesma solução. Inicialmente foram adicionados à 40mL de água ultra purificada 0,4mL de ácido acético glacial (1% v/v), não se obteve êxito na solubilização da quitosana em soluções com concentrações menores de 1% v/v de ácido acético. Então a solução foi aquecida a uma temperatura de 80°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e sob constante agitação magnética adicionou-se a quantidade de 0,32g de quitosana (10% m/m em relação ao PVA). Após a completa solubilização da quitosana foram adicionados em duas etapas, 3,2g de PVA (8% m/v) à essa solução que foi agitada até a completa solubilização do PVA. A solução resultante também foi vertida em duas placas de Petri e levadas ao *freezer* com temperatura de -15°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) para o processo de congelamento *overnight* e posterior descongelamento de 8 horas. Repetiu-se este procedimento mais uma vez. Os dois processos de congelamento-descongelamento foram realizados para a crioreticulação do material.

3.2.3 Preparação do filme PVA/Quit/Col

O filme de PVA/Quit/Col, Fig. 7C, foi obtido através da solubilização do PVA, quitosana e colágeno em uma mesma solução. O volume de água ultra purificada, as concentrações de ácido acético, quitosana e PVA, a temperatura da solução e o método de preparo foram os mesmos utilizados na preparação da solução para a obtenção do filme de PVA/Quit. Adicionalmente, à solução de PVA e quitosana com temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) foram

acrescentados 24mg de colágeno (7,5% m/m em relação a quitosana) mantendo a agitação magnética por mais 20 minutos. A solução resultante também foi vertida em duas placas de Petri e passou pelos mesmos processos para a crioreticulação que as soluções utilizadas no preparo dos filmes de PVA e PVA/Quit.

Figura 7. (A) filme de PVA; (B) filme de PVA/Quit e (C) filme de PVA/Quit/Col.



3.2.4 Liofilização dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col

O processo de liofilização foi realizado em um equipamento modelo K105 da marca Liotop.

As placas de Petri com os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col ainda congelados, foram submetidas ao processo de liofilização por 72 horas.

A liofilização, também denominada de criosecagem ou criodesidratação, é um processo de secagem que ocorre pela sublimação dos solventes, principalmente a água. Este processo ocorre em três etapas: congelamento inicial, secagem primária e secundária, e sob condições especiais de baixa temperatura e pressão (TERRONI *et al.*, 2013).

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

A técnica de FTIR é amplamente utilizada para a caracterização de polímeros, identificando grupos específicos do material e possíveis interações entre eles.

Para a caracterização do colágeno, quitosana e os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col liofilizados, a técnica de FTIR foi realizada na região média (MIR), entre 400 e 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans (KANIMOZHI; KHALEEL BASHA; SUGANTHA KUMARI, 2016).

Os espectros de transmitância foram obtidos através de um espectrofotômetro modelo spectrum 65 da marca Perkin Elmer com acessório de ATR.

3.2.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As medidas de DSC foram obtidas em um equipamento da marca TA Instruments modelo Q20, sob atmosfera de nitrogênio com pressão de 0,5bar e as amostras acondicionadas em suporte hermético de alumínio.

Uma amostra de cada um dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col com massas de 12, 20 e 19mg, respectivamente. Foram aquecidas da temperatura ambiente até 250°C (primeiro aquecimento) com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, posteriormente foram resfriadas à uma temperatura de -10°C, também com taxa de 10°C.min⁻¹, e novamente aquecidas até a temperatura de 250°C (segundo aquecimento) mantendo a taxa de aquecimento em 10°C.min⁻¹ (SHI *et al.*, 2016).

Amostra de quitosana com aproximadamente 10mg foi resfriada da temperatura ambiente à uma temperatura de -10°C com taxa de 10°C.min⁻¹ e posteriormente aquecidas até 250°C com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2003).

Para os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram utilizadas mais duas amostras de cada um dos filmes. Essas amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 250°C (primeiro aquecimento) com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, posteriormente foram resfriadas até 0°C, também com taxa de 10°C.min⁻¹. O segundo aquecimento foi realizado com duas taxas de aquecimento diferentes 30°C.min⁻¹ e 50°C.min⁻¹ até a temperatura de 250°C. As massas das amostras variaram entre 5 e 6mg.

As temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e o grau de cristalinidade, calculado segundo a equação 1 (SHI *et al.*, 2016), dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram determinados utilizando os dados da curva do segundo aquecimento. Os parâmetros de T_g e T_m também foram determinados para a amostra de quitosana.

$$\text{Cristalinidade (\%)} = [(\Delta H_f)/(\Delta H_{f*})] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: ΔH_f = Entalpia de fusão da amostra; ΔH_{f*} = Entalpia de fusão teórica supondo o PVA 100% cristalino.

3.2.7 Termogravimetria (TG)

Nas análises termogravimétricas, as amostras são submetidas a uma variação constante de temperatura enquanto a variação de massa é monitorada. As análises dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram realizadas em um equipamento da marca TA Instruments modelo Q50, sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂) com fluxo de 100mL.min⁻¹ com as amostras acondicionadas em suporte de platina e taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ (JALVANDI *et al.*,

2017). As curvas termogravimétricas e suas derivadas foram registradas no intervalo de temperatura de 50 a 500°C e as massas das amostras variaram entre 12 e 20mg.

Para a quitosana a análise também foi realizada sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂), mas com fluxo de 40mL.min⁻¹. Amostra de 6mg foi acondicionada em suporte de platina e aquecida com taxa de 5°C.min⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2003). As curvas termogravimétricas e suas derivadas foram registradas no intervalo de temperatura de 25 a 600°C.

3.2.8 Grau de intumescimento

Os testes de intumescimento foram realizados em triplicatas para os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col, todos liofilizados. As amostras foram pesadas e colocadas em tubo Falcon contendo 10mL de água ultra purificada e mantidas em banho termostático à uma temperatura de 37°C (±1°C). As medições foram realizadas no intervalo de 2, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos, mantidas, posteriormente, as pesagens de hora em hora até o tempo de 7 horas e depois em 24, 48, 72 e 96 horas. Para a pesagem, as amostras eram retiradas do tubo Falcon e secas com papel toalha afim de remover o excesso de água da sua superfície. A quantidade de água absorvida, expressa em porcentagem, foi determinada pela equação 2 (ALVES *et al.*, 2016).

$$\text{Intumescimento (\%)} = [(M_s - M_d)/M_d] \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

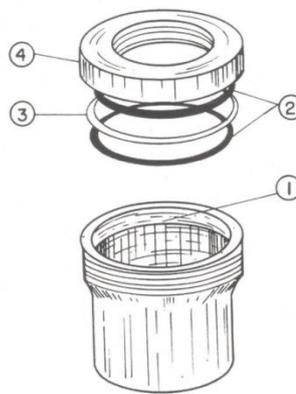
Onde: M_s = massa da amostra intumescida; M_d = massa da amostra seca.

3.2.9 Permeação de vapor de água

Os testes de permeação de vapor de água foram realizados pelo sistema de pesagem utilizando-se um copo de Payne, Fig. 8, no qual é colocado água destilada sob o filme

polimérico, sem que haja contato entre eles, e por fim o copo é vedado com anéis de borracha e de metal. Para os testes foram utilizadas duas amostras de cada um dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.

Figura 8. Copo de Payne. Os números no desenho indicam: 1) – Espaço interno a rosca para colocação do filme polimérico; 2) – Anéis de vedação de borracha; 3) – Anel de alumínio; 4) – Tampa do copo de Payne.



Fonte: (MORELLI; RUVOLO FILHO, 2010).

Após a montagem, o conjunto foi colocado dentro de um dessecador na presença de pentóxido de fósforo (P_2O_5), um agente dessecante, com a finalidade de gerar um gradiente de pressão, o qual permitirá a permeação do vapor de água através do filme polimérico. O dessecador foi colocado dentro de uma estufa sob temperatura de $30^\circ C (\pm 2^\circ C)$ com o objetivo de manter sua temperatura interna constante. Inicialmente os copos de Payne foram pesados de hora em hora até o tempo de 4 horas e depois uma vez ao dia até o tempo de 240 horas. A variação da massa é diretamente proporcional à massa de água que passa através do filme polimérico.

Para o cálculo do coeficiente de permeabilidade (P_H), primeiramente calculou-se o valor de $(\Delta m / \Delta t)$ que é o coeficiente angular do gráfico, variação de massa (Δm) versus tempo (h). Obtido isso, calculou-se o fluxo (J), equação 3, que foi determinado pela variação temporal da

massa corrigida pela área do filme exposta e com uso da primeira lei de Fick que é a proporcionalidade entre o fluxo de matéria e o gradiente de concentração (MORELLI; RUVOLO FILHO, 2010).

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde A = área da matriz polimérica.

Portanto, o coeficiente de permeabilidade (P_H) foi calculado pela equação 4.

$$P_H = \frac{J \cdot L}{\Delta P_v(T)} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde $\Delta P_v(T)$ = diferença de pressão de vapor numa dada temperatura; L = espessura da amostra; T = 30°C; $\Delta P_v = 31,8$ mmHg.

3.2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) os filmes liofilizados de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram congelados em nitrogênio líquido e fraturados. As amostras foram colocadas em suporte apropriado e recobertas com ouro pelo método de *Sputtering* em um metalizador da marca Quorum modelo Q150 Sputter Coater afim de torná-las condutivas (ZHANG *et al.*, 2007).

A captura das imagens ocorreu no microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss modelo Evomais.

3.2.11 Análise antibiograma

O ensaio microbiológico foi realizado pela técnica de difusão com discos – CLSI 2015 e teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col frente a diferentes espécies bacterianas (SAID *et al.*, 2011).

Primeiramente uma alça bacteriológica devidamente flambada e resfriada foi utilizada para suspender as diferentes colônias recentes (18-24h) na solução salina estéril até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1.10^6 UFC/mL).

Após este procedimento molhou-se um *swab* estéril na suspensão de *Escherichia coli* - ATCC 25922 que depois de retirado o seu excesso foi esfregado ao longo da superfície do ágar em placa de Petri sem deixar qualquer falha, a operação foi repetida virando a placa em ângulos de 45°. A esta placa com o auxílio de uma pinça levemente flambada e fria foram adicionados, com leve compressão, um disco controle com Ampicilina 10µg e os discos dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col tratados previamente com luz UV.

O mesmo procedimento foi repetido para as suspensões de *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 com uma única diferença, o agente antimicrobiano utilizado. Para essas duas suspensões utilizou-se um disco com Tobramicina 10µg.

O processo de incubação iniciou-se depois de dois minutos do acondicionamento dos discos sobre a placa e ocorreu com as placas invertidas sob temperatura de 37°C por 18 horas.

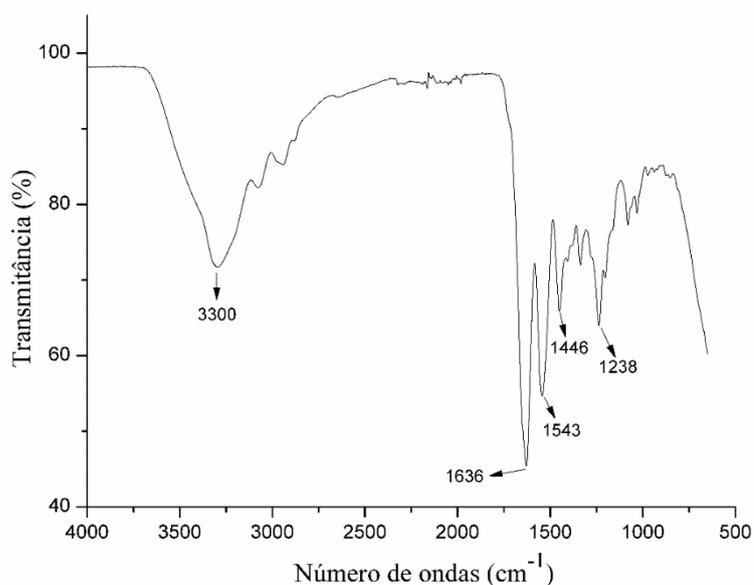
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir das análises de FTIR, DSC, TG, intumescimento, permeação de vapor de água, MEV e análise antibiograma, além das discussões desses resultados.

4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

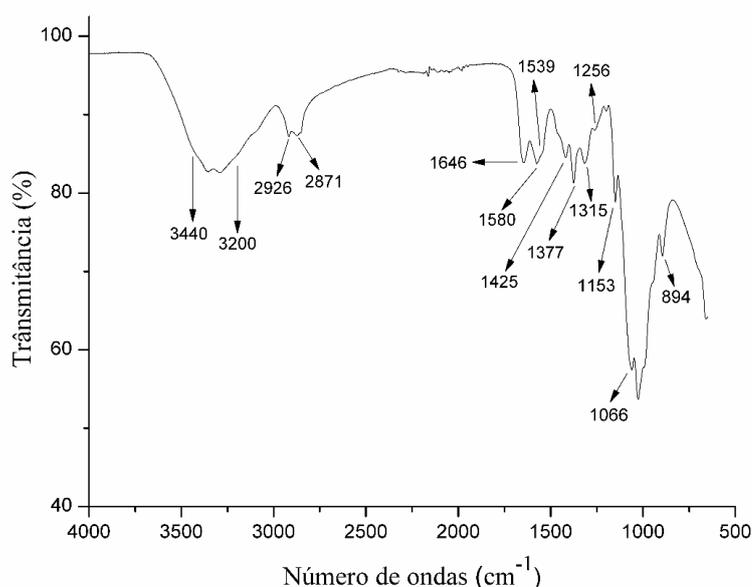
A técnica de FTIR é uma das mais utilizadas e importantes para a caracterização dos materiais. Primeiramente foram analisados os materiais separadamente, cujos espectros de infravermelho para o colágeno, quitosana e PVA estão apresentados nas Fig. 9, Fig. 10 e Fig. 11, respectivamente.

Figura 9. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o colágeno.



Para o colágeno foram identificadas as seguintes bandas principais: 1238cm^{-1} referente às vibrações no plano da amida III, consequência do estiramento C-N e a deformação N-H (PON-ON *et al.*, 2014); 1446cm^{-1} correspondente à estereoquímica dos anéis pirrolidínicos (TONHI; PLEPIS, 2002); em 1543cm^{-1} devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N da amida II (HORN, 2008); 1636cm^{-1} refere-se ao estiramento da carbonila (C=O) para a amida I (KARMAKAR *et al.*, 2017); e 3300cm^{-1} devido ao estiramento O-H (HORN, 2008).

Figura 10. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para a quitosana.

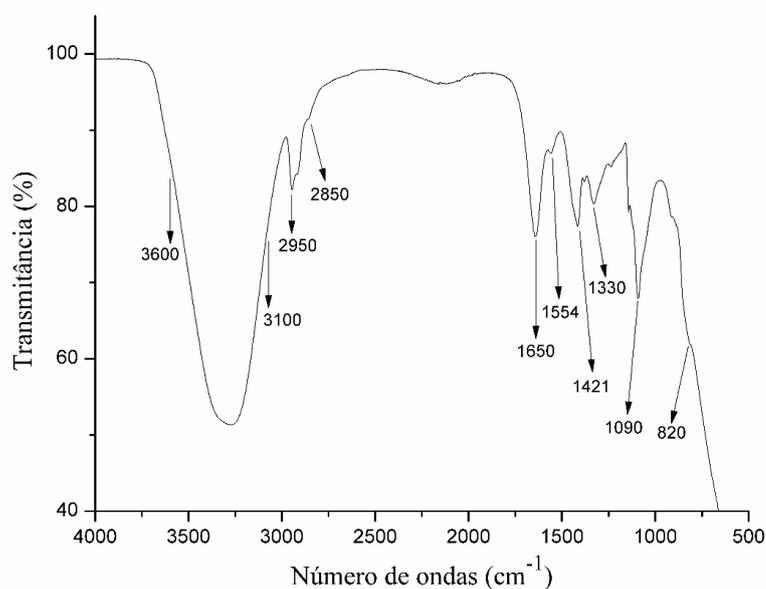


Para a quitosana, Fig. 10, foram identificados as seguintes bandas: 894 e 1153cm^{-1} estão relacionadas à estrutura da sacarina (CHOO *et al.*, 2016); 1256cm^{-1} é associado com a vibração de flexão O-H e 1066cm^{-1} é atribuído ao estiramento C-O ambos do aminoácido mais fraco (CHOO *et al.*, 2016); 1315cm^{-1} referente ao estiramento do grupo -CO-N (HORN, 2008); 1377cm^{-1} é devido a deformação simétrica do CH_3 (NAVEEN KUMAR *et al.*, 2010); 1425cm^{-1} devido a deformação angular do C-H (SANTOS; SILVA; LEITE, 2016); 1539cm^{-1}

corresponde a dobragem de N-H da amida II (CHOO *et al.*, 2016); em 1580cm^{-1} refere-se ao estiramento N-H da amida II (HORN, 2008); 1646cm^{-1} devido ao estiramento N-H da amida I (PON-ON *et al.*, 2014); 2871cm^{-1} é atribuído a vibração simétrica e 2926cm^{-1} a vibração assimétrica do estiramento C-H (SANTOS; SILVA; LEITE, 2016); e a banda entre 3200 e 3450cm^{-1} é atribuída as vibrações do estiramento O-H e N-H (CHOO *et al.*, 2016).

Para o espectro de PVA, Fig. 11, uma banda larga típica do PVA é observada entre 3600 e 3100cm^{-1} relacionada com o estiramento do O-H das fortes ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (SANTOS; SILVA; LEITE, 2016); na faixa de 2950 a 2850cm^{-1} refere-se ao estiramento do C-H do grupo alquila (FERNANDES, 2013); 1650 e 1330cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C=O e C-O dos grupos acetatos remanescentes do PVA (RASIA, 2014); 1554cm^{-1} é referente à vibração do estiramento C=C (CHOO *et al.*, 2016); 1421cm^{-1} é atribuído à vibração de flexão do OH do grupo hidroxila (CHOO *et al.*, 2016); 1090cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O enquanto a banda de 820cm^{-1} é atribuída à vibração do estiramento C-C (CHOO *et al.*, 2016).

Figura 11. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o filme PVA.



Ao analisar os espectros dos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col, Fig. 12 – apêndice A, observou-se uma pequena diminuição na intensidade da banda entre 3600 e 3100cm^{-1} comparado ao filme de PVA. Em seus trabalhos Costa Jr. *et al.*, 2008 e Santos *et al.*, 2016 produziram e analisaram blendas com diferentes concentrações de PVA e quitosana e associaram essa diminuição a adição da quitosana ao PVA, ou seja, ao aumento do teor de quitosana nas blendas devido a uma possível vibração do estiramento -OH do PVA com grupos -NH secundários da quitosana.

Para a banda 1539cm^{-1} , referente a vibração do N-H da amida II, da quitosana foi observado uma diminuição da intensidade quando comparado ao filme de PVA/Quit e ausência no filme de PVA/Quit/Col comportamento atribuído a adição do PVA como descrito por Choo *et al.*, 2016. Também com a adição de PVA, a banda 1066cm^{-1} , associado à vibração do estiramento C-O da quitosana foi deslocada para um comprimento de onda mais elevado, o que provavelmente resultou no aumento da intensidade da banda 1090cm^{-1} nos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col.

Adicionalmente, observou-se nos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col um aumento na intensidade da banda 2950cm^{-1} correspondente ao estiramento do C-H do grupo alquila (FERNANDES, 2013) quando comparado ao filme de PVA, comportamento também relatado por Choo *et al.*, 2016.

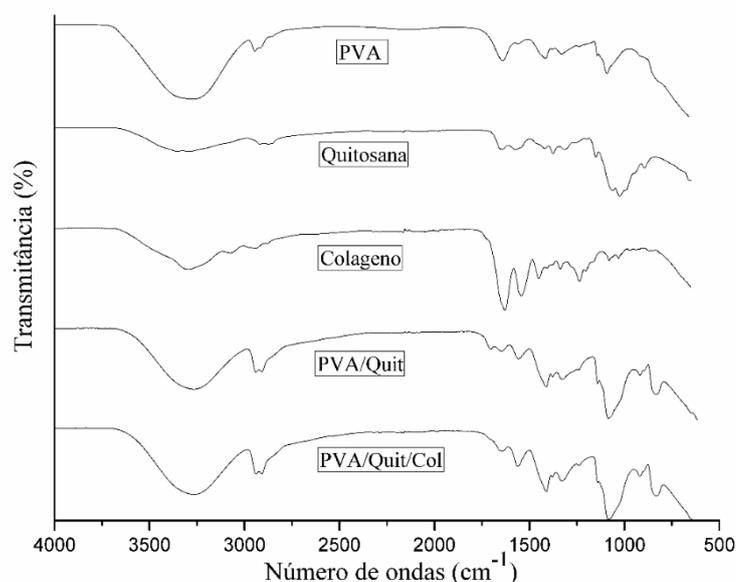
Nos filmes de PVA/Quit/Col e PVA/Quit com uma maior intensidade, também foi possível observar o aparecimento de uma banda em 1705cm^{-1} atribuído a presença do dímero de ácido carboxílico devido ao uso do ácido acético na dissolução da quitosana (WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

As alterações observadas nas bandas dos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col quando comparado as bandas características do filme de PVA e da quitosana indicam uma interação entre os polímeros PVA e quitosana. A causa mais provável é a formação de ligações

intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos -OH e -NH da quitosana e os grupos -OH do PVA (CHOO *et al.*, 2016).

Para o filme de PVA/Quit/Col não foram observadas alterações, quando comparado ao filme de PVA/Quit que pudessem ser atribuídas a presença do colágeno e também não foi possível identificar bandas características do colágeno no filme de PVA/Quit/Col. Comportamento atribuído provavelmente a baixa concentração de colágeno utilizado na preparação do filme de PVA/Quit/Col.

Figura 12. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier da quitosana, colágeno e os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.



4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Fig. 13 apresenta os termogramas para as amostras de quitosana e os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.

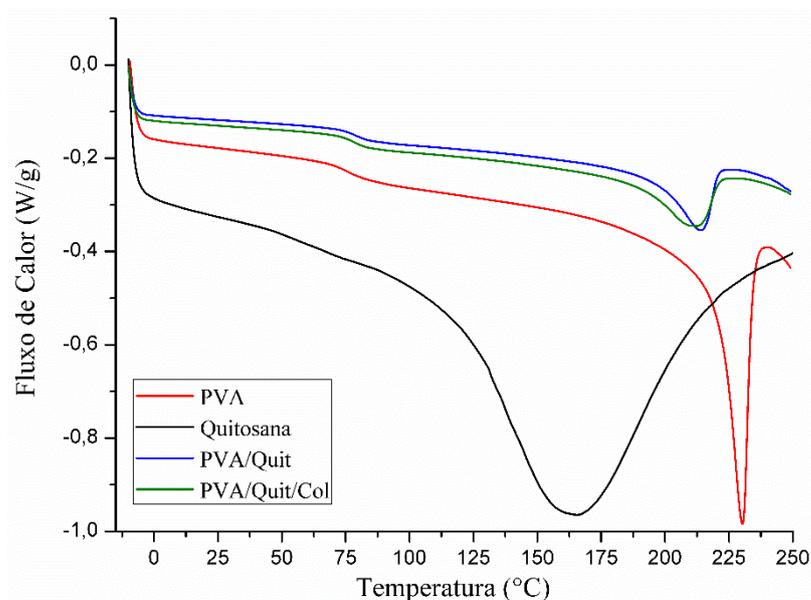
Para o filme de PVA, um polímero semicristalino, o termograma obtido refere-se ao segundo aquecimento. A temperatura de transição vítrea (T_g) de 76°C e a temperatura de fusão

(T_m) de 230°C, estão de acordo com a literatura, que apresentam T_g em torno de 88°C e T_m de aproximadamente 212°C, as variações estão associadas ao grau de hidrólise e a massa molar do polímero (RASIA, 2014).

A amostra de quitosana apresentou uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 67°C que está de acordo com o apresentado por Jridi *et al.*, 2014. No entanto, Qiao *et al.*, 2017 relataram diferentes valores de T_g para a quitosana e afirmaram que estas diferenças estavam associadas à massa molar, ao grau de desacetilação, a cristalinidade, entre outros (JRIDI *et al.*, 2014; QIAO *et al.*, 2017). A temperatura de fusão (T_m) encontrada foi de 163°C.

De acordo com a literatura o colágeno, por tratar-se de uma proteína, apresenta temperatura de desnaturação (T_d) em torno de 45°C. A T_d reflete a transformação da tripla hélice em uma estrutura aleatória (RODRIGUES; MARTINS; PLEPIS, 2006; TIAN; LIU; LI, 2016).

Figura 13. Termogramas para a quitosana e os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col sob taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



Na tabela 1 são apresentados os valores de T_g e T_m obtidos a partir dos termogramas mostrado na Fig. 13.

Tabela 1. Valores de T_g e T_m para as amostras de quitosana e os filmes de PVA, PVA/Qui e PVA/Quit/Col sob taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$.

Amostras	T_g ($^\circ\text{C}$)	T_m ($^\circ\text{C}$)
PVA	76,0	230,0
Quitosana	67,0	163,0
PVA/Quit	79,0	209,0
PVA/Quit/Col	79,0	212,0

Para os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col os termogramas obtidos na taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ apresentaram os mesmos valores de T_g (79°C) e T_m de 209 e 212°C , respectivamente. Os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col praticamente não apresentaram alterações na T_g quando comparado ao filme de PVA. Mas verifica-se uma diminuição da T_m dos filmes de PVA/Quit (209°C) e PVA/Quit/Col (212°C) também quando comparado ao filme de PVA (230°C). Esta diminuição na T_m pode estar associada a redução da cristalinidade, dificuldade de organização do PVA em estruturas cristalinas, após a adição da quitosana, semelhante às apresentadas no filme de PVA. Devido a isso, predomina-se a formação de estruturas cristalinas que requerem uma menor quantidade de energia para fundí-las, quando comparado com as estruturas cristalinas do filme de PVA. Dessa maneira, a temperatura de fusão das amostras de PVA/Quit e PVA/Quit/Col diminuem em relação ao filme de PVA.

Observa-se, também, que o pico de fusão acentuado e bem definido no filme de PVA desaparece, dando lugar a um pico mais largo para os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col, com redução da área cristalina, ou seja, indicando que a presença da quitosana promoveu uma redução no grau de cristalinidade dos sistemas quando comparado ao filme de PVA.

O grau de cristalinidade foi determinado a partir da equação 1 e os valores estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de entalpia de fusão e cristalinidade para os filmes de PVA, PVA/Qui e PVA/Quit/Col.

Filme	Entalpia de fusão (J/g)	Cristalinidade (%)
PVA	50,6	36,5
PVA/Quit	21,7	15,6
PVA/Quit/Col	25,1	18,2

* O valor da entalpia de fusão teórica supondo o PVA 100% cristalino, utilizado para esse cálculo foi de 138,6 J/g (SHI *et al.*, 2016).

Por fim, os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram submetidos a mais duas análises com maiores taxas de aquecimento. Taxa de 30°C.min⁻¹, Fig. 14, e 50°C.min⁻¹, Fig. 15. Nos dois termogramas, assim como no termograma com taxa de 10°C.min⁻¹, Fig. 13, foi observado a presença de uma única T_g e T_m indicando a miscibilidade dos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col (JRIDI *et al.*, 2014).

Figura 14. Termogramas para os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col sob taxa de aquecimento de 30°C.min⁻¹.

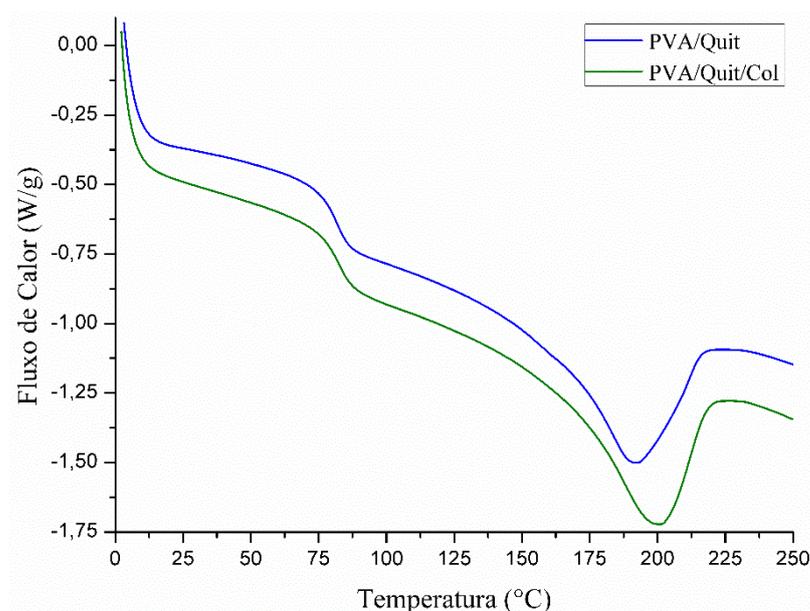
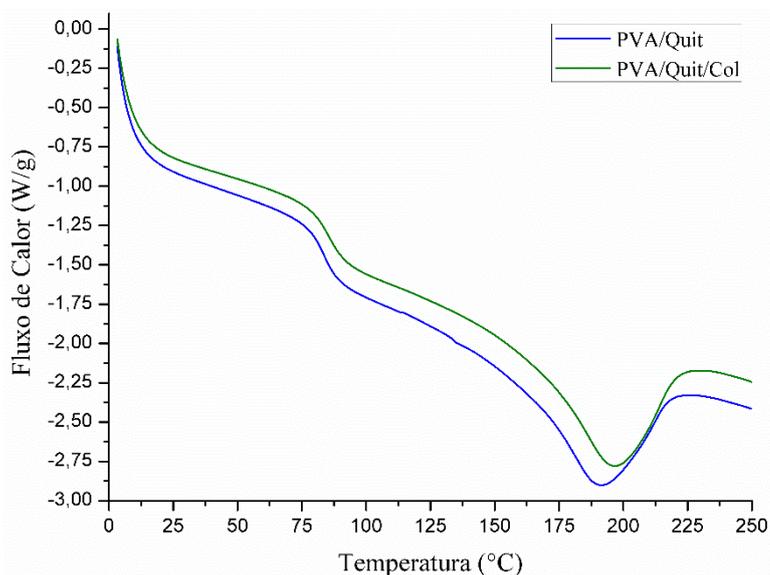


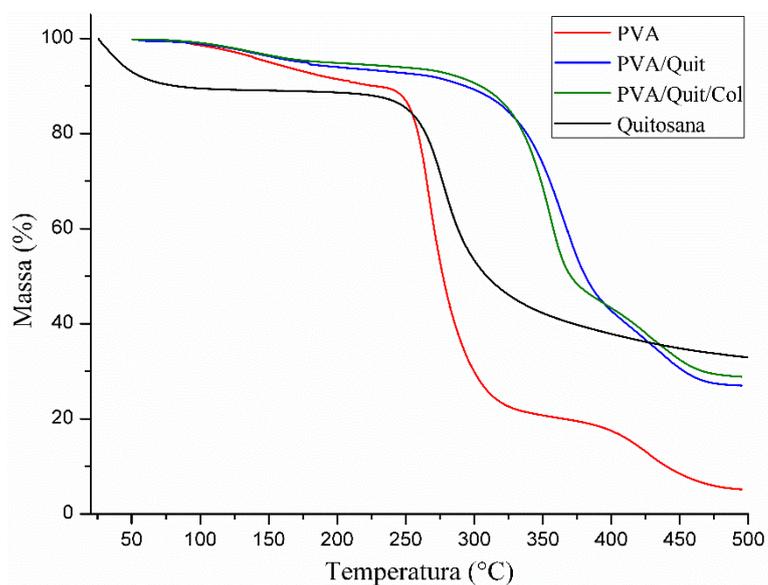
Figura 15. Termogramas para os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col sob taxa de aquecimento de $50^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.



4.3 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

As curvas termogravimétricas das amostras de quitosana e dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col, Fig. 16, mostraram duas regiões de perda de massa para a quitosana e três regiões para os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.

Figura 16. Curvas TG da quitosana e dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.



O primeiro estágio de perda de massa é observado próximo da região de 60°C para a quitosana, 100°C, 125°C e 130°C para os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col, respectivamente. Este primeiro estágio normalmente é atribuído a perda de água (CHOO *et al.*, 2016). O PVA apresentou a menor perda de massa 2,8% indicando que tinha o menor teor de água em sua estrutura. A quitosana apresentou a maior perda de massa 10,9%, demonstrando uma maior quantidade de água em sua estrutura, uma vez que a amostra não passou pelo processo de liofilização realizado nos filmes. Os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col apresentaram valores próximos de 6,4% e 5,6%, respectivamente. Valores que indicam um maior teor de água quando comparado ao filme de PVA e menor em relação a quitosana.

O segundo estágio de perda de massa 56,8% da quitosana é atribuído ao processo de degradação e ocorreu próximo da região de 275°C. Para o filme de PVA a degradação ocorreu próximo da região de 270°C com perda de massa de 69,2%. O Filme de PVA/Quit teve perda de massa de 54,1% próximo da região de 350°C e o filme de PVA/Quit/Col apresentou uma perda de massa próxima ao filme de PVA/Quit com valor de 50,3% e também próximo da região de 350°C.

Adicionalmente, o terceiro estágio de perda de massa, normalmente é relacionado aos produtos da degradação e foi de 14,6% para o filme de PVA próximo da região de 430°C. O filme de PVA/Quit apresentou uma perda de massa de 10,2% próximo da região de 425°C e o filme de PVA/Quit/Col com perda de massa de 13,0% próximo da região de 420°C.

Além de observar os estágios de degradação dos filmes, foi possível analisar, também, a estabilidade térmica dos mesmos. Assim, de acordo com o observado na Fig. 16, os filmes de PVA/Quit e PVA/Qui/Col apresentaram maior estabilidade térmica quando comparado ao filme de PVA. Isso é um indício da interação entre a quitosana e o PVA, corroborando com o que foi observado na análise de FTIR.

A temperatura máxima de degradação (T_{pico}) da quitosana e dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Qui/Col foi determinada através da curva termogravimétrica derivada (DTG) – apêndice A – e os valores são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores da temperatura máxima de degradação (DTG) para a quitosana e os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Qui/Col.

Amostras	T_{pico} (°C)
PVA	235
Quitosana	278
PVA/Quit	296
PVA/Qui/Col	296

4.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO

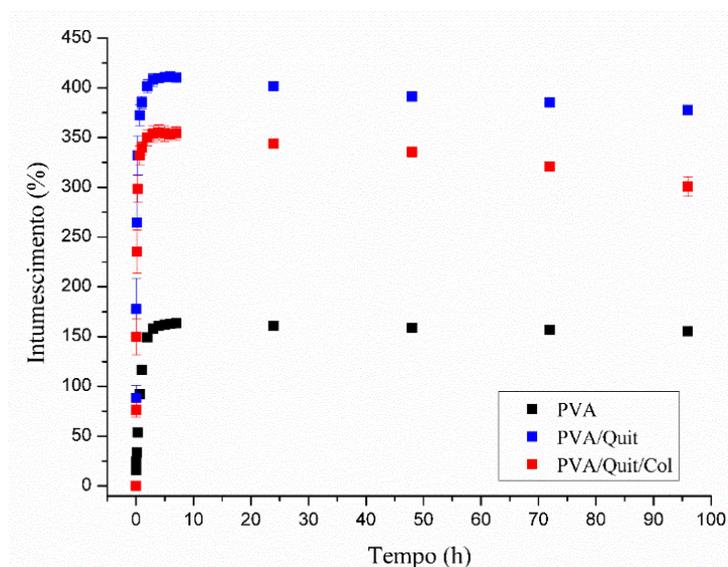
A capacidade de absorver água, ou seja, o intumescimento dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram determinados de acordo com a equação 2.

O filme de PVA atingiu seu máximo de intumescimento com 7 horas de imersão, com um grau de 163%, após esse tempo o grau de intumescimento diminuiu gradualmente até 155% em 96 horas, Fig. 17.

Para o filme de PVA/Quit/Col o grau máximo de intumescimento foi de 355% após 4 horas de imersão, também houve uma diminuição gradativa depois do intumescimento máximo chegando a 300% no tempo de 96 horas, Fig. 17.

Entre os filmes analisados o que apresentou o maior grau de intumescimento foi o filme de PVA/Quit com um valor de 411% depois de 6 horas de imersão. Este filme apresentou o mesmo comportamento de diminuição após atingir grau máximo de intumescimento com o valor de 378% após 96 horas de imersão, Fig. 17.

Figura 17. Gráfico do intumescimento dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col aplicado o desvio padrão.



O comportamento observado nos três filmes para a diminuição do grau de intumescimento depois de atingir o seu valor máximo, Fig 17, pode estar associado as características do PVA. Por ser um polímero hidrofílico, a absorção de água pelos filmes podem resultar em uma troca de interações entre os grupos hidroxilas da cadeia de PVA por interações entre os grupos hidroxilas e água promovendo a perda de massa pela provável dissolução do PVA durante o processo de intumescimento (SIMÕES, 2011).

A capacidade de absorção de água dos filmes analisados depende, dentre outros fatores, do grau de cristalinidade. Estruturas que apresentam uma maior porcentagem de cristais impõem uma maior barreira para o processo de difusão da água, devido a maior tortuosidade gerada no sistema. Na difusão ocorre a migração das moléculas de água, devido à formação de uma força termodinâmica causada por um gradiente de concentração, de um local mais concentrado para um de menor concentração (RASIA, 2014). Este comportamento é observado nos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col. O filme de PVA apresentou o maior grau de cristalinidade com o valor de 36,5%, desta forma, impôs a maior barreira para a difusão da água

entre os três filmes estudados resultando na menor capacidade de absorção de água, 163% de grau de intumescimento. O filme de PVA/Quit demonstrou a maior capacidade de absorção de água atingindo um grau de intumescimento de 411%, valor significativamente maior que o apresentado pelo filme de PVA, resultado atribuído ao menor grau de cristalização (15,6%), conseqüentemente a menor barreira imposta à difusão da água. Para o filme de PVA/Quit/Col também foi observado um grau de intumescimento (355%) significativamente maior que o PVA, mas um pouco abaixo quando comparado ao filme de PVA/Quit, novamente este comportamento pode ser atribuído ao grau de cristalinidade (18,2%) que é um pouco maior daquele apresentado pelo filme de PVA/Quit e menor que o apresentado pelo filme de PVA. Adicionalmente, outro fator que pode ter contribuído para o menor grau de intumescimento do filme de PVA/Quit/Col em relação ao filme de PVA/Quit é uma provável liberação gradativa do colágeno para a água, durante o processo de intumescimento, no qual há um inchamento da molécula e, conseqüentemente, um aumento do volume livre entre as cadeias dessa macromolécula. Essa liberação do colágeno também pode estar associada ao fato de não ser possível identificar bandas que indicassem a interação do colágeno com os outros polímeros através de análise de FTIR.

Um maior grau de intumescimento representa uma maior capacidade de absorção dos exsudados da sua superfície dos ferimentos cutâneos, fator bastante relevante no processo de cicatrização (SUNG *et al.*, 2010).

A taxa de intumescimento foi determinada através da inclinação da reta, nos tempos iniciais de ensaio, nas curvas de intumescimento, Fig. 17. A maior taxa de intumescimento de $753,2\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ foi identificada no filme de PVA/Quit, o qual apresentou o menor grau de cristalinidade (15,6%). O Filme de PVA/Quit/Col obteve uma taxa de intumescimento de $490,4\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ com um grau de cristalinidade (18,2%). E o filme de PVA apresentou a menor taxa de intumescimento de $64,7\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ associado ao maior grau de cristalinidade (36,5%). Os valores

da taxa de intumescimento apresentam uma relação com o grau de cristalinidade, ou seja, quanto maior a cristalinidade menor é o valor da taxa de intumescimento. Isso ocorre pois, quanto maior a cristalinidade maior é a dificuldade das moléculas de água entrarem no filme polimérico.

4.5 PERMEAÇÃO DE VAPOR DE ÁGUA

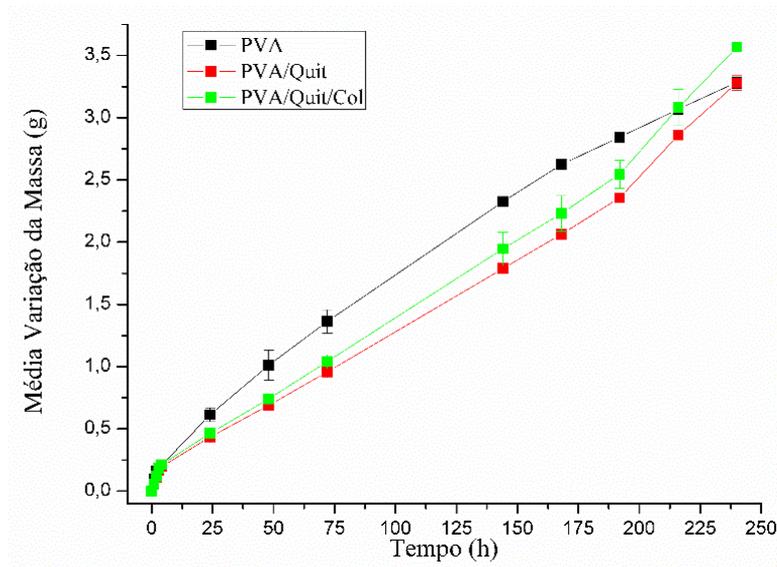
O processo de transporte de pequenas moléculas através de membranas poliméricas ocorre devido ao movimento aleatório das moléculas individuais e poderia ser descrito da seguinte maneira: inicialmente as moléculas do gás são adsorvidas na superfície do polímero, dissolvendo-se nesse local, sendo estabelecido um rápido equilíbrio entre as duas partes (gás e matriz polimérica). Em seguida as moléculas do penetrante dissolvido se difundem através da membrana, via um mecanismo de movimento aleatório. E, por fim, as mesmas são desorvidas na outra face da matriz polimérica.

Os resultados da análise de permeação de vapor de água realizada pelo método de pesagem foram determinados conforme o descrito em 3.2.9 e representam a média da variação da massa perdida (Δm) aplicado o desvio padrão em função do tempo (t), Fig. 18.

Analisando a Fig. 18 são observadas duas regiões com características distintas. A primeira até 4 horas onde se inicia o processo de permeação a qual é utilizada para obter os valores do fluxo e posteriormente o coeficiente de permeabilidade. A segunda região se encontra no intervalo de 4 até aproximadamente 200 horas de ensaio, sendo possível observar que o filme de PVA apresentou a maior variação de massa, indicando que houve uma maior passagem de água através do mesmo. Por outro lado, os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col não apresentaram variação de massa, considerando o desvio padrão, entre eles, e quando comparado ao filme de PVA, foi menor. Isso indica que a adição do colágeno não influenciou de forma

significativa a estrutura do filme de PVA/Quit/Col em relação ao filme de PVA/Quit. Após o tempo de 200 horas não foi mais possível observar o comportamento anterior, pois começa um processo de perda de contato, entre os filmes e o copo de Payne, prejudicando a capacidade de isolamento do sistema permitindo a passagem do vapor de água pelas frestas geradas.

Figura 18. Gráfico da média da variação da massa perdida (Δm) aplicado o desvio padrão em função do tempo (t) dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.



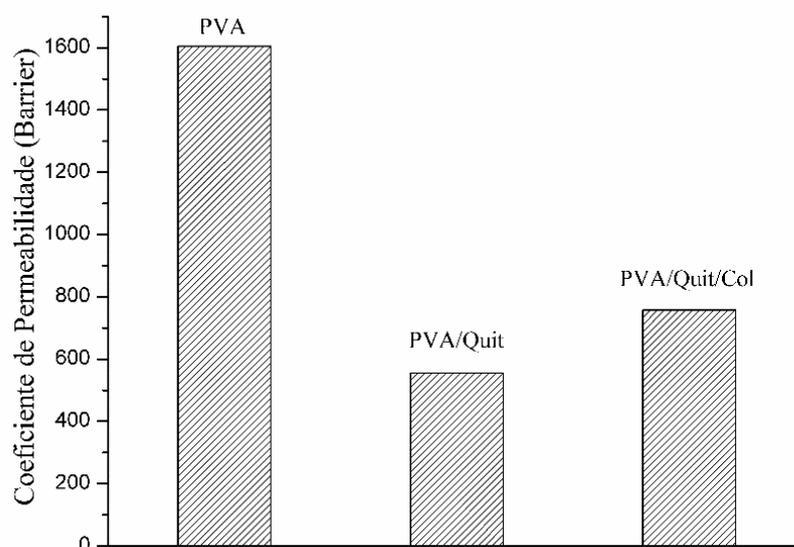
Na tabela 4 são apresentados os valores da área (A), espessura (L), coeficiente angular (B), fluxo (J) e o coeficiente de permeabilidade (P_H).

Tabela 4. Valores da área (A), espessura (L), coeficiente angular (B), fluxo (J) e o coeficiente de permeabilidade (P_H) para os filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.

Amostra	A (cm ²)	L (cm)	B (g.h ⁻¹)	J (g/h.cm ²)	P_H (Barrier) (10 ⁻¹³ .cm ³ .cm/s.cm ² .cmHg)
PVA	7,06	0,063	0,0206	2,9171.10 ⁻³	1605,3
PVA/Quit	7,06	0,039	0,0115	1,6311.10 ⁻³	555,6
PVA/Quit/Col	7,06	0,047	0,0130	1,8462.10 ⁻³	757,9

De acordo com o relatado por Duncan, 2011 o processo de transporte de pequenas moléculas através das membranas poliméricas é afetado por diversos fatores como: o grau de cristalinidade, características estruturais das cadeias laterais poliméricas, grau de ramificação ou de ligação cruzada, massa molar do polímero, concentração do penetrante, tamanho molecular do penetrante, polaridade do penetrante, condensabilidade do penetrante, afinidade química entre o penetrante e a matriz polimérica (DUNCAN, 2011).

Figura 19. Gráfico do coeficiente de permeabilidade (P_H) ao vapor de água dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col.



Analisando os dados do coeficiente de permeabilidade mostrados na Tabela 4 e na Fig. 19, observa-se que o filme de PVA apresentou o maior valor. Diferentemente do constatado no ensaio de intumescimento onde o maior grau de cristalinidade do filme de PVA resultou no menor intumescimento, para o coeficiente de permeabilidade o mesmo efeito não foi verificado. Isso provavelmente ocorreu porque os filmes precisaram ser intumescidos previamente antes da montagem do sistema, devido à dificuldade de preparação encontrada para os filmes liofilizados, os quais apresentavam uma rigidez que inviabilizava seu manuseio para o corte nas

dimensões requeridas e, além disso, prejudicava o contato entre os anéis de vedação e o filme. Sendo assim, possivelmente o grau de cristalinidade não exerceu a mesma influência na parte inicial do ensaio de permeação como ocorreu no ensaio de intumescimento.

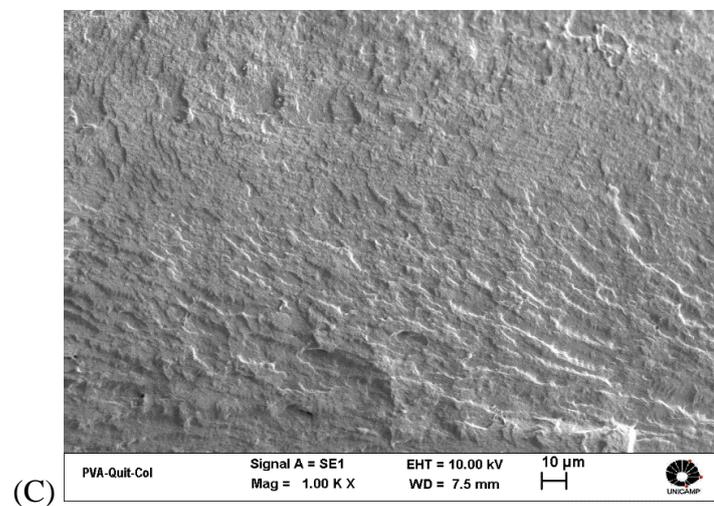
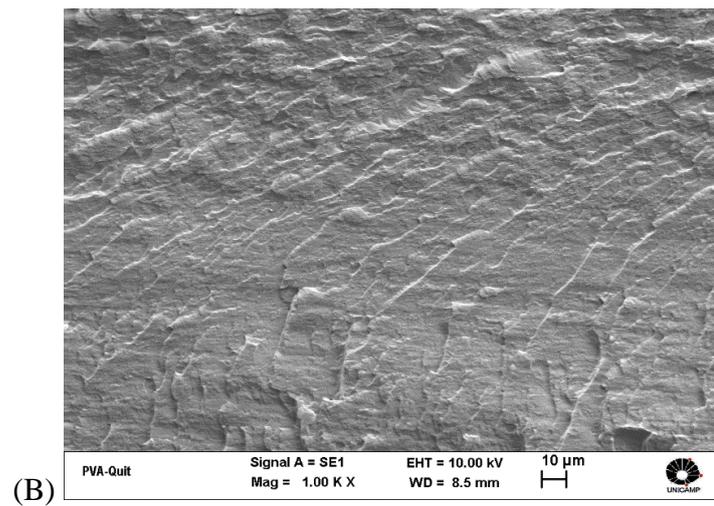
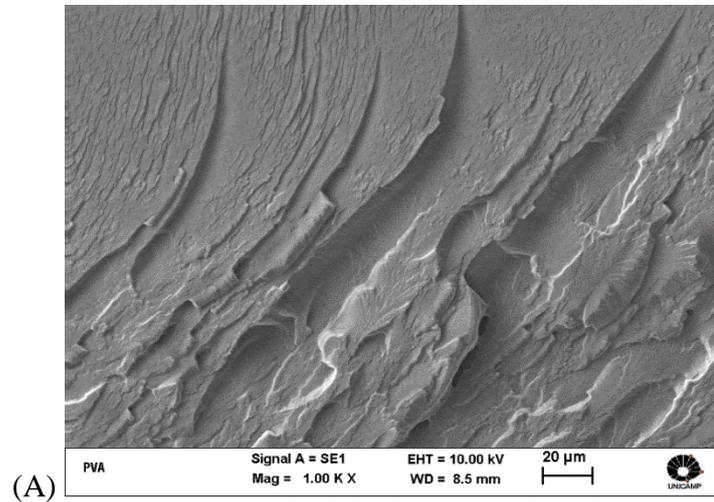
O maior coeficiente de permeabilidade apresentado pelo do filme de PVA quando comparado aos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col pode estar associado a uma maior interação entre a água (penetrante) e o PVA devido a maior característica polar desse material em relação a quitosana. Portanto a adição da quitosana diminui a interação entre a água e o PVA devido a sua menor hidrofiliçidade. Shahbazi *et al.*, 2016 também verificaram que a adição da quitosana ao filme de PVA aumenta a barreira ao vapor de água dessa mistura quando comparado ao filme de PVA (SHAHBAZI *et al.*, 2016).

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias, Fig. 20, dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col foram realizadas na superfície da região crio-fraturada. A superfície de fratura do filme de PVA apresenta um aspecto mais irregular mostrando uma maior deformação na fratura quando comparado aos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col. Indicando que o filme de PVA apresenta uma característica mais tenaz em relação aos outros filmes.

Além disso, foi possível observar, Fig. 20, que não houve separação de fases entre o PVA e a quitosana nos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col indicando a boa interação entre esses materiais. Isso reforça, juntamente com as análises de DSC a ideia que houve miscibilidade entre os materiais.

Figura 20. Micrografias dos filmes de PVA (A), PVA/Quit (B) e PVA/Quit/Col (C) com aumento de 1000 vezes.

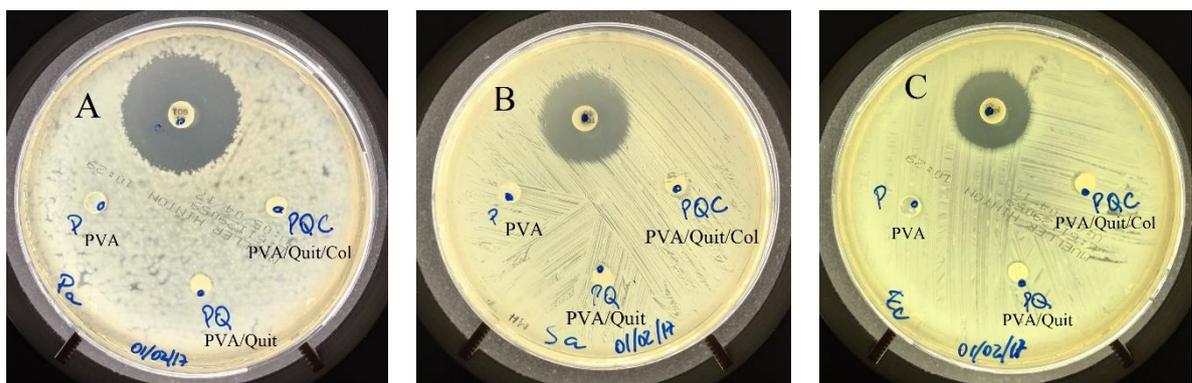


4.7 ANÁLISE ANTIBIOGRAMA

O ensaio de sensibilidade microbiana dos filmes de PVA, PVA/Quit e PVA/Quit/Col e os agentes antimicrobianos foram realizados mediante a técnica de difusão com discos de antibiograma (CLSI, 2015). Nesta técnica é utilizado o diâmetro do halo formado ao redor dos discos de controle positivo e do material de estudo, que também possui formato circular e mesmo diâmetro do controle positivo para determinar se a bactéria utilizada na análise é sensível, intermediário ou resistente aos filmes e aos antimicrobianos testados.

Para a Tobramicina 10 μ g as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostraram-se sensíveis, pois houve a formação de halos maiores que 18mm, Fig. 21. A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 também se apresentou sensível ao antibiograma Ampicilina 10 μ g com a formação de um halo maior que 17mm, Fig. 21.

Figura 21. Análise antibiograma em diferentes bactérias. (A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e (C) *Escherichia coli* ATCC 25922.



O filme de PVA não apresentou formação de halos a nenhuma das bactérias analisadas, Fig. 21.

Embora trabalhos descritos na literatura demonstrem a capacidade inibidora e até bactericida da quitosana (JUNG ET AL., 2007; NGUYEN; CHUNG; PARK, 2011), os filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col também não apresentaram qualquer ação inibidora as bactérias analisadas, observado pela completa ausência de halos, Fig. 21.

A ausência da formação de halos nos filmes de PVA/Quit e PVA/Quit/Col indica que a concentração de quitosana utilizada na preparação desses filmes foi insuficiente para inibir o crescimento das bactérias analisadas. Outro fator que pode ter contribuído para a ausência de halos é relatado por Yang *et al.* 2004 onde a quitosana teve sua capacidade antibacteriana diminuída na presença do PVA (YANG *et al.*, 2004).

5 CONCLUSÕES

Os espectros de FTIR do filme de PVA/Quit/Col demonstraram alterações quando comparado aos espectros do filme de PVA e quitosana indicando que ocorreu uma interação entre esses dois polímeros no filme, mas não apresentou alterações que pudessem ser atribuídas a adição do colágeno quando comparado ao filme de PVA/Quit.

A caracterização térmica pelo DSC do filme de PVA/Quit/Col apresentou valores únicos de T_g e T_m mesmo após aquecimento a taxas mais elevadas indicando que ocorreu uma miscibilidade entre o PVA e a quitosana. Nos filmes de PVA/Quit/Col e PVA/Quit verificou-se uma redução no grau de cristalinidade quando comparado ao filme de PVA.

A termogravimetria mostrou uma maior estabilidade térmica do filme de PVA/Quit/Col quando comparado ao filme de PVA reforçando a hipótese de que ocorreu uma interação entre o PVA e a quitosana.

O filme de PVA/Quit/Col apresentou um grau de intumescimento significativamente maior que o filme de PVA, mas, menor em relação ao filme de PVA/Quit. Este fato pode estar associado a cristalinidade apresentada pelo filme, menor em relação ao filme de PVA e maior em relação ao filme de PVA/Quit.

As micrografias obtidas por MEV para o filme de PVA/Quit/Col apresentaram um aspecto homogêneo, também apresentado pelo filme de PVA/Quit, indicando que não houve separação de fase entre o PVA e a quitosana.

O filme de PVA/Quit/Col, assim como os outros, submetidos a análise antibiograma, não apresentou ação inibidora as bactérias analisadas, observado pela ausência de halos. Consequência da provável baixa concentração de quitosana utilizada na preparação dos filmes e da presença do PVA.

O filme de PVA/Quit/Col apresenta características que estimulam a continuidade dos estudos para a aplicação desse material na engenharia tecidual.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Trabalhos futuros podem ser realizados envolvendo:

- Teste de biocompatibilidade, a análise *in vitro* de citotoxicidade visa investigar os possíveis efeitos adversos do filme de PVA/Quit/Col em meio celular.
- Estudo *in vivo* para verificar a resposta de cicatrização frente ao filme de PVA/Quit/Col.
- Ensaio mecânico – módulo tração sob diferentes taxas de intumescimento com o objetivo de avaliar o comportamento mecânico (tensão máxima de tração, deformação específica e módulo de elasticidade) do filme de PVA/Quit/Col.
- Investigar o método mais adequado para a esterilização do filme de PVA/Quit/Col e seus possíveis efeitos sobre as propriedades desse filme.

REFERÊNCIAS

- ALEMDAROĞLU, C. et al. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, n. 3, p. 319–327, maio 2006.
- ALVES, N. O. et al. Chitosan/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder biocomposites: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 115–124, set. 2016.
- ASSIS, O. B. G.; VALMIR L. DA, S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 223–228, dez. 2003.
- BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, set. 2017.
- CHOO, K. et al. Preparation and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Chitosan Composite Films Reinforced with Cellulose Nanofiber. **Materials**, v. 9, n. 8, p. 644, 29 jul. 2016.
- COSTA JR., E. DE S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008.
- DA SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–539, 2012.
- DE SOUZA COSTA-JÚNIOR, E.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 553–561, 6 fev. 2009.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, nov. 2011.
- EL SALMAWI, K. M. Gamma Radiation-Induced Crosslinked PVA/Chitosan Blends for Wound Dressing. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 44, n. 5, p. 541–545, mar. 2007.
- FAN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 427–434, ago. 2016.
- FERNANDES, J. M. Síntese e caracterização de cimento de α -fosfato tricálcico reforçado com hidrogel de Alginato de Sódio e PVA para aplicação médico-odontológica. [s.l: s.n.].

GERVASI, L. C.; TIBOLA, J.; SCHENEIDER, I. J. C. Tendência de morbidade hospitalar por queimaduras em Santa Catarina. **Rev. bras. queimaduras**, v. 13, n. 1, p. 31–37, 2014.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In: **Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000a. v. 153p. 37–65.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2472–2479, abr. 2000b.

HONG, K. H. Preparation and Properties of Electrospun Poly (vinyl alcohol)/Silver Fiber Web as Wound Dressings. **Polymer Engineering and Science**, v. 47, p. 21–25, 2007.

HORN, M. M. **Obtenção e Caracterização de Hidrogéis de Quitosana, Xantana e Colágeno Aniônico**. [s.l.] UFSCAR, 2008.

JALVANDI, J. et al. Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 440–446, abr. 2017.

JODAR, K. DOS S. P. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel de PVA (álcool polivinílico) e dextrana com sulfadiazina de prata para aplicação tópica**. Sorocaba: Cambridge University Press, 2014.

JRIDI, M. et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin/chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 373–379, jun. 2014.

JUNG ET AL., 2007. Preparation and antibacterial activity of PET/chitosan nanofibrous mats using an electrospinning technique. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 5, p. 2816–2823, 5 set. 2007.

KAMOUN, E. A. et al. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1–14, jan. 2015.

KANIMOZHI, K.; KHALEEL BASHA, S.; SUGANTHA KUMARI, V. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 484–491, abr. 2016.

KARMAKAR, M. et al. Fabrication of semisynthetic collagenic materials for mere/synergistic adsorption: A model approach of determining dye allocation by systematic characterization and optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.

102, p. 438–456, set. 2017.

KEONG, L. C.; HALIM, A. S. In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 3, p. 1300–1313, 18 mar. 2009.

KIM, J. E. et al. Skin regeneration with self-assembled peptide hydrogels conjugated with substance P in a diabetic rat model. **Tissue Engineering Part A**, p. ten.TEA.2016.0517, 3 maio 2017.

KRUMOVA, M. et al. Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). **Polymer**, v. 41, n. 26, p. 9265–9272, dez. 2000.

LEIPZIGER, L. S. et al. Dermal wound repair: Role of collagen matrix implants and synthetic polymer dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 12, n. 2, p. 409–419, fev. 1985.

LIN, H.-Y. et al. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 2, p. 25009, 22 fev. 2013.

MANSBRIDGE, J. Skin substitutes to enhance wound healing. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 7, n. 5, p. 803–9, 1 maio 1998.

MORELLI, F. C.; RUVOLLO FILHO, A. Nanocompósitos de polipropileno e argila organofílica: difração de raio X, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e permeação ao vapor d'água. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 121–125, jun. 2010.

NAVEEN KUMAR, H. M. P. et al. Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30°C. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 251–255, set. 2010.

NETO, A. C. A. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 1–30.

NGUYEN, T. T. T.; CHUNG, O. H.; PARK, J. S. Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1799–1806, out. 2011.

PACHENCE, J. M. Collagen-based devices for soft tissue repair. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 33, n. 1, p. 35–40, mar. 1996.

PARK, K. R.; NHO, Y. C. Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 67, n. 3–4, p. 361–365, jun. 2003.

PENG, Z.; SHEN, Y. Study on Biological Safety of Polyvinyl Alcohol/Collagen

Hydrogel as Tissue Substitute (I). **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 50, n. 3, p. 245–250, 18 jan. 2011.

PEPPAS, N. A.; HANSEN, P. J. Crystallization kinetics of poly(vinyl alcohol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 27, n. 12, p. 4787–4797, dez. 1982.

POLYANA ALVES, A. DE C. L. et al. Queimaduras no trabalho:Quantificação de casos e análise das situações de risco em uma indústria de São Luís de Montes Belos-GO. **Revista Faculdade de Montes Belos**, v. 8, n. 3, p. 159–179, 2015.

PON-ON, W. et al. Mechanical properties, biological activity and protein controlled release by poly(vinyl alcohol)–bioglass/chitosan–collagen composite scaffolds: A bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, n. 1, p. 63–72, maio 2014.

QIAO, C. et al. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. **Food Chemistry**, v. 235, n. May, p. 45–50, nov. 2017.

RASIA, G. M. **Síntese e funcionalização de hidrogéis de poli (álcool vinílico)**. [s.l.] UFRGS, 2014.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 41–75, 15 ago. 2004.

RAVI KUMAR, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

REMPEL, L. C. T.; TIZZOT, M. R. P. A; VASCO, J. F. M. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Revista Bras. Queimaduras**, v. 10, n. 1, p. 3–9, 2011.

RICCIARDI, R. et al. X-ray Diffraction Analysis of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, Obtained by Freezing and Thawing Techniques. **Macromolecules**, v. 37, n. 5, p. 1921–1927, mar. 2004.

RODRIGUES, F. T.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. MARIA G. Comportamento Térmico de Matrizes de Colágeno Tipo I Reticuladas com Glutaraldeído. **Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC)**, 2006.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1595–1611, 28 nov. 2003.

SAID, S. S. et al. Antimicrobial PLGA ultrafine fibers: Interaction with wound bacteria. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 108–118, set. 2011.

SANTOS, B. F. F. DOS; SILVA, J. R. DA; LEITE, I. F. Morfologia E Propriedades

Térmicas De Blendas De Poli (Álcool Vinílico)/ Quitosano. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 17, n. 3, p. 139–144, 2016.

SANTOS, J. E. DOS et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242–249, dez. 2003.

SHAHBAZI, M. et al. The physico-mechanical and structural characteristics of blend film of poly (vinyl alcohol) with biodegradable polymers as affected by disorder-to-order conformational transition. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 393–404, out. 2016.

SHI, Y. et al. Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 172–180, ago. 2016.

SIMÕES, M. M. S. G. Filmes sólidos de PVA eluidores de GSNO para aplicações tópicas e para o revestimento de stents. **UNICAMP**, 2011.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SUNG, J. H. et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1–2, p. 232–240, 15 jun. 2010.

SURUDŽIĆ, R. et al. Physico–chemical and mechanical properties and antibacterial activity of silver/poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites obtained by electrochemical method. **Composites Part B: Engineering**, v. 85, p. 102–112, fev. 2016.

TERRONI, H. C. et al. Liofilização. **Revista Científica UNILAGO**, p. 271–284, 2013.

TIAN, Z.; LIU, W.; LI, G. The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 264–270, ago. 2016.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. DE G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 943–948, nov. 2002.

UENO, H. et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1407–1414, ago. 1999.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911–918, jul. 2004.

YANG, J. M. et al. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 236, n. 1–2, p. 39–51, jun. 2004.

ZHANG, Y. et al. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, n. 8, p. 855–863, 2 maio 2007.

APÊNDICE – A

Figura 1A. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o filme de PVA/Quit.

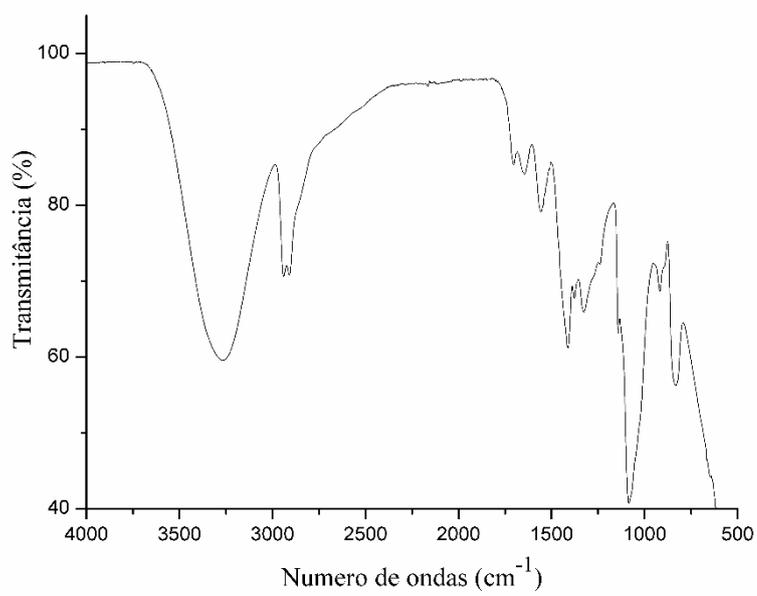


Figura 2A. Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para o filme de PVA/Quit/Col.

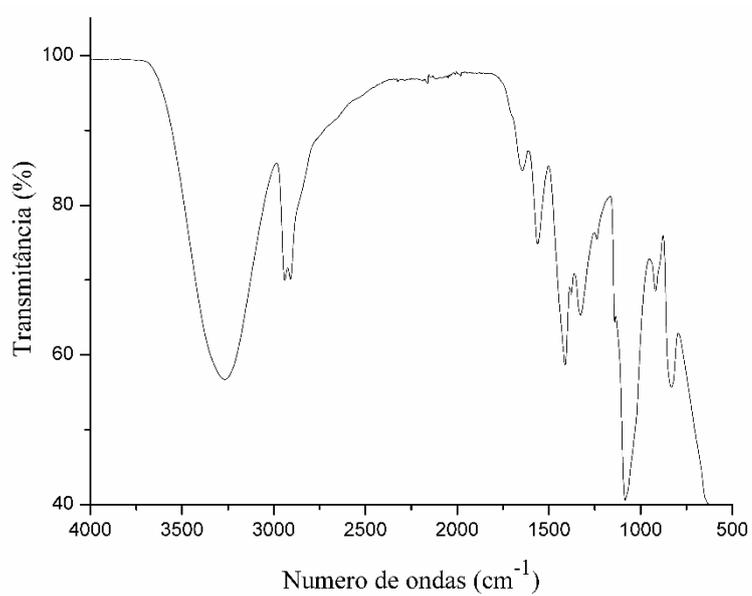


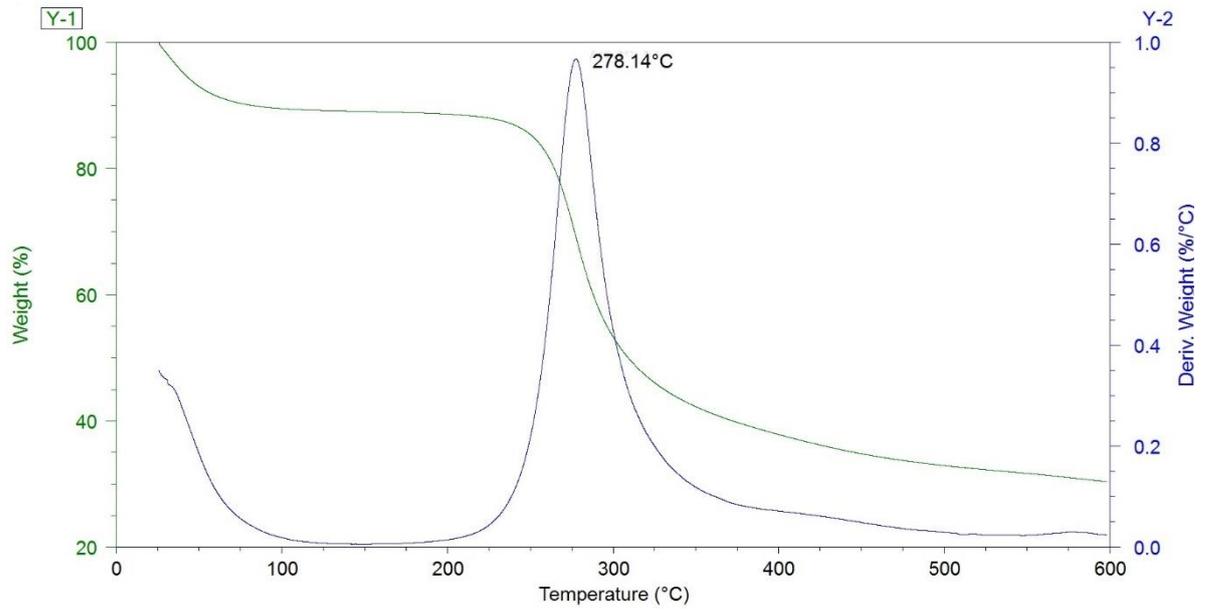
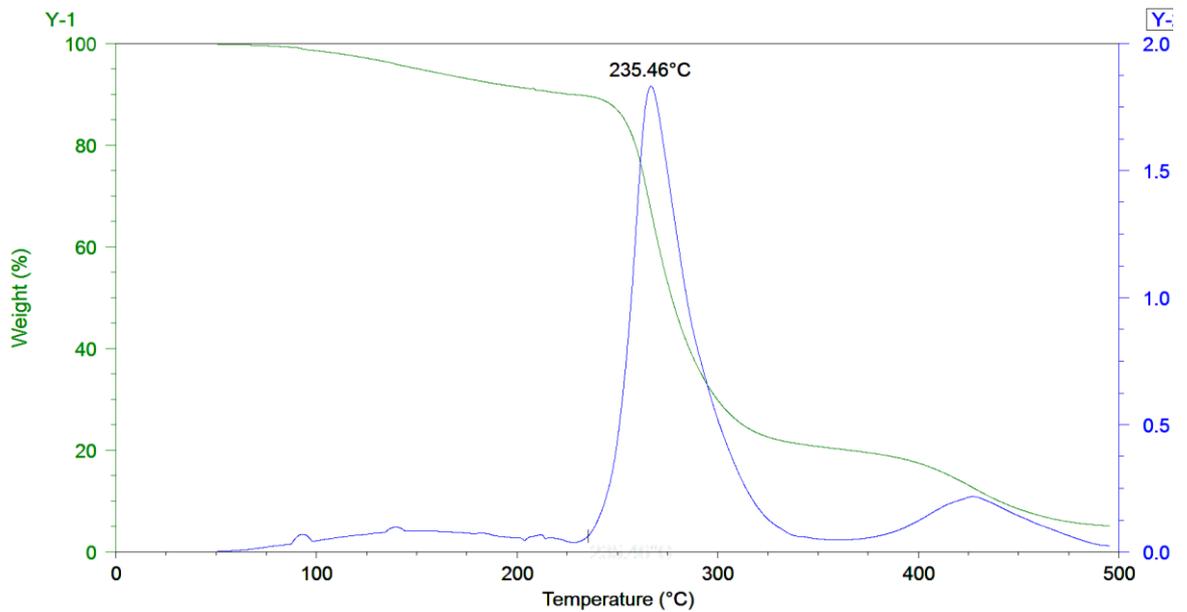
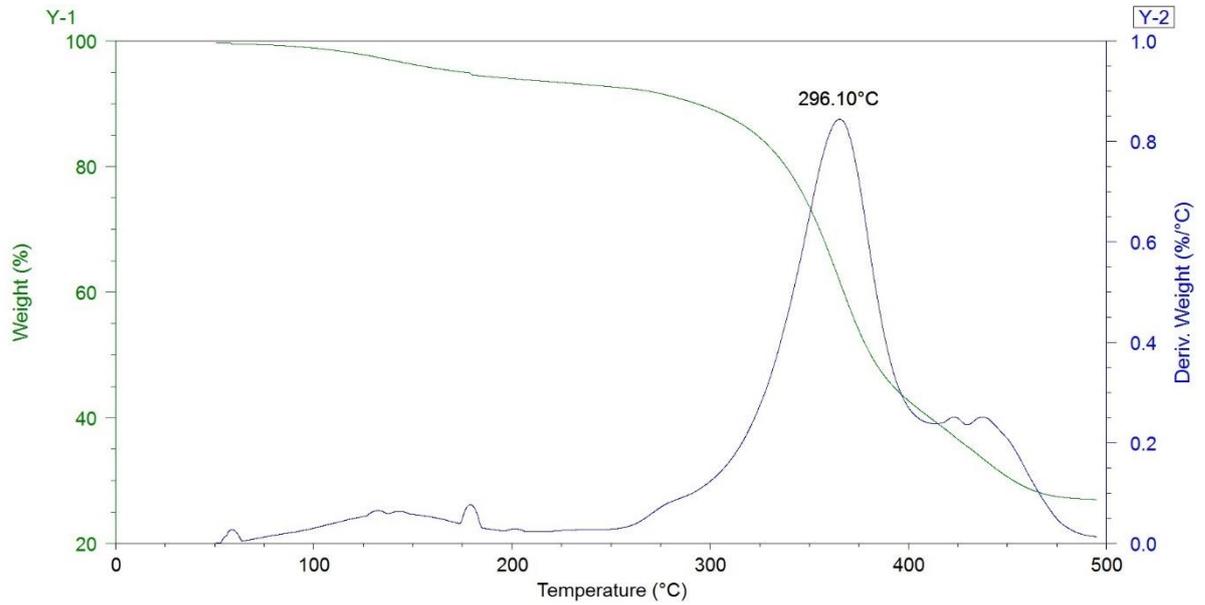
Figura 3A. Curva termogravimétrica derivada (DTG) para a quitosana.**Figura 4A.** Curva termogravimétrica derivada (DTG) para o filme de PVA.

Figura 5A. Curva termogravimétrica derivada (DTG) para o filme de PVA/Quit.**Figura 6A.** Curva termogravimétrica derivada (DTG) para o filme de PVA/Quit/Col.