

Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas

Ligia Lopes Fernandes

Projeto de Graduação submetido ao Corpo Docente do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Projeto aprovado por

Prof. Gloria Almeida Soares, DSc., UFRJ

Prof. Rossana Mara da S. Moreira Thiré, Dsc., UFRJ

Cristiane Xavier Resende MSc., UFRJ

Rio de Janeiro – RJ - Brasil

Julho de 2009

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. BIOPOLÍMEROS	3
2.2. QUITINA	4
2.3. QUITOSANA	6
2.3.1. ESTRUTURA CRISTALINA	8
2.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	9
2.3.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	10
2.3.4. APLICAÇÕES DA QUITOSANA	12
2.3.4.1. <i>Curativos a base de quitosana</i>	13
2.3.4.2. <i>Substratos de quitosana para regeneração da cartilagem</i>	15
2.4. SULFATO DE CONDROITINA	17
2.4.1. APLICAÇÕES DO SULFATO DE CONDROITINA	19
3.1. MATERIAIS	21
3.2. PREPARO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA PURA	21
3.3. PREPARO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA COM SULFATO DE CONDROITINA	21
3.4. RETICULAÇÃO DAS MEMBRANAS COM TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO ..	22
3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	22
3.5.1. MORFOLOGIA E TOPOGRAFIA DAS MEMBRANAS.....	22
3.5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES.....	23
3.5.3. TESTE DE DEGRADAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	23
3.5.4. INTUMESCIMENTO.....	24
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DAS MEMBRANAS NÃO-RETICULADAS	25
4.1.1. MORFOLOGIA.....	25
4.1.2. TOPOGRAFIA	27
4.1.3. ÂNGULO DE CONTATO	30
4.2. INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM SULFATO DE CONDROITINA	31

4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)	32
4.2.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	37
4.3. ESTUDO DA RETICULAÇÃO.....	39
4.4. INTUMESCIMENTO.....	44
4.5. DEGRADAÇÃO.....	46
<i>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO.....</i>	<i>50</i>
<i>CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</i>	<i>51</i>
<i>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>52</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da quitina.	5
Figura 2.2 – Estrutura da quitosana.	6
Figura 2.3 - Desacetilação da quitina.	7
Figura 2.4 - Ciclo da quitina.	7
Figura 2.5. Quitosana hidratada, projeção no eixo c.	9
Figura 2.6. Estrutura da cartilagem articular.	16
Figura 2.7. Unidades de dissacarídeo do sulfato de condroitina A, sulfato de dermatano (CSB) e sulfato de condroitina C.	18
Figura 2.8. Processo degenerativo da cartilagem articular.	20
Figura 4.2. Membranas de quitosana com sulfato de condroitina: 50x (esquerda) e 100x (direita).	25
Figura 4.1. Membranas de quitosana: 50x (esquerda) e 100x (direita).	25
Figura 4.4. Espectroscopia de energia dispersiva de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (75:25), mostrando a presença de enxofre.	26
Figura 4.3. Microscopia eletrônica de varredura de membranas de quitosana com sulfato de condroitina: composição 70:30 a) 30x e b)150x; composição 75:25 c) 150x.	26
Figura 4.5. Imagem de AFM de uma membrana de quitosana pura (a) área de $7 \times 7 \mu\text{m}^2$; e (b) uma segunda região, com área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$	27
Figura 4.6. Imagem de AFM de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (70:30) (a) área de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$; e (b) uma segunda região, com área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$	28
Figura 4.7. Imagens de contraste (esquerda) de fase e topografia (direita) de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (70:30): (a) e (b) área de $7 \times 7 \mu\text{m}^2$; (c) e (d) área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$	29
Figura 4.8. Espectro no infravermelho da quitosana.	33
Figura 4.9. Espectro no infravermelho do sulfato de condroitina.	34
Figura 4.10. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana com 30% de sulfato de condroitina.	35
Figura 4.11. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina.	35
Figura 4.12. Espectros no infravermelho de uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina.	36
Figura 4.13. Espectros no infravermelho de regiões uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina de diferentes colorações.	37

Figura 4.14. Análise termogravimétrica de membranas de quitosana pura e quitosana com 25% de sulfato de condroitina.	38
Figura 4.15. Esquema da reticulação física da quitosana pelo tripolifosfato de sódio...	39
Figura 4.16. Membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio (1%) por 3h: 50x (esquerda) e 100x (direita).....	40
Figura 4.17. Espectroscopia de energia dispersiva de uma membrana reticulada com 1% de tripolifosfato de sódio por 3h.....	40
Figura 4.18. Espectro no infravermelho do tripolifosfato de sódio.....	41
Figura 4.19. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana reticulada com solução 1% (p/v) $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	42
Figura 4.20. Comparação entre os espectros no infravermelho da quitosana e do tripolifosfato de sódio puros com o da membrana reticulada com solução de 1% (p/v) de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	42
Figura 4.21. Análise termogravimétrica de uma membrana de quitosana e uma membrana de quitosana reticulada com sulfato de tripolifosfato de sódio.....	43
Figura 4.22. Espectros no infravermelho de membranas para um e sete dias de degradação.....	48
Figura 4.23. Espectros no infravermelho de membranas para quatorze dias de degradação.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais propriedades da quitosana, em relação ao seu uso em aplicações biomédicas.....	13
Tabela 4.1. Medidas de ângulo de contato	30
Tabela 4.2. Relação de grupos químicos e suas respectivas bandas ativas na região do infravermelho para a quitosana.	33
Tabela 4.3. Dados de intumescimento.....	45
Tabela 4.4. Dados de degradação das membranas.	46
Tabela 4.5. Leituras de absorvância para o comprimento de onda de 198 nm, para os tempos de um, sete e quatorze dias.....	47

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Devido aos avanços tecnológicos na área de saúde e às melhores condições de vida, a partir do século XX, a esperança de vida da população brasileira tem aumentado. Não obstante ao envelhecimento, a população brasileira ainda apresenta crescimento. Junto a esses avanços na qualidade de vida do brasileiro, cresce a demanda por serviços e tecnologias na saúde, dado os cuidados a serem dispensados à população idosa e ao maior número de acidentes e traumas associados ao aumento da população.

Os sistemas de saúde de diferentes países vêm sofrendo o impacto provocado por um cenário de elevação de gastos e de restrição de recursos de saúde, além da reestruturação dos serviços. Os gestores em saúde têm enfrentado uma demanda por produtos e tecnologias de alto valor agregado, as quais são, em sua maioria, de origem estrangeira. Neste cenário de crescentes gastos e demanda, torna-se justificável o desenvolvimento de tecnologias em saúde em território nacional.

Somente no ano de 2008, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou R\$ 2,5 milhões no tratamento de artrite reumatóide e R\$ 34 milhões com tratamento de queimados (Dados: Datasus, 2009). Ao todo, foram tratados cerca de 9.500 pacientes com artrite e 18.000 pacientes com queimaduras.

Nas últimas duas décadas do século XX, ocorreu uma mudança de paradigma dos materiais bioestáveis para os biodegradáveis para aplicações biomédicas. A tendência atual prevê que, nos próximos anos, os dispositivos usados para aplicações terapêuticas temporárias serão substituídos por dispositivos biodegradáveis que possam ajudar o corpo a reparar e regenerar os tecidos danificados (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A quitosana, um polímero natural biodegradável, tem despertado grande interesse econômico e tecnológico. Embora seja derivada de um resíduo da indústria da pesca, a quitina, a quitosana é um produto de alto valor comercial, por ter várias aplicações industriais. Atualmente, a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais (SANTOS *et al.*, 2003).

No tratamento de ferimentos ou queimadura, a quitosana pode ser empregada sob a forma de filmes de recobrimento ou membranas, soluções coloidais ou esponjas

(DALLAN 2005, Appud: CRAVEIRO e CRAVEIRO, 2000). Pesquisa de mercado feita por DALLAN (2005) identificou cerca de 120 tipos de produtos constituídos de diversos materiais para o tratamento de queimaduras, sendo a maioria de origem importada. No mercado americano, já está disponível o curativo Chitoflex, a base de quitosana, da HemCon[®], custando US\$ 16,95 cada (preço de julho de 2009).

Os sulfatos de condroitina, de forma semelhante à quitosana, também formam uma classe de polímeros naturais de alto valor agregado. Eles são extraídos a partir da cartilagem de peixes, resíduo da indústria da pesca. Sua principal aplicação atual é na indústria farmacêutica, no tratamento da osteoartrite.

A quitosana reage com o sulfato de condroitina, formando um complexo polieletrônico, já utilizado na fabricação de cápsulas para medicamentos com liberação controlada. Esse complexo tem sido estudado como possível substituto da pele e da cartilagem (HEIN *et al.*, 2008).

Apesar da intensa pesquisa na área de quitosana, nota-se a existência de poucos trabalhos enfocando a produção de membranas contendo simultaneamente sulfato de condroitina e quitosana. As informações sobre características físicas, químicas e biológicas ainda são escassas, sendo necessário um estudo mais aprofundado a esse respeito.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar membranas de quitosana de quitosana com sulfato de condroitina 6. Essas membranas poderiam ser empregadas como curativos para queimaduras ou como material para reparo da cartilagem articular.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

Nesse capítulo, é feita uma revisão da literatura acerca das principais propriedades dos polímeros utilizados no presente trabalho. Além disso, é feita uma breve introdução sobre a quitina, polímero natural, matéria-prima para a obtenção da quitosana.

2.1. BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são materiais poliméricos de origem natural ou sintética, que são utilizados em aplicações biomédicas. Em sua maioria, eles são biodegradáveis, o que os tornam mais atrativos do que os biomateriais tradicionais, os quais apresentam problemas de biocompatibilidade e biodegradabilidade, quando implantados por períodos longos de tempo.

Embora as aplicações biomédicas de polímeros degradáveis naturais, como o colágeno, datem de milhares de anos, a aplicação de biopolímeros sintéticos só começou no final da década de sessenta. Tais polímeros possuem propriedades mais uniformes, independentes da batelada, as quais podem ser modificadas para atender requisitos específicos de cada aplicação (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Um grande número de biopolímeros tem sido estudado como materiais para a engenharia de tecidos. Entre eles, estão o poli (ácido lático-co-glicólico), o poli (etileno glicol), o poli (álcool vinílico), o poliuretano e os polímeros naturais como o alginato, a gelatina, o colágeno, o amido, o poli (hidroxibutirato) a quitosana e os glicosaminoglicanos. Dentre estes, os polímeros naturais são de particular interesse, dado que, sendo componentes naturais de seres vivos, apresentam semelhança química e biológica aos tecidos naturais (KIM *et al.*, 2008).

Nesse contexto, os polissacarídeos, como a quitina e a quitosana, têm sido propostos como biomateriais, devido às suas propriedades biológicas únicas. Constituem uma família de macromoléculas formadas por unidades de monossacarídeos, unidas por ligações glicosídicas. Eles possuem um papel crucial em esquemas de sinalização celular e também na área do reconhecimento de imunidade (SUH e MATTHEW, 2000).

Ainda dentro da família dos polissacarídeos, podem ser destacados os glicosaminoglicanos. Esses são heteropolissacarídeos compostos pela repetição de

unidades dissacarídicas. Eles são muito abundantes no corpo, especialmente na pele e na cartilagem. Dentre os mais importantes, podem ser citados os sulfatos de condroitina, o ácido hialurônico e o sulfato de queratano. O ácido hialurônico vem sendo aplicado como um biomaterial estrutural, por causa de sua alta massa molar e capacidade de formar géis. Além disso, já foi demonstrado que ele possui ação anti-inflamatória, assim como efeito inibitório sobre a liberação e degradação dos proteoglicanos, moléculas presentes nos tecidos, em que os glicosaminoglicanos encontram-se ligadas a uma cadeia de proteína. Por outro lado, os glicosaminoglicanos sulfatados possuem alta densidade de carga e não apresentam estrutura cristalina, o que os torna altamente solúveis (SUH e MATTHEW, 2000). Por causa dessa limitação, eles não têm sido explorados como materiais para a engenharia de tecidos, de maneira isolada. Dentre os polissacarídeos, a quitosana se destaca pelo seu amplo leque de aplicações, combinado com suas propriedades biológicas singulares, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade, inércia fisiológica, e atividade antimicrobiana. Ela pode se ligar a glicosaminoglicanos, como o sulfato de condroitina, oferecendo a oportunidade de juntar em um só material as propriedades individuais de cada um dos polímeros.

2.2. QUITINA

A quitina, poli (β -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina) é um polissacarídeo natural de grande importância, descoberto por Braconot em 1884. A Figura 2.1 mostra a unidade repetitiva da quitina. Esse biopolímero é sintetizado por uma enorme quantidade de organismos vivos, sendo o segundo polissacarídeo mais produzido no mundo, depois da celulose. A quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos usuais. Ela tem baixa toxicidade e é inerte no trato gastrointestinal dos mamíferos, devido à presença de quitinases, enzimas envolvidas na reação contra bactérias, encontradas tanto no sistema digestório dos animais, como também nos fungos, bactérias e plantas (RINAUDO, 2006).

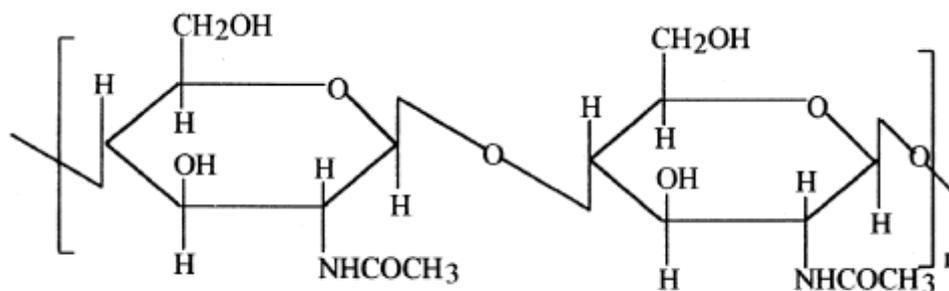


Figura 2.1 – Estrutura da quitina. Adaptada de KUMAR (2000)

Ela ocorre na natureza como microfibrilas cristalinas ordenadas, formando o componente estrutural dos exoesqueletos de artrópodes e das paredes celulares de fungos e leveduras. Também é produzida por uma série de outros organismos dos reinos animal e vegetal, surgindo quando reforço e resistência são necessários (RINAUDO, 2006). Apesar de ocorrer em muitos animais e vegetais, as principais fontes comerciais de quitina são as carapaças de camarão e de caranguejo, descartadas pelas indústrias de pesca. Não sendo aproveitada, a quitina pode se tornar um grande problema de poluição nas regiões costeiras (KUMAR, 2000).

As cascas dos crustáceos contêm de 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e de 40 a 55% de carbonato de cálcio. Neles, a quitina encontra-se firmemente associada aos demais constituintes do exoesqueleto (CANELLA e GARCIA, 2001). Industrialmente, a quitina é extraída por um tratamento ácido para dissolver o carbonato, seguido de uma extração alcalina para solubilizar as proteínas. A despigmentação é executada para a remoção de pigmentos residuais, obtendo, assim, um produto incolor. A quitina resultante deve ser classificada em termos de pureza e cor, dado que resíduos de proteínas podem inviabilizar seu uso especialmente para aplicações biomédicas (RINAUDO, 2006).

Uma grande variedade de aplicações médicas para a quitina já foram propostas, dado que ela é um material biocompatível e biodegradável pela ação da lisozima produzida no intestino dos animais. A quitina tem apresentado bons resultados como material para suturas resistentes ao ataque da bile, da urina e do suco pancreático, como material para curativos e em aplicações de liberação controlada de fármacos.

Seu uso ainda é restrito devido ao fato de ela ser insolúvel na maioria dos solventes usuais. Adicionalmente, a quitina degrada rapidamente, quando dissolvida, o que se constitui e outra limitação (KUMAR, 2000). TOMIHATA e YKADA (1997)

relatam que a quitina perdeu 80% de sua massa inicial, quando imersa em um meio contendo 4 mg/ml de lisozima. Atualmente, sua principal aplicação encontra-se na produção de quitosana, um derivado da quitina utilizada em diversas áreas (DALLAN, 2005).

2.3. QUITOSANA

A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição (DALLAN, 2005). Ela é um polissacarídeo linear, composto de unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina, ligadas por ligações glicosídicas β (1-4), conforme esquematizado na Figura 2.2, sendo encontrada na natureza em pequenas quantidades em muitos tipos de fungos. É o único polímero pseudocatiônico que existe e, portanto, possui muitas aplicações que aproveitam essa sua característica singular (floculantes para recuperação de proteínas, remoção de poluentes, etc.).

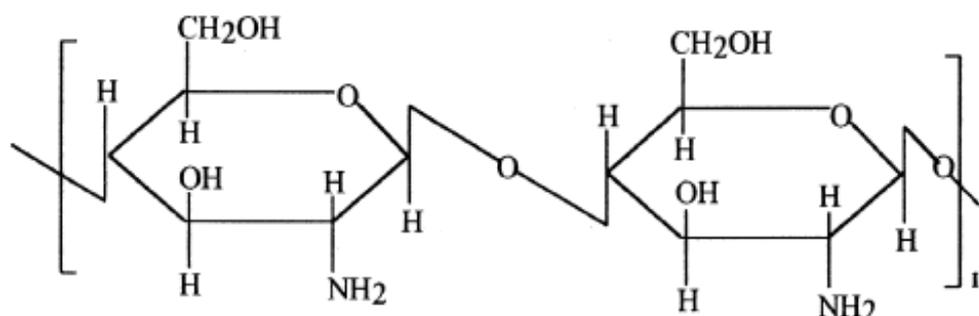


Figura 2.2 – Estrutura da quitosana. Adaptada de KUMAR (2000).

A produção da quitosana ocorre, industrialmente, pela desacetilação alcalina da quitina. Durante o curso da desacetilação alcalina, ligações N-acetil da quitina são rompidas, formando-se a D-glicosamina, que contém um grupo amino livre (DALLAN, 2005). A reação de desacetilação é apresentada na Figura 2.3. Quando a quantidade de D-glicosamina, ou seja, o grau de desacetilação se torna maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel no meio aquoso e o polímero passa a ser denominado quitosana. Outra opção de produção industrial de quitosana se faz através da desacetilação microbiológica, utilizando-se enzimas específicas ou microrganismos (DALLAN, 2005).

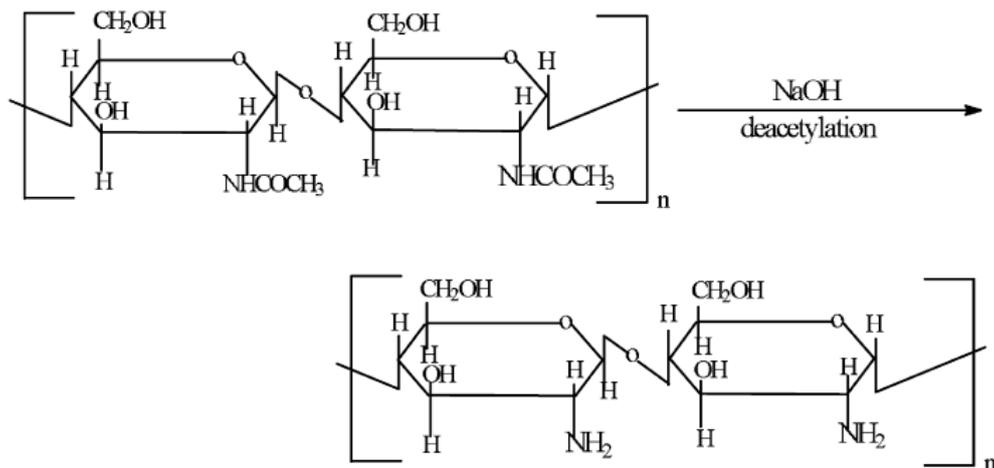


Figura 2.3 - Desacetilação da quitina. Adaptado de KUMAR (2000).

A extração da quitina, quando feita a partir de carapaças de crustáceos descartadas pela indústria de alimentos, é economicamente viável, especialmente se for incluída a recuperação dos carotenóides. As carapaças contêm uma quantidade considerável de astaxantina, um carotenóide muito caro de ser sintetizado, que é vendida como alimento para peixes cultivados em aquaculturas, como o salmão (KUMAR, 2000).

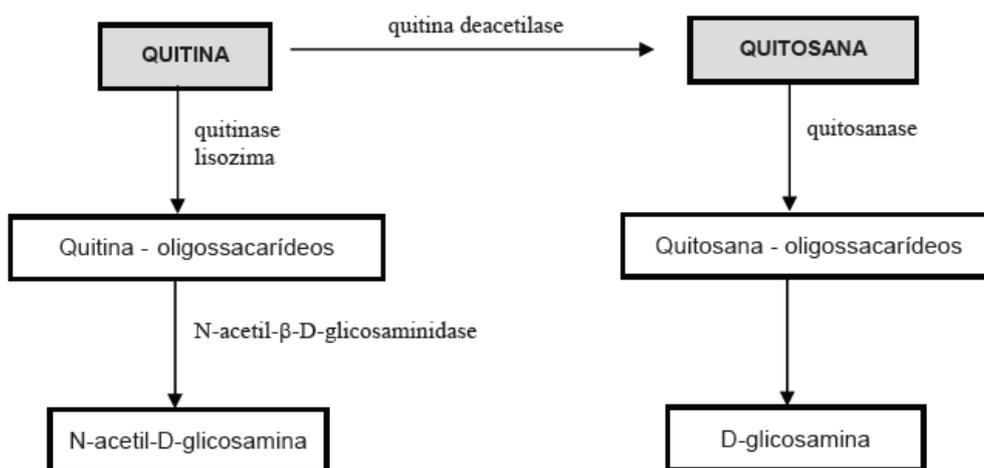


Figura 2.4 - Ciclo da quitina. Adaptado de DALLAN (2005).

Juntas, a quitina e a quitosana são biologicamente sintetizadas em um total de aproximadamente um bilhão de toneladas atualmente, sendo biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza, através do ciclo da quitina, esquematizado na Figura

2.4. As enzimas hidrolíticas envolvidas neste processo (lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase) estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, nas plantas, além de também se encontrarem presentes em microrganismos do solo (DALLAN, 2005).

2.3.1. ESTRUTURA CRISTALINA

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Através de experimentos de difração de raios-X, foram encontradas quatro polimorfos do polímero, sendo três formas hidratadas e uma anidra (VINSOVA e VAVRIKOVA, 2008). Os primeiros dados de difração de raios-X da quitosana, preparada a partir de tendões de lagosta por desacetilação no estado sólido, foram obtidos por CLARK E SMITH em 1937. Eles identificaram uma forma cristalina hidratada, que pode ser convertida à fase anidra por recozimento em água a 240 °C (OKUYAMA *et al.*, 2000).

Essa polimorfa hidratada, denominada quitosana de tendão, é a mais comumente encontrada e apresenta a mesma estrutura que a quitosana disponível no mercado. Ela é composta por quatro cadeias de quitosana e oito moléculas de água, dispostas em uma estrutura ortorrômbica (simetria $P2_12_12_1$), com parâmetros de rede $a = 0,895$ nm, $b = 1,697$ nm e $c = 1,034$ nm (OKUYAMA *et al.*, 2000). Cada cadeia encontra-se na conformação zigzague, que é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os oxigênios 3 e 5, com orientação gauche-trans do oxigênio 6. As cadeias estão dispostas ao longo do eixo c, estando ligadas entre si por ligações de hidrogênio entre o nitrogênio 2 e o oxigênio 6, formando, assim, uma estrutura de camadas, como apresentado na Figura 2.5. As moléculas de água encontram-se entre as cadeias e estabilizam o cristal (VINSOVA e VAVRIKOVA, 2008).

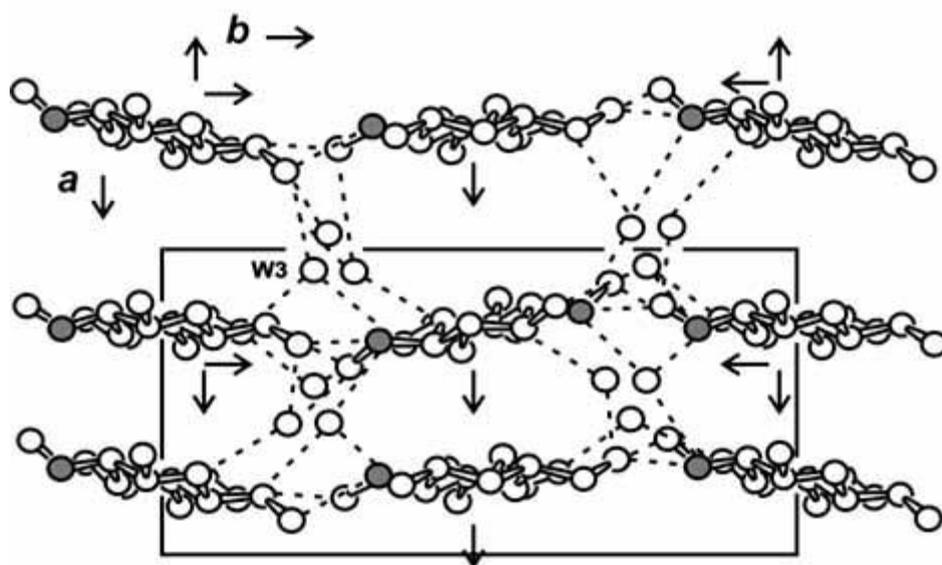


Figura 2.5. Quitosana hidratada, projeção no eixo c. Adaptada de VINSOVA e VAVRIKOVA (2008).

2.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A molécula de quitosana apresenta três tipos de grupos funcionais reativos: um grupo amino e dois grupos hidroxila, um primário e um secundário, nas posições C(2), C(3) e C(6), respectivamente (KIM *et al.*, 2008). O grupo amino é facilmente protonado, melhorando sua solubilidade. Os grupos hidroxila secundários também podem ser substituídos com o objetivo de aumentar a solubilidade do polímero. As hidroxilas primárias, em particular, podem ser substituídas por cadeias, formando polímeros ramificados, ou mesmo copolímeros grafitizado (VINSOVA e VAVRIKOVA, 2008).

A modificação química desses grupos gera inúmeros derivados da quitosana, aumentando o leque de aplicações do polímero. A natureza química da quitosana também possibilita modificações covalentes e iônicas, as quais permitem fazer adequações de suas propriedades mecânicas e biológicas de acordo com a aplicação (KIM *et al.*, 2008). A quitosana pode ser combinada com uma variedade de biomateriais, como o alginato, fosfatos de cálcio, o ácido hialurônico, polímeros sintéticos e fatores de crescimento. Adicionalmente, a natureza catiônica da quitosana é primariamente responsável pelas interações com glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras moléculas negativamente carregadas.

A solubilidade da quitosana depende da distribuição dos grupos amino livres e N-acetila. Ela é normalmente insolúvel em meios neutros e básicos, enquanto que pode ser dissolvida em meios ácidos diluídos. Em tais condições, os grupos amino livres são protonados e a molécula se torna solúvel (SHI *et al.*, 2006). Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SANTOS *et al.*, 2003). Assim sendo, ela pode ser moldada em diferentes formas, como pós, filmes, géis, arcabouços e fibras (RINAUDO, 2006).

As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. O grau de desacetilação está usualmente na faixa de 60 a 100% e influencia não só as propriedades físico-químicas, incluindo conformação da molécula de quitosana, a deformação e a tensão de ruptura, como também as suas biodegradabilidade e atividade imunológica (HSU *et al.*, 2004).

Maiore proliferação celular e resistência mecânica são observadas para quitosana com maior grau de desacetilação (THEIN-HAN *et al.*, 2008). Por outro lado, a taxa de degradação *in vivo* é inversamente proporcional ao grau de desacetilação, podendo a quitosana permanecer inalterada por muitos meses depois de implantada (Di MARTINO *et al.* 2005). Em consequência disso, um rígido controle das condições reacionais é essencial em um processo em escala industrial para que se obtenha um polímero de cadeia longa e com grau de desacetilação na faixa desejada.

2.3.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Embora não seja consenso no meio científico, a quitosana é reconhecidamente segura e não-tóxica ao ser humano. Sua toxicidade é evidenciada apenas quando esta é empregada como suplemento alimentar por longos períodos de tempo e está relacionada com o bloqueio da absorção de cálcio e vitaminas lipossolúveis, podendo acarretar disfunções ósseas, deficiência vitamínica e retardo do crescimento (COSTA SILVA, dos SANTOS *et al.*, 2006).

A quitosana possui atividade antimicrobiana contra muitas bactérias e fungos. Acredita-se que os grupamentos amino positivos das unidades glicosamina interajam com os componentes negativos das paredes celulares das bactérias, suprimindo a biossíntese (SHI *et al.*, 2006). Além disso, a quitosana interrompe o transporte de nutrientes através da parede celular e causa o vazamento de organelas celulares,

acelerando a morte da bactéria. Outro mecanismo proposto envolve a penetração de quitosana de baixa massa molar na célula a qual se liga ao DNA, inibindo a síntese de RNA e proteínas (VINSOVA e VAVRIKOVA, 2008).

Estudos mostraram que a atividade biológica da quitosana está intimamente relacionada às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microorganismo. A solubilidade em água e o tamanho das cadeias influenciam fortemente essa atividade. Geralmente, o tamanho ótimo das cadeias ativas encontra-se na faixa de 2-200 kDa. O pH também é um fator muito importante, posto que, a atividade antimicrobiana da quitosana aumenta, à medida que o pH do meio diminui, como consequência da ionização dos grupos amino da cadeia. Essa atividade é obtida somente para a quitosana modificada, para meios com pH menores que 6,5.

Estudos sugerem que os efeitos do polímero sobre as bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas são distintos. No caso das *gram*-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molar forma películas ao redor célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes. Por outro lado, a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente em bactérias *gram*-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses organismos (COSTA SILVA *et al.*, 2006).

Tanto a quitina, como a quitosana reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana mais eficaz do que a quitina. Esse fato se deve à capacidade da quitosana em agregar tanto as plaquetas, como os eritrócitos pela interação entre as cargas positivas dos grupos amínicos livres com as cargas negativas dos receptores das hemácias. A ação da quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de transformação do crescimento β_1 , que desempenham papel importante na cicatrização (COSTA SILVA *et al.*, 2006).

A quitosana também possui propriedade imunomoduladora, que é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos. Essa explica não só o papel da quitosana na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a degradação desse polímero no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitosana, liberam interleucina 1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese de ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular dos fibroblastos. Eles promovem a migração de neutrófilos, facilitando a

resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que este polímero pode prevenir infecções, quando aplicado diretamente no local da lesão.

2.3.4. APLICAÇÕES DA QUITOSANA

A divulgação comercial da quitosana foi devido a seu uso em produtos dietéticos, como inibidor da ingestão de gorduras (GOMES, 2008). Dentre os mamíferos, o ser humano é exemplo raro em que quitinases estão ausentes, não sendo possível hidrolisar a quitosana de forma extensa. Esta particularidade tem se mostrado como característica interessante, pois, sendo o polímero catiônico, este se encontra solúvel no estômago (faixa de pH entre 1 e 3), porém, precipita no intestino (pH = 6,5), Este é o ponto-chave no mecanismo de ação da quitosana como emagrecedor, pois a mesma interfere na emulsificação de lipídios no estômago e, ao chegar no intestino, devido à precipitação, o complexo não é absorvido (COSTA SILVA et al., 2006).

Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centralizadas na purificação da água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos. A tendência atual para aplicações industriais concentra-se em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos. Recentemente, foi relatado o grande potencial da quitosana na área de biotecnologia, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura (DALLAN, 2005).

Muitos estudos já avaliaram a resposta de tecidos quando em contato com a quitosana. Foi descoberto que ela provocava mínima reação de corpo estranho, com pouco ou nenhum encapsulamento fibroso (Di MARTINO *et al.*, 2005). Considerando ainda suas propriedades biológicas, pode-se concluir que a quitosana é um material adequado para aplicações biomédicas, sendo este o foco de muitos grupos de pesquisa, nas últimas três décadas. Algumas de suas principais aplicações e características estão sumarizadas na Tabela 2.1.

O uso da quitosana como um biomaterial já foi explorado para a restauração de vários tipos de tecido, como pele, osso, cartilagem, de órgãos como fígado, vasos sanguíneos e até mesmo de componentes do sistema nervoso (KIM *et al.*, 2008). Dentre estas, a fabricação industrial de curativos para queimaduras à base de quitosana já é uma realidade e esforços vêm sendo feitos para melhorar as propriedades destes produtos.

Outro campo vastamente estudado é a produção de substratos para a engenharia da cartilagem articular, para o uso no tratamento de doenças degenerativas como a osteoartrite.

Tabela 2.1. Principais propriedades da quitosana, em relação ao seu uso em aplicações biomédicas. Adaptado de RINAUDO (2006).

Aplicações Biomédicas Potenciais	Principais Características
Suturas	Biocompatível
Pele artificial	Biodegradável
Reconstrução óssea	Renovável
Lentes de contato para córnea	Forma filme
Excipiente ou carreador para liberação controlada de fármacos em humanos e animais	Agente hidratante
Material para encapsulamento	Não-tóxico
	Hidrolisado pela lisozima
	Cicatrizante
	Eficiente contra bactérias, vírus e fungos

2.3.4.1. Curativos a base de quitosana

O corpo humano é recoberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele, que, além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corpórea e pela remoção de impurezas (DALLAN, 2005). A cura de uma lesão cutânea é bastante complicada, incluindo uma vasta gama de processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos (KIM *et al.*, 2008).

Corpos estranhos introduzidos na ferida, no ato da lesão, causam respostas inflamatórias, atrasando a cura e, algumas vezes, levando à formação de granulomas ou abscessos (BOATENG *et al.*, 2008). Bactérias patogênicas, como a *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomona aeruginosa* podem ser prejudiciais ao processo de cura.

Curativos formam um importante segmento do mercado mundial de produtos médicos e farmacêuticos. No passado, sua função primária era a de permitir a evaporação dos exsudatos e prevenir a entrada de bactérias na ferida. Os curativos

modernos, por outro lado, baseiam-se no conceito de criar um ambiente ótimo para a movimentação das células epiteliais, para promover o fechamento da ferida. Tais condições ótimas incluem um ambiente úmido ao redor da lesão, circulação efetiva de oxigênio para ajudar na regeneração das células, dos tecidos e reduzir a quantidade de bactérias (BOATENG *et al.*, 2008). Outras características importantes e que devem ser consideradas são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a ausência de antigenicidade (RATNER *et al.*, 2004).

Entre os polímeros naturais mais estudados para a regeneração da pele estão os alginatos, a quitosana, o ácido hialurônico, a celulose, o colágeno, a gelatina e seus derivados. Esses polímeros podem ser usados como agentes gelificantes, excipientes para dar consistência a cremes, matrizes em adesivos, curativos tipo esponja, hidrogéis, membranas e adesivos em sistemas de liberação transdérmica (SILVA *et al.*, 2008). Por ser biodegradável, adesiva, atóxica, bacteriostática, fungistática, hemostática e bactericida, a quitosana se revela como um material excelente para o tratamento de feridas.

HOWLING *et al.* (2001) demonstraram que quitosanas de alto grau de desacetilação foram mais eficientes na modulação da mitogênese dos fibroblastos humanos. CHATELET *et al.* (2001) encontraram que, de uma forma geral, um aumento contínuo da adesão e da proliferação celular é observado para o aumento do grau de desacetilação, tanto para queratinócitos, como para fibroblastos. Tal comportamento foi associado ao fato de que, mesmo para pH neutro, ainda existem sítios catiônicos nas cadeias da quitosana, permitindo interações eletrostáticas com as cargas negativas da superfície das membranas celulares. Quando, o grau de desacetilação aumenta, a densidade de cargas na superfície aumenta, reforçando a adesão.

Muitas aplicações para a quitosana e seus derivados como biomateriais para curativos já foram propostas. Observou-se que os oligossacarídeos da quitosana possuem um efeito estimulante sobre os macrófagos e, tanto a quitosana como a quitina, atraem os neutrófilos tanto *in vitro*, como *in vivo*, o que é essencial para a cura da lesão cutânea (SHI *et al.*, 2006). Estudos mostraram que membranas de quitosana não são citotóxicas, quando testadas com fibroblastos (SILVA *et al.*, 2008) e queratinócitos (CHATELET *et al.*, 2001). Estudos clínicos já provaram que feridas humanas tratadas com membranas de quitosana cicatrizam mais rápido (SANTOS *et al.*, 2007).

Outros estudos enfatizaram a combinação da quitosana com outros materiais, de modo a promover uma cura mais rápida que a quitosana pura. Filmes biodegradáveis de quitosana com alginato se mostraram mais estáveis a variações de pH e promoveram a aceleração do fechamento da ferida em ratos (KHOR e LIM, 2003). HIRANO et al. (2001) mostraram, em seu estudo, que fibras de quitosana recobertas com glicosaminoglicanos ácidos, como o ácido hialurônico, os sulfatos de condroitina e a heparina, possuíam menor resistência mecânica, mas liberavam o glicosaminoglicano, acelerando a cura. PENG *et al.* (2006) testaram as propriedades bactericidas de composições de quitosana com sulfato de condroitina. Seus resultados apontaram que o aumento da proporção de sulfato de condroitina provocou um aumento no número de bactérias, de modo que o efeito bactericida seria causado somente pela quitosana. Entretanto, os autores consideraram que o material pode funcionar como um biomaterial bactericida.

2.3.4.2. *Substratos de quitosana para regeneração da cartilagem*

A cartilagem é um tecido essencial para o funcionamento normal das articulações, agindo como amortecedor e como lubrificante. Embora seja um tecido resistente, ele pode ser danificado por uma variedade de agentes mecânicos, químicos e microbiológicos. Como conseqüências do dano ao tecido, surgem sintomas como a artrite (NEWMAN, 1998).

É um tecido altamente especializado composto por uma matriz avascular, aneural e alinfática, sintetizada pelos poucos e esparsos condrócitos que nela residem (AIGNER e McKENNA, 2002). A matriz é um arranjo complexo de macromoléculas, incluindo colágenos, proteoglicanos e proteínas não-colagenosas, como mostrado na Figura 2.6. Juntas, essas substâncias mantêm um nível adequado de água na matriz, o que garante a resistência à compressão do tecido (NEWMAN, 1998).

Em um nível supramolecular, a cartilagem consiste de dois componentes básicos: a matriz fibrilar e a extrafibrilar. A fibrilar é uma rede composta principalmente por colágenos, predominantemente de colágeno tipo II. A matriz extrafibrilar consiste, majoritariamente, de proteoglicanos, compostos por proteínas e glicosaminoglicanos. A resistência à tração do tecido é conferida pela rede de colágeno, que evita a expansão do proteoglicano. Sob a ação de esforços compressivos, o tecido é rígido e se recupera

rapidamente, pela absorção de água dos proteoglicanos hidrofílicos (AIGNER e McKENNA, 2002).

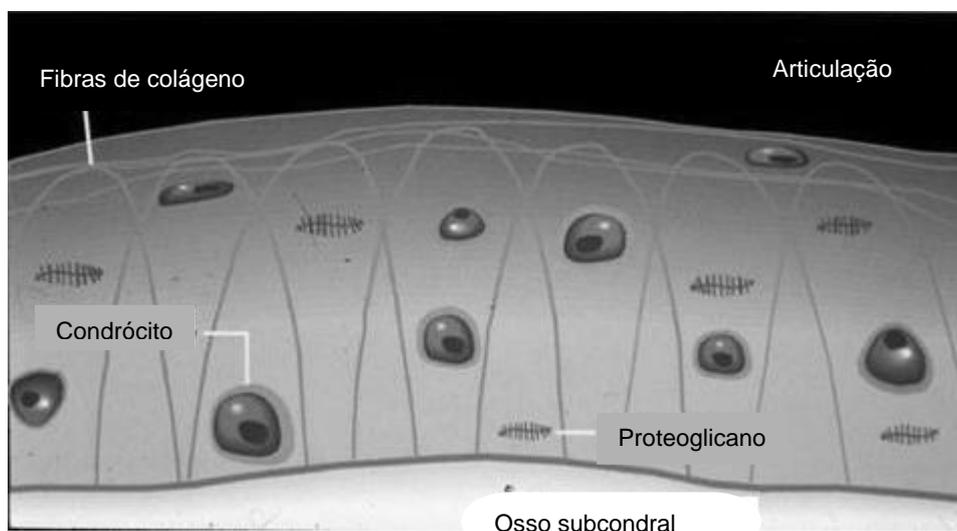


Figura 2.6. Estrutura da cartilagem articular. Adaptado de http://www.hss.edu/condition_14135.asp.

Por mais de dois séculos, acreditou-se que a cartilagem, uma vez danificada, não podia mais ser reparada, por causa de sua natureza avascular. Essa percepção da resposta de cura ineficiente e incompleta da cartilagem suscitou o interesse profissional em todo e qualquer método que pudesse facilitar o processo de reparo. Entre as técnicas propostas, a engenharia de tecidos está entre as mais promissoras.

A aplicação da engenharia de tecidos ao reparo da cartilagem foi primeiramente proposta em 1977 (SUH e MATTHEW, 2000). Nesse contexto, condrócitos cultivados em um meio *ex vivo* seriam transplantados para um defeito do tecido *in vivo*. Para sucesso do reparo, a escolha do biomaterial é fundamental. Muitos materiais sintéticos, como o poli (ácido glicólico), e naturais, como o colágeno, já foram propostos como substâncias para o reparo da cartilagem.

A substância ideal para essa aplicação deveria ser aquela que melhor reproduz o ambiente natural da matriz extracelular do tecido. Estudos mostraram que componentes específicos presentes na matriz extracelular da cartilagem, como o colágeno tipo II e os glicosaminoglicanos são essenciais para que ocorra a condrogênese, tanto *in vitro*, como *in vivo* (SUH e MATTHEW, 2000). Sendo a cadeia da quitosana estruturalmente similar àquela dos glicosaminoglicanos, considera-se este polímero como um candidato muito atraente para mimetizar a matriz extracelular natural da cartilagem.

Adicionalmente, a natureza hidrofílica da quitosana facilita a adesão, proliferação e diferenciação celular (THEIN-HAN *et al.*, 2008).

A formação de complexos polieletrônicos da quitosana com glicosaminoglicanos carregados negativamente tem sido usada como forma de imobilizar sulfatos de condroitina, para mimetizar a matriz extracelular das articulações. Isto porque a quitosana possui um efeito protetor contra a hidrólise de glicosaminoglicanos (KIM *et al.*, 2008). SECHRIEST *et al.* (2000) evidenciaram a característica condrogênica de hidrogéis de quitosana com glicosaminoglicanos. Estudos posteriores (CHEN *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2007 e CHEN *et al.*, 2008) confirmaram que tais combinações permitiram a diferenciação de condrócitos e que os tecidos finais eram semelhantes à cartilagem natural.

2.4. SULFATO DE CONDROITINA

Os sulfatos de condroitina são componentes importantes da maioria dos tecidos dos vertebrados. Eles estão presentes, predominantemente nas matrizes extracelulares das células e são mais abundantes nos tecidos conjuntivos, na cartilagem, na pele, nos vasos sanguíneos, como também nos ossos, ligamentos e tendões. Esses tecidos também contêm proteínas fibrilares, principalmente colágeno e suas propriedades são determinadas pela quantidade e orientação dessas fibras e pela concentração de glicosaminoglicanos, como os sulfatos de condroitina. Onde o colágeno apresenta uma orientação única, como nos ligamentos e tendões, os tecidos suportam tração e o conteúdo de sulfato de condroitina é tipicamente baixo. Por outro lado, quando as fibrilas de colágeno não possuem orientação específica, como na pele, existe uma alta concentração de sulfato de condroitina e o tecido tende a se alongar sob tensão, mas é resiliente e resiste, também, à compressão (HARDINGHAM, 1998).

Os sulfatos de condroitina são glicosaminoglicanos naturais, sintetizados pelas células ligados covalentemente a proteínas, sendo secretados para a matriz extracelular na forma proteoglicanos, como o agrecan, o qual é considerado como uma parte importante da cartilagem articular (HARDINGHAM, 1998). Atribui-se ao proteoglicano agrecan a capacidade de reter água na matriz de colágeno da cartilagem, garantindo as propriedades estruturais do tecido (WANG *et al.*, 2007). Estudos mostram que os sulfatos de condroitina apresentaram propriedades antiinflamatórias *in vivo* e conseguiram regular *in vitro* o metabolismo dos condrócitos, como o estímulo à síntese

de proteoglicanos e colágeno e a inibição de citocinas envolvidas na degradação da cartilagem (PENICHE *et al.*, 2007). Os glicosaminoglicanos também podem seqüestrar proteínas e levá-las aos sítios apropriados para ativação. Essa função permite que eles sejam capazes de influenciar a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células (CHEN *et al.*, 2006).

A digestão da cartilagem pela ação da enzima papaína consegue liberar os glicosaminoglicanos que estão ligados a uma cadeia de proteína nos proteoglicanos. Depois de remover as proteínas, os sulfatos de condroitina podem ser separados e purificados. As fontes conhecidas de sulfatos de condroitina são os anéis cartilagosos da traquéia bovina, as orelhas de porcos e a cartilagem de tubarões (GARNJANAGOONCHORN *et al.*, 2007). Nos tecidos, existem uma série de formas de sulfatos de condroitina, como o sulfato de condroitina 4 ou sulfato de condroitina A (CSA), o sulfato de condroitina 6, ou sulfato de condroitina C (CSC) e o sulfato de dermatano, ou sulfato de condroitina B (FOOT e MULHOLLAND, 2005). As unidades repetitivas dos sulfatos de condroitina são apresentadas na Figura 2.6. Os sulfatos de condroitina 4 e 6 são os mucopolissacarídeos mais abundantes no corpo humano e são os glicosaminoglicanos predominantes na cartilagem para formar o proteoglicano agregam (CHEN *et al.*, 2006). A exata concentração desses polímeros na matriz extracelular do tecido cartilaginoso pode variar de acordo com a idade e com o estado de desenvolvimento do indivíduo.

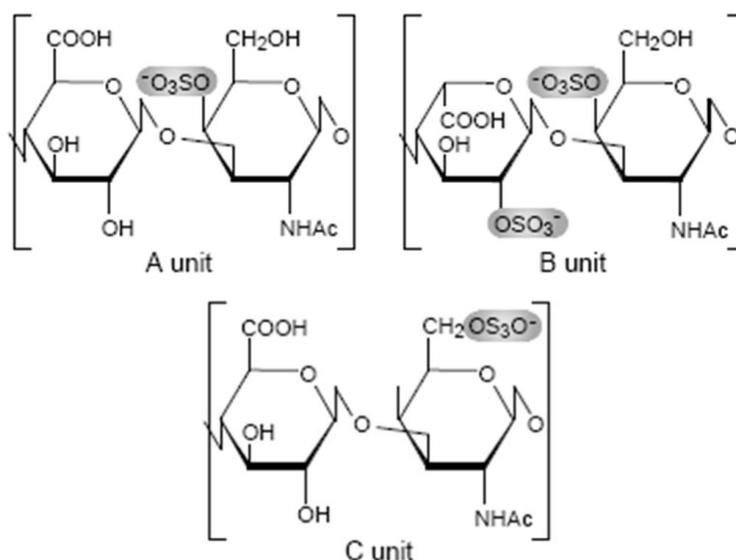


Figura 2.7. Unidades de dissacarídeo do sulfato de condroitina A, sulfato de dermatano (CSB) e sulfato de condroitina C. Adaptado de SUGAHARA *et al.* (2003).

Glicosaminoglicanos formam complexos com polímeros contendo grupos imino ou amino. Os complexos de poliânion formados com proteínas (gelatina, caseína, colágeno, miosina e fibrina) e com polissacarídeos (quitosana, alginato) possuem propriedades reparadoras e são adequados para curativos (PONEDEL’KINA *et al.* 2008). DENUZIERE *et al.* (1996) estudaram os complexos formados pela interação do sulfato de condroitina com a quitosana. Eles mostraram que os grupamentos carboxílicos e sulfato do sulfato de condroitina poderiam formar grupos funcionais negativamente carregados, quando em meio levemente ácido, e reagir com as moléculas de quitosana carregadas positivamente.

Testes de citocompatibilidade feitos por DENUZIERE *et al.* (1998) mostraram que os complexos de polieletrólito formados pela quitosana com o sulfato de condroitina são citocompatíveis, porém os resultados obtidos para a quitosana pura eram superiores àqueles obtidos para os complexos. A formação de complexos remove a carga individual dos polímeros, modificando, de certa forma, a estrutura química necessária para o reconhecimento celular (PENICHE *et al.*, 2007).

2.4.1. APLICAÇÕES DO SULFATO DE CONDRITINA

Nas doenças degenerativas das articulações, como a osteoartrite, ocorrem dano e perda da cartilagem articular. Um estágio crucial do processo degenerativo é a perda dos proteoglicanos da cartilagem e a exposição da rede de colágeno à ruptura mecânica (HARDINGHAM, 1998). O processo degenerativo da osteoartrite é ilustrado na Fig. 2.7.

O sulfato de condroitina tem sido largamente utilizado como tratamento para a osteoartrite. Estudos clínicos confirmaram os efeitos terapêuticos da ingestão oral de cápsulas de sulfato de condroitina sobre pacientes com osteoartrite, os quais apresentaram melhoras na função da articulação e redução de dores (GARNJANAGOONCHORN *et al.*, 2007). No entanto, a eficácia na redução de dor pela ingestão de glicosaminoglicanos ainda é questionada (WANNMACHER, 2006).



Figura 2.8. Processo degenerativo da cartilagem articular. Adaptado de <http://diegozanon.com.br/?p=106>.

Por ser um polímero solúvel em água, o sulfato de condroitina é de difícil moldagem. Por isso, seu uso como biomaterial está limitado à sua incorporação, ou complexação, com outros materiais. A combinação do sulfato de condroitina com o colágeno é a mais estudada, dado que os dois polímeros são componentes naturais das matrizes celulares, tanto da pele como da cartilagem.

Os sulfatos de condroitina possuem um papel importante no processo de fechamento de feridas. Por isso, uma gama de estudos recentes têm usado o sulfato de condroitina como um biomaterial para o reparo da cartilagem, para a engenharia de tecidos e para a liberação de fatores de crescimento (ZOU *et al.*, 2009).

Como já foi ressaltado, os sulfatos de condroitina possuem um papel crucial nas funções biológicas das atividades celulares. Estudos mostraram que eles regulam o fechamento e a contração de feridas. Observou-se que o sulfato de condroitina 4 promove a proliferação e inibe a adesão celular, enquanto tanto a proliferação quanto a adesão são promovidas pelo sulfato de condroitina 6 (ZOU *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Para a obtenção das membranas, foram utilizados como reagentes quitosana, extraída da carapaça de caranguejos (Sigma Aldrich Co.), sulfato de condroitina 6 extraído da cartilagem de tubarões (Fluka Analytical), acetato de amônio P. A. e ácido acético glacial (VETEC Química Fina Ltda.).

3.2. PREPARO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA PURA

A solução de quitosana 2% (p/v) foi obtida pela dissolução do pó do polímero em ácido acético 0,2M. Para produzir as membranas, a solução foi colocada sobre placas de Petri de poliestireno e, então, posta a secar a temperatura ambiente.

3.3. PREPARO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA COM SULFATO DE CONDRITINA

As membranas de quitosana com sulfato de condroitina (70:30 e 75:25 p/p) foram produzidas seguindo uma adaptação da metodologia proposta por RANA *et al.* (2007). O percentual em massa total na solução foi mantido em 4% (p/v) e a massa de sulfato de condroitina também foi estabelecida em 80 mg para todas as membranas. A quantidade dos demais reagentes foram calculadas, mantendo as mesmas proporções utilizadas no trabalho de referência.

De um modo geral, as soluções finais foram obtidas a partir de uma mistura de:

- 50% de solução de quitosana 2% (p/v) em ácido acético 0,2 M;
- 8,3% de solução aquosa de acetato de amônio 14M;
- 16,7% de solução aquosa de sulfato de condroitina; e
- 25% de água Mili-Q.

Para preparar a solução final, misturou-se, primeiramente o acetato de amônio à solução de quitosana, mantida sob agitação magnética. Em seguida, a solução de sulfato de condroitina foi gotejada usando uma vazão de, aproximadamente, 67 μ l/min. Para garantir a obtenção de uma mistura homogênea, manteve-se a solução sob agitação por

12 horas. As membranas foram produzidas, a partir da solução final, seguindo o mesmo procedimento utilizado para a obtenção daquelas de quitosana pura.

Devido à grande dificuldade de retirar as membranas com 30% de sulfato de condroitina do substrato e de verter a membrana pela sua baixa viscosidade, essa composição foi abandonada. Conseqüentemente, as membranas do estudo de degradação possuem, todas, 25% de sulfato de condroitina e 75% de quitosana.

3.4. RETICULAÇÃO DAS MEMBRANAS COM TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO

Com o intuito de aumentar a resistência das membranas à degradação em condições fisiológicas, foi promovida sua reticulação pelo agente tripolifosfato de sódio. O procedimento adotado foi a imersão completa das membranas em uma solução de tripolifosfato de sódio (MERCK) 1% (p/v) por 3h a 37 °C. Essas condições de reticulação foram selecionadas após estudos prévios. A eficiência da incorporação do reticulador às membranas foi avaliada por espectroscopia no infravermelho e por espectroscopia de energia dispersiva.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

3.5.1. MORFOLOGIA E TOPOGRAFIA DAS MEMBRANAS

A visualização da morfologia das membranas foi, primeiramente, feita através de microscopia ótica, usando o microscópio Olympus BX 60M, do Laboratório de Microscopia Ótica e Metalografia. Foram feitas imagens, usando aumentos de 50, 100 e 200x.

Para melhor avaliar a morfologia da superfície das amostras, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura. As membranas foram recobertas com ouro e analisadas através do microscópio JEOL 2000 FX, do Laboratório Multi-usuário de Microscopia Eletrônica usando aumentos de 50 e 150x.

A topografia das membranas foi observada utilizando microscopia de força atômica (AFM). Foram feitas análises no modo contato intermitente, sob condições ambiente, usando o microscópio Nanowizard Atomic Force Microscope (JPK Instruments AG), do Laboratório de Caracterização de Superfícies. Foram escolhidas

regiões aleatórias na amostra, com tamanhos de 7x7, 5x5 e 3x3 μm^2 . As imagens foram analisadas, através do software JPK Image (JPK Image AG).

3.5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES

Para analisar a composição das amostras foram utilizadas as técnicas de espectroscopia no infravermelho com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A análise por ATR-FTIR das amostras foi feita com o equipamento Spectrum 100 (Perkin Elmer Inc.). As membranas foram colocadas diretamente sobre o cristal e pressionadas uniformemente, de modo que todas as membranas recebessem a mesma pressão. Os espectros foram obtidos no modo transmitância na faixa de 600 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 1 cm^{-1} . Foram feitos espectros de várias regiões das membranas produzidas, para avaliar se suas composições eram homogêneas. Por outro lado, uma análise qualitativa da composição química das amostras foi realizada por EDS modelo EDX Noran acoplado ao MEV, para identificar a presença de enxofre, elemento característico do sulfato de condroitina.

O ângulo de contato entre as membranas e a água foi medido, usando o goniômetro Ramé-Hart 190 CA (Ramé-Hart Instrument Co.). O ângulo foi medido usando o método da gota estática. Devido a problemas durante a execução, pela variação rápida do ângulo de contato com o tempo, foram tomadas seis medidas para cada amostra.

Adicionalmente, foram feitas análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivativa (DTG). A análise termogravimétrica foi feita, usando fluxo de nitrogênio e uma faixa de temperaturas de 20 a 700 $^{\circ}\text{C}$ e uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.5.3. TESTE DE DEGRADAÇÃO DAS MEMBRANAS

O teste de degradação das membranas de quitosana, puras e reticuladas, e de quitosana com sulfato de condroitina foi feito utilizando solução *phosphate buffer saline* (PBS). Os ensaios foram realizados à temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$, durante 1, 7 e 14 dias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A degradação foi caracterizada como perda de massa. Assim sendo, cada uma das amostras foi pesada, enquanto seca, no início do experimento e depois de transcorridos 1, 7 e 14 dias. Para diminuir o erro na pesagem, cada amostra foi pesada quatro vezes. A perda de massa foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

A liberação da quitosana para o meio, durante o teste de degradação, foi evidenciada pela análise no espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 1601 PC (Shimadzu Corporation) do Laboratório de Química de Interfaces e Sistemas Coloidais. Para tanto, o sobrenadante referente a cada ensaio foi diluído e analisado.

3.5.4. INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento de membranas de quitosana, quitosana reticulada, quitosana com sulfato de condroitina foi avaliado pela imersão de amostras das mesmas em PBS. O teste foi feito em triplicata para cada composição, sendo um total de 12 amostras.

Após 1, 3 e 24 horas de imersão, as amostras foram retiradas do PBS e pesadas em balança analítica, sempre removendo o excesso de solução. Para reduzir o erro da pesagem, cada amostra foi pesada quatro vezes.

O grau de intumescimento foi avaliado como o ganho percentual de massa das amostras úmidas e foi calculado como o seguinte:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DAS MEMBRANAS NÃO-RETICULADAS

4.1.1. MORFOLOGIA

A morfologia da superfície das membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina foi observada no microscópio ótico. Todas as membranas não reticuladas apresentaram superfície lisa, com a presença eventual de bolhas, como pode ser observado nas micrografias das Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente. Além disso, riscos, provenientes das ranhuras do próprio substrato de poliestireno, durante o processo de formação da membrana, foram observados. Tais problemas foram corrigidos, pela utilização de placas estéreis, também de poliestireno, as quais não apresentavam riscos na superfície, mesmo quando observadas ao microscópio ótico.



Figura 4.1. Membranas de quitosana: 50x (esquerda) e 100x (direita).

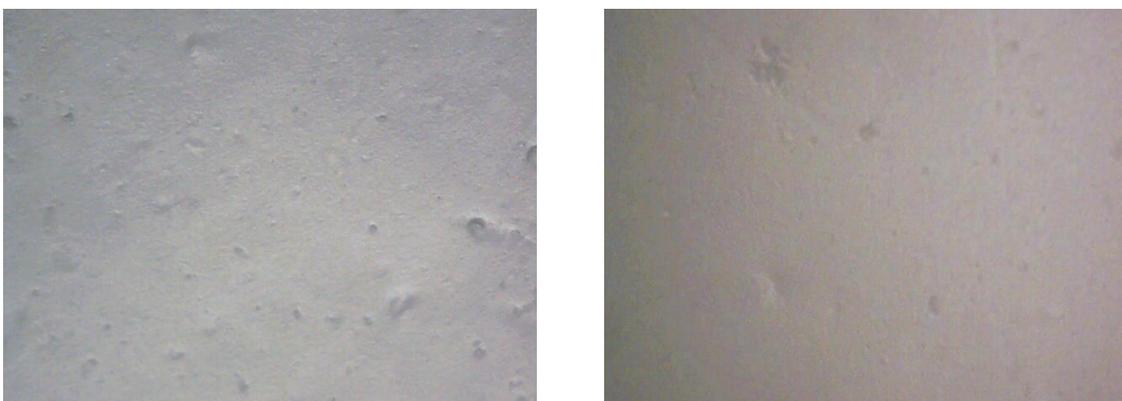


Figura 4.2. Membranas de quitosana com sulfato de condroitina: 50x (esquerda) e 100x (direita).

Independente da composição, as membranas, mesmo quando observadas no MEV, apresentaram superfícies lisas, como pode ser visto na Figura 4.3 para a quitosana com sulfato de condroitina. A Figura 4.3c se distingue das outras micrografias apresentadas,

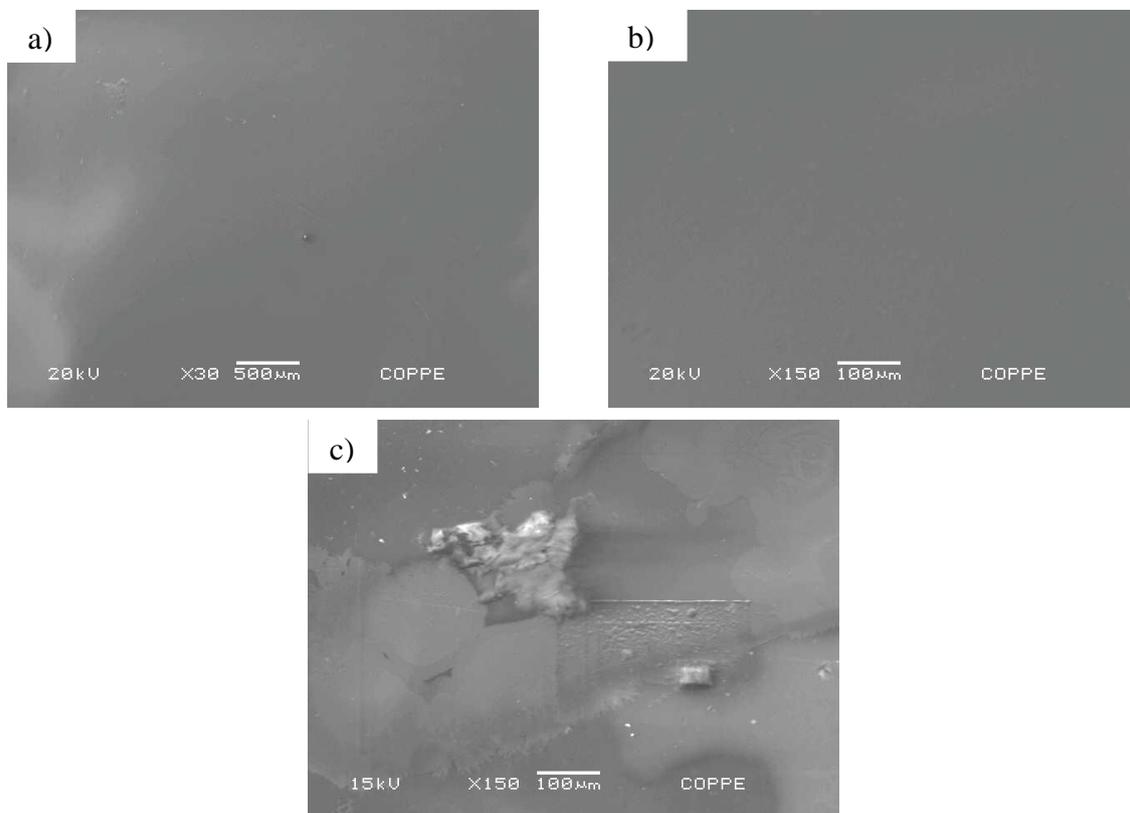


Figura 4.3. Microscopia eletrônica de varredura de membranas de quitosana com sulfato de condroitina: composição 70:30 a) 30x e b)150x; composição 75:25 c) 150x.

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi utilizada para identificar os constituintes de cada uma das amostras. O sulfato de condroitina foi identificado pela presença de enxofre no espectro, como apresentado na Figura 4.4.

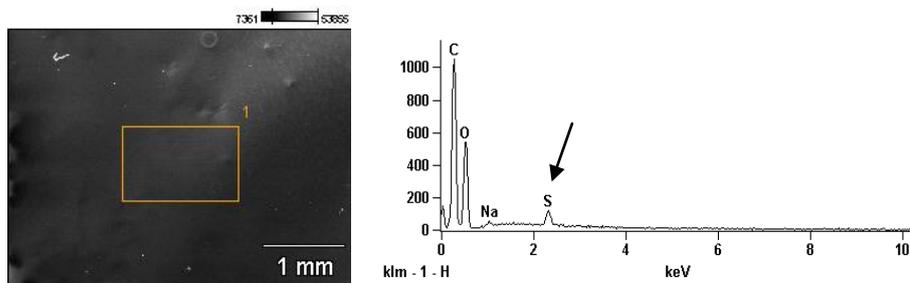


Figura 4.4. Espectroscopia de energia dispersiva de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (75:25), mostrando a presença de enxofre.

4.1.2. TOPOGRAFIA

A microscopia de força atômica (AFM), no modo contato intermitente, foi utilizada para analisar a topografia, tanto de membranas de quitosana pura, como de membranas de quitosana com sulfato de condroitina. As imagens produzidas estão apresentadas nas Figuras 4.5 e 4.6.

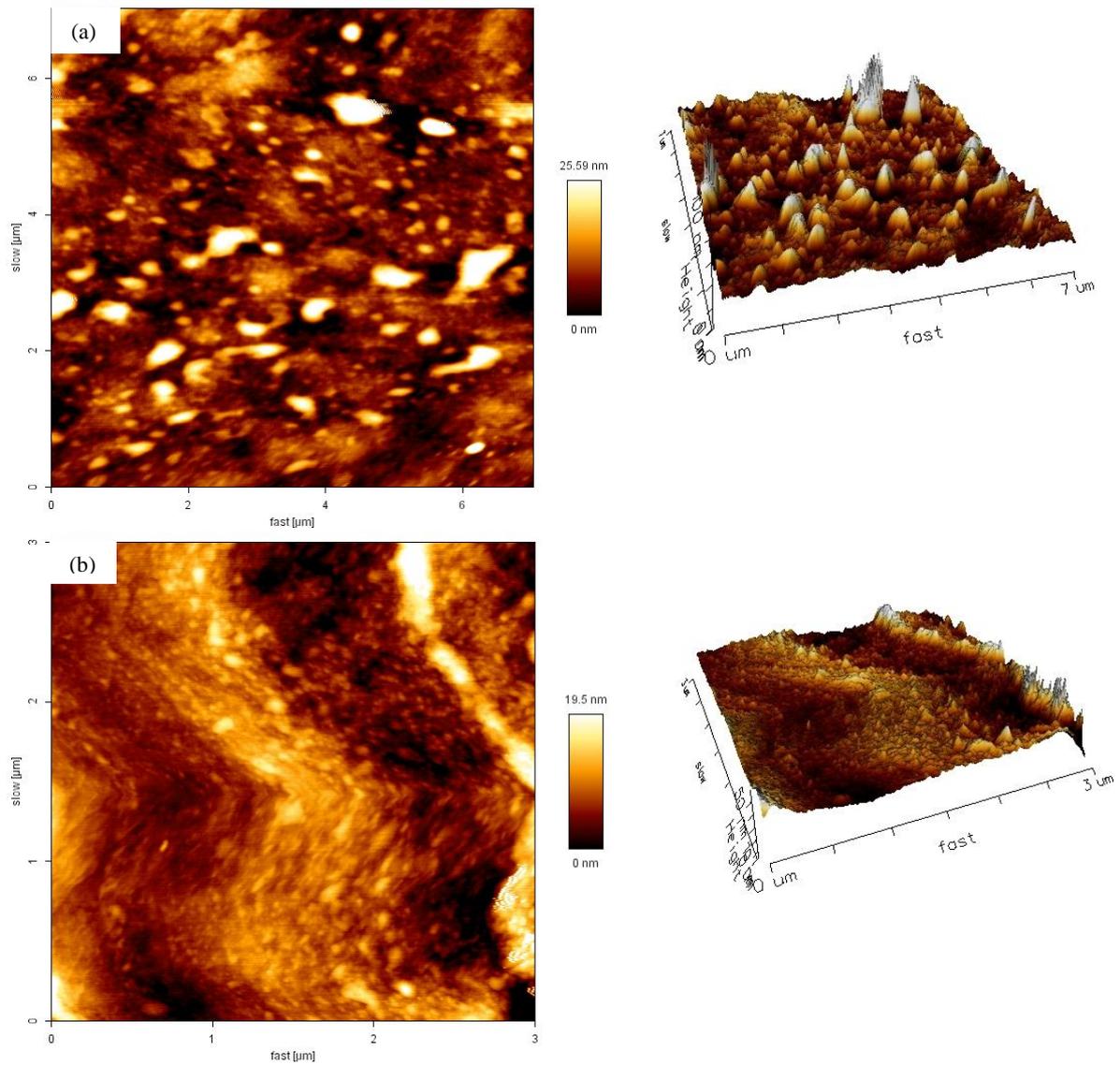


Figura 4.5. Imagem de AFM de uma membrana de quitosana pura (a) área de $7 \times 7 \mu\text{m}^2$; e (b) uma segunda região, com área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$.

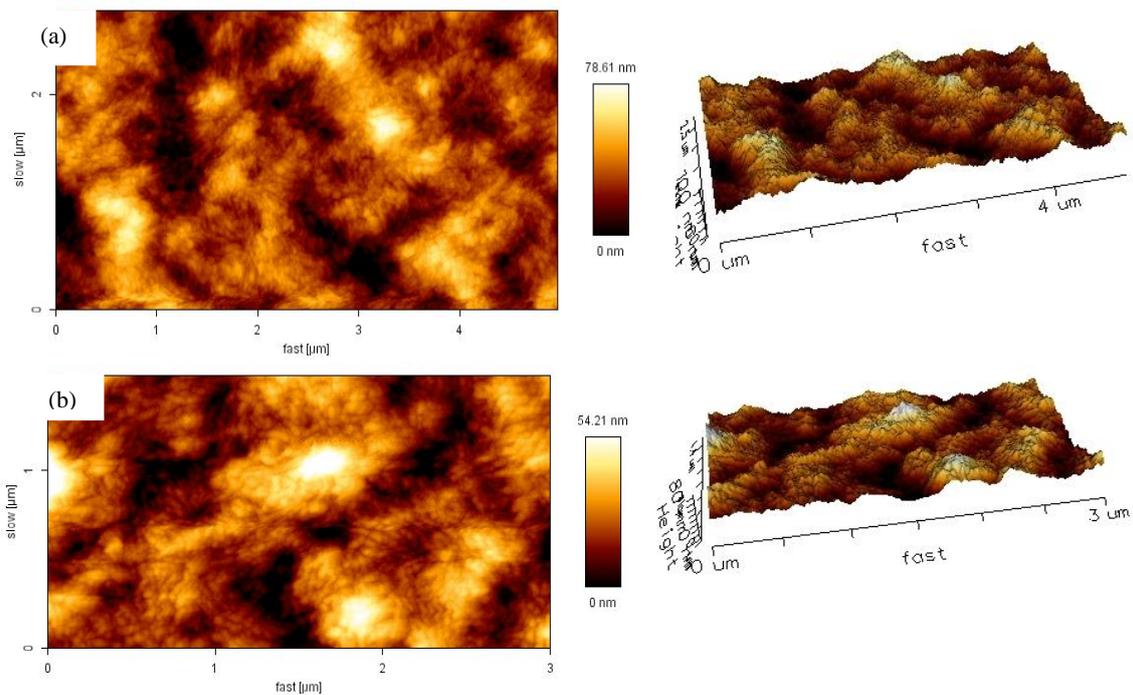


Figura 4.6. Imagem de AFM de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (70:30) (a) área de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$; e (b) uma segunda região, com área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$.

Na superfície da membrana de quitosana, podem ser observados domínios nodulares, distribuídos ao longo do filme. Os nódulos são vistos como os picos mais claros e as bolhas, correspondem às regiões mais escuras. Os relevos mais altos possuem alturas na faixa de 25 nm. ASSIS *et al.* (2003) encontraram a mesma estrutura para filmes de quitosana pura, produzidos por automontagem. Segundo os autores, os núcleos encontrados são, provavelmente, aglomerados de cadeias poliméricas resultantes da interação em meio aquoso e da subsequente deposição conjunta sobre o substrato sólido. Estrutura similar também foi relatada por ORREGO e VALENCIA (2009).

Já a superfície da membrana quitosana com sulfato de condroitina exibe uma estrutura composta por nano fibrilas, distribuídas homogeneamente. A superfície apresentou maior rugosidade, em relação à quitosana pura, tendo relevos maiores. Alteração similar da estrutura da superfície foi observada por KARAKEÇILI *et al.* (2008), para a quitosana modificada com o fator de crescimento epidermal.

Em geral, as imagens das superfícies das amostras de quitosana pura e daquelas com 30% de sulfato de condroitina mostraram estruturas de topografia irregular, com a eventual presença de bolhas. Os relevos na superfície aumentaram, pela adição do sulfato de condroitina.

Para as membranas de quitosana com sulfato de condroitina, foram feitas imagens no modo de contraste de fase, com o objetivo de diferenciar os dois polímeros. As imagens produzidas pela varredura da amostra estão mostradas nas Figuras 4.7 e 4.8.

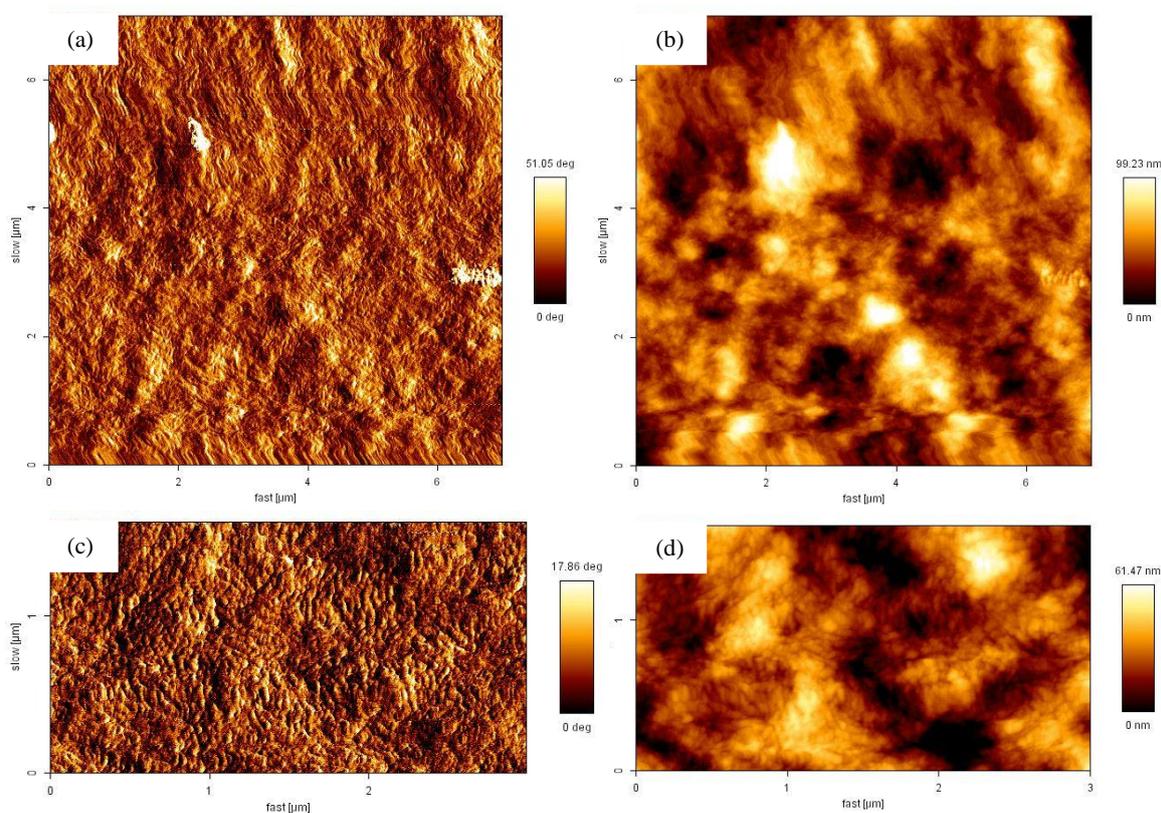


Figura 4.7. Imagens de contraste (esquerda) de fase e topografia (direita) de uma membrana de quitosana com sulfato de condroitina (70:30): (a) e (b) área de $7 \times 7 \mu\text{m}^2$; (c) e (d) área de $3 \times 3 \mu\text{m}^2$.

A imagem de contraste de fase mostra que a superfície é, aparentemente, homogênea. Dessa forma, não foi possível diferenciar entre os dois polímeros presentes. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que a quitosana e o sulfato de condroitina possuem estruturas químicas muito semelhantes.

Os meros de ambos os polímeros apresentam unidades glicosamina ligadas por ligações glicosídicas, sendo diferenciados, basicamente pelos grupos laterais. Por causa de tal semelhança, torna-se difícil distinguir entre o sulfato de condroitina e a quitosana pela imagem de AFM.

4.1.3 ÂNGULO DE CONTATO

O objetivo dos testes de ângulo de contato com a água é avaliar a hidrofobicidade da superfície das amostras. A tomada de medida foi feita pelo método secante. Estudos relatam que materiais com alta energia de superfície promovem alta adesão e proliferação celular (SILVA *et al.*, 2008). ZHENG *et al.* (2009) reportaram que a diminuição do ângulo de contato favoreceu a adesão, proliferação e diferenciação de células da linhagem PC12.

Os valores médios de ângulo de contato, com seus respectivos intervalos de confiança, medidos estão listados na Tabela 4.1. Não foi observada uma diferença significativa no ângulo de contato, devido à adição de sulfato de condroitina.

Tabela 4.1. Medidas de ângulo de contato

Composição	Valor da medida do ângulo de contato
Quitosana pura	$78,6 \pm 8,9^\circ$
Quitosana com sulfato de condroitina	$87,8 \pm 6,5^\circ$

Como pôde ser observado na literatura, os valores de ângulo de contato da quitosana com a água são bastante dispersos. HSU *et al.* (2004), HAMILTON *et al.* (2006) e TSAI e WANG (2008) encontraram valores próximos a 80° . Por outro lado, SHI *et al.* (2008) e ZHENG *et al.* (2009) relataram valores próximos a 70° . Essa discrepância nos resultados deve estar associada à dificuldade de medir o ângulo de contato no exato momento em que a gota toca a superfície da membrana e pela rápida absorção da água pela mesma.

WIEGEL *et al.* (1999) reportaram o valor do ângulo de sulfato de condroitina 6 com a água como sendo $75,4^\circ$. Os autores relatam que o polímero possui uma alta capacidade de ligar-se à água. Por outro lado, existem grandes grupos hidrofóbicos ao longo de três unidades monossacarídicas e que se repetem ao longo de toda a estrutura.

Atribui-se a hidrofiliabilidade da quitosana aos grupos hidroxila e amino presentes em sua estrutura (TSAI e WANG, 2008). As cargas positivas, que surgem quando os grupos amino encontram-se protonados, diminuem a energia livre da superfície, melhorando a molhabilidade dos filmes (ZHENG *et al.*, 2009).

O ângulo de contato entre filmes de quitosana e a água tende a diminuir com o aumento do grau de desacetilação da quitosana. Tal aumento pode estar relacionado ao

maior número de grupos amino livres, para altos graus de desacetilação. A protonação dos grupos amino em pH neutro, resultando em uma superfície carregada positivamente, que favorece tanto o molhamento, como a adsorção de células e proteínas (HAMILTON *et al.*, 2006).

A adição de sulfato de condroitina à quitosana tende a reduzir a quantidade de grupos amino livre, pela interação eletrostática entre os dois polímeros. Tal ligação reduz a densidade de carga positiva e, conseqüentemente, aumenta o ângulo de contato. Os dados obtidos no presente trabalho não permitiram observar tal redução, pois não houve diferença significativa entre as medidas feitas para a quitosana e para o sulfato de condroitina.

4.2. INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM SULFATO DE CONDRUITINA

A interação eletrostática, em meio aquoso, entre os grupos amino da quitosana e um polímero aniônico leva à formação de um complexo polieletrônico (PEC). Tais complexos se formam por interações físicas entre um polímero catiônico e um polímero aniônico, quando esses se encontram misturados em meio aquoso (PIAI, 2008). Durante a complexação, o PEC pode formar um coacervato ou um hidrogel compacto. Entretanto, se as interações iônicas forem muito fortes, formam-se precipitados. Esse fenômeno foi observado nesse trabalho na primeira tentativa de se produzir a membrana.

Usualmente, esse problema pode ser solucionado pela adição de um sal ao meio, o qual reduz a atração entre os polímeros de cargas opostas e pode, com isso, evitar a precipitação. Dessa forma, nenhuma separação de fase ocorre e uma blenda viscosa e macroscopicamente homogênea é obtida, que pode gelificar e formar filmes (BERGER *et al.*, 2004).

Os poliânions mais comumente usados para formar complexos polieletrônicos com a quitosana são os polissacarídeos, as proteínas e alguns polímeros sintéticos. Em particular, a simples mistura do sulfato de condroitina com a quitosana gera um complexo insolúvel devido à forte interação dos grupos amino protonados da quitosana com os grupos sulfato. Para que se consiga obter uma solução de quitosana com sulfato de condroitina, sem a formação de precipitados, deve ser adicionado um agente para capturar cargas positivas da quitosana e diminuir a interação entre os dois polímeros.

RANA *et al.* (2007) propuseram a adição de uma solução concentrada de acetato de amônio, 14 a 17M, à mistura de quitosana com sulfato de condroitina para evitar a formação de precipitados. Dessa maneira, as soluções podem ser secas para formar filmes.

4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho fornece informações sobre vibrações e moleculares presentes no material. A transformada de Fourier da espectroscopia no infravermelho oferece uma alta razão entre sinal e ruído e alta acurácia espectral (RATNER, 2004). É um método analítico padrão, freqüentemente usado para caracterizar a estrutura de polímeros.

O espectro é obtido pela passagem da radiação pela amostra, registrando os comprimentos de onda para os quais as bandas de absorção aparecem (COOPER *et al.*, 2004). As bandas são geradas pela absorção da radiação e sua conversão em movimentos específicos das ligações químicas. O modo de reflectância total atenuada (ATR) do FTIR tem sido muito usado na análise de biomateriais. A profundidade de penetração da radiação é de 1-5 μm , o que gera informações a partir de uma grande região na amostra (RATNER, 2004).

A técnica FTIR-ATR foi utilizada para identificar, por meio das bandas características, os grupamentos químicos típicos de cada polímero que constituíam as membranas. Para tal, foram feitos espectros de quitosana, do sulfato de condroitina e, neles, foram marcadas as principais bandas, como mostrado nas Figuras 4.8 e 4.9.

Segundo COSTA Jr. e MANSUR (2008), a quitosana pode exibir bandas nas regiões dos comprimentos de onda mostrados na Tabela 4.2. Além disso, BEPPU *et al.* (1999) identificaram as bandas de 1077 e 1036 cm^{-1} como correspondendo à vibração do grupo amina. As bandas estão mostradas no espectro da Figura 4.8, gerado pela análise do pó de quitosana, como recebido.

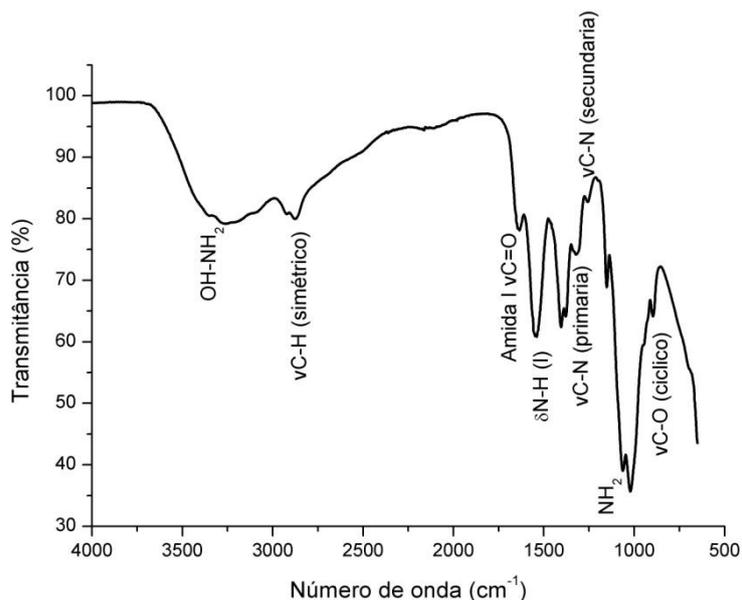


Figura 4.8. Espectro no infravermelho da quitosana.

Tabela 4.2. Relação de grupos químicos e suas respectivas bandas ativas na região do infravermelho para a quitosana. Adaptada de COSTA Jr e MANSUR (2008).

Bandas (cm⁻¹)	Grupo químico
3570 – 3200 3450	νOH ligado νNH ₂
2955 –2845 2922	νC-H (assimétrico)
2878	νC-H (simétrico)
1900 – 1500 1658	Amida I νC=O
1650 – 1550 1658 – 1630	δN-H (I)
1570 – 1515 1560	δN-H (II)
1465 1423	δOH e CH ₂ (tesoura)
1340 – 1250 1379	δC-N (terciária)
1321	νC-N (primário)
1260	νC-N (secundário)
1154 e 896	νCOC (glicose -β-1-4)
1160 1154	Hidrogênio ligado
1300 – 1000	νC-O (cíclico)
897	νC-O (cíclico)
1640 - 1690	νC=NO (fraca) (Base Schiff)

FOOT e MULHOLLAND (2005) identificaram como bandas características do sulfato de condroitina 6, aquelas aparecendo para o número de onda de 825 cm^{-1} , devido à vibração do grupo C-O-S, para 1240 cm^{-1} , que corresponde ao grupo S=O e uma banda para 1650 cm^{-1} , gerada pelo grupo amida I. Para números de onda acima de 2000 cm^{-1} , os autores dizem que o espectro é dominado pelo estiramento do grupo hidroxila. Adicionalmente, RANA *et al.* (2007) atribui a banda em 1130 cm^{-1} à vibração do grupo HSO_3^- . Essas bandas foram identificadas no espectro do pó de sulfato de condroitina de sódio, como mostrado na Figura 4.9.

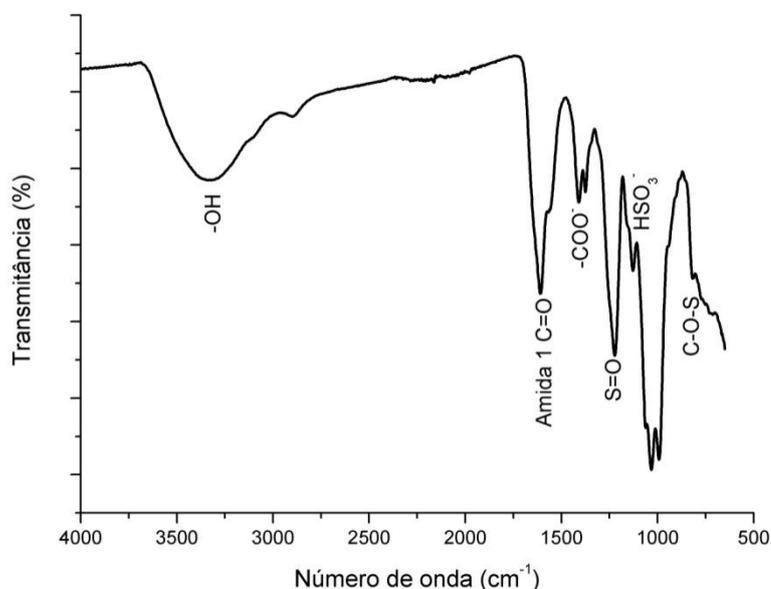


Figura 4.9. Espectro no infravermelho do sulfato de condroitina.

RANA *et al.* (2007) relatam que a força da ligação entre a quitosana e o sulfato de condroitina nas membranas está relacionada à intensidade da banda situada em torno de 1155 cm^{-1} . Os espectros obtidos para amostras com 25 e 30%, em massa, de sulfato de condroitina estão mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11.

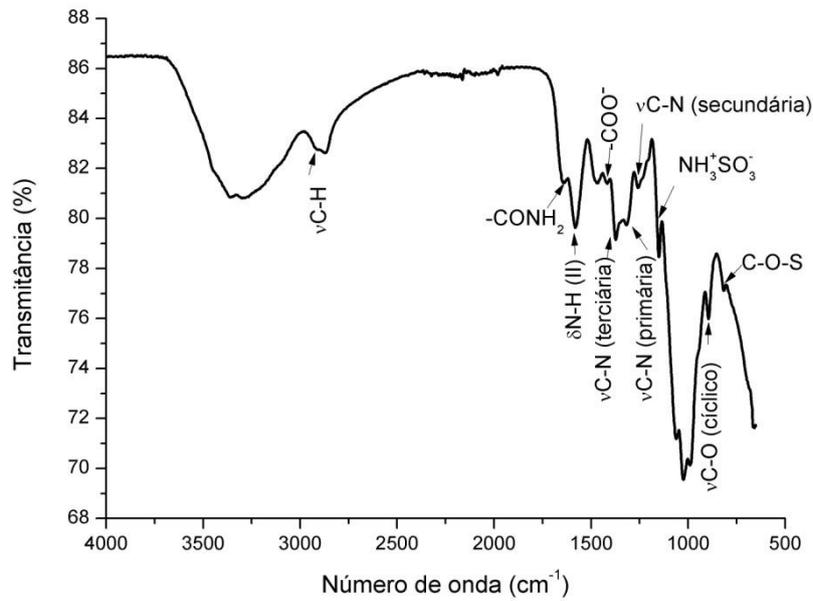


Figura 4.10. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana com 30% de sulfato de condroitina.

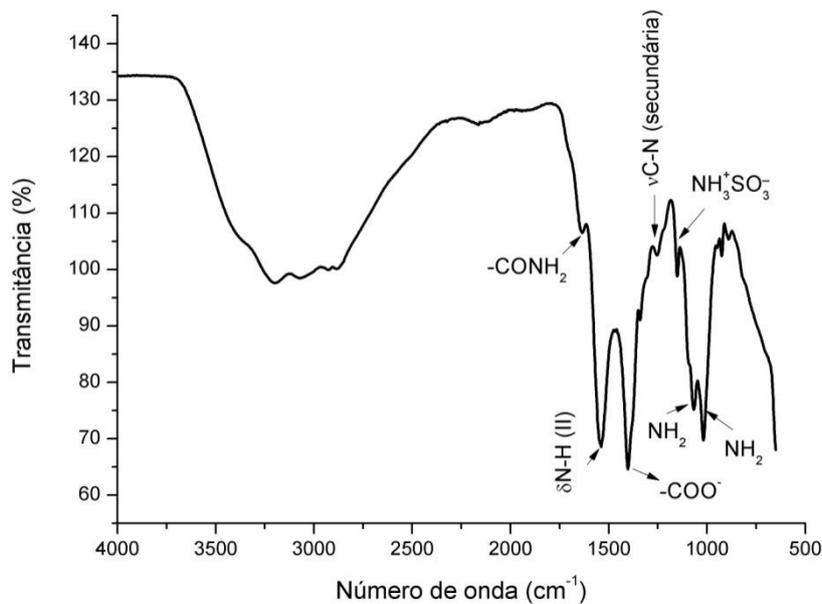


Figura 4.11. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina.

Em ambos os espectros, a banda de interação entre os dois polímeros é encontrada. A intensidade dessa banda diminuiu, para o aumento na proporção de quitosana na membrana, pois a quantidade de ligações $\text{NH}_3^+\text{SO}_3^-$ também diminuiu. No espectro da membrana com 75% de quitosana foi encontrada uma menor quantidade de bandas características do sulfato de condroitina.

Para verificar se as membranas possuíam uma composição uniforme, foram feitos espectros em vários pontos das amostras, inclusive em pontos de coloração e espessuras diferentes. Os espectros estão mostrados na Figura 4.12 e 4.13. Pode-se observar que os espectros obtidos são muito semelhantes. Todos eles exibem a banda característica de interação entre os polímeros a 1155 cm^{-1} . As demais bandas de absorbância são típicas do espectro da quitosana. Entretanto, suas intensidades são diferentes, sendo mais intensas nos espectros da borda.

Independente da coloração, as diferentes regiões da membrana exibiram as mesmas bandas de absorbância, inclusive com intensidades semelhantes. A banda de interação $\text{NH}_3^+\text{SO}_3^-$ foi detectada nos dois espectros, sendo a única não pertencente ao espectro característico da quitosana.

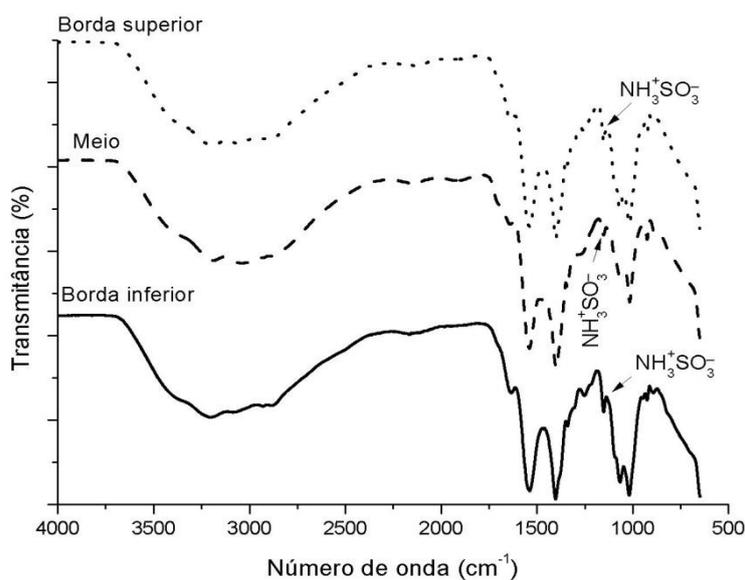


Figura 4.12. Espectros no infravermelho de uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina.

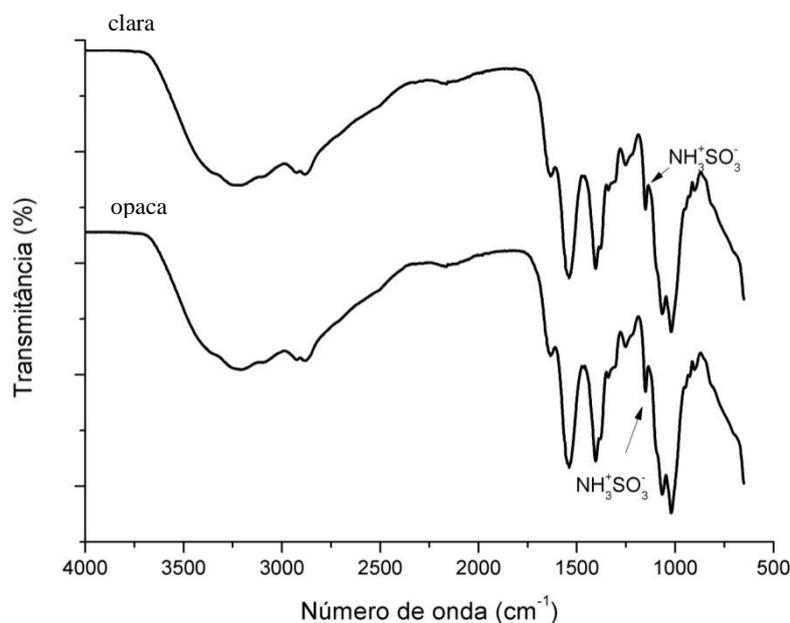


Figura 4.13. Espectros no infravermelho de regiões uma membrana de quitosana com 25% de sulfato de condroitina de diferentes colorações.

4.2.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica é definida como um processo contínuo que envolve a medida de variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo a uma temperatura constante (LUCAS *et al.*, 2001). O resultado da análise é, em geral, mostrado sob a forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros de temperatura (ou do tempo) e a ordenada, o percentual de massa perdido ou ganho.

O efeito sobre a temperatura de decomposição da quitosana, causado pela adição do sulfato de condroitina foi estudado por TGA. O termograma registrado pela análise é apresentado na Figura 4.14.

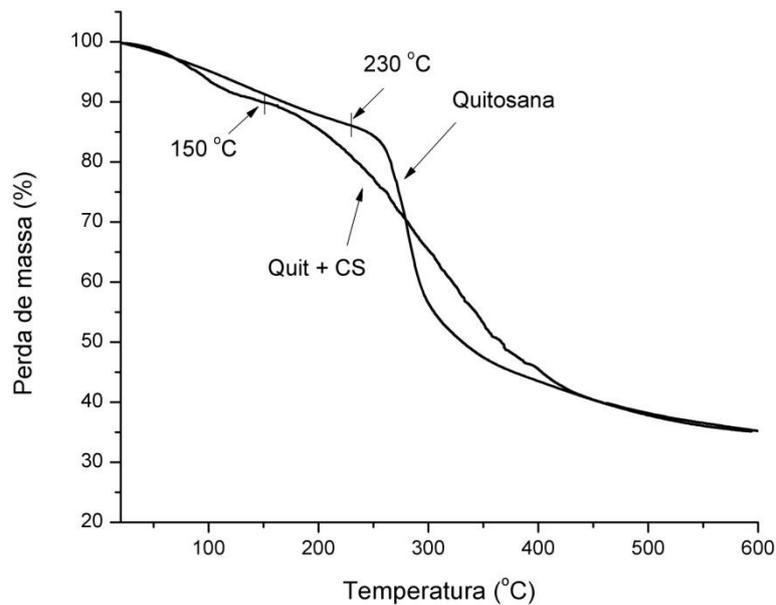


Figura 4.14. Análise termogravimétrica de membranas de quitosana pura e quitosana com 25% de sulfato de condroitina.

A temperatura de início de degradação da membrana de quitosana foi de 230 °C. A adição de 25% de sulfato de condroitina reduziu essa temperatura para 150 °C. Entretanto, a análise da membrana com sulfato de condroitina apresentou um maior percentual de massa residual para a temperatura de 600 °C. Adicionalmente, pode-se observar que a decomposição da quitosana é mais acelerada do que a decomposição da membrana contendo os dois polímeros.

A termogravimetria derivativa (DTG) da membrana de quitosana mostrou que a temperatura para a qual ocorreu o máximo da degradação foi de 280 °C. A mesma análise feita para a membrana com 25% de sulfato de condroitina forneceu uma temperatura de 260 °C.

ORREGO e VALENCIA (2009) encontraram valores de temperatura de decomposição de 272 °C. Em seu estudo, também foram relatados valores encontrados, experimentalmente por outros autores. Todas as temperaturas reportadas encontravam-se entre 280 e 300 °C.

CHEN *et al.*, (2005) e PIAI (2008) estudaram a estabilidade térmica de complexos polieletrônicos de quitosana com sulfato de condroitina. Os dois estudos encontraram uma temperatura de decomposição do sulfato de condroitina puro próxima a 250 °C. Nos dois trabalhos, encontraram-se temperaturas de degradação dos complexos polieletrônicos intermediárias àquelas dos polímeros puros, tal qual a encontrada no presente estudo.

4.3. ESTUDO DA RETICULAÇÃO

A resistência mecânica e a maleabilidade das membranas da quitosana são limitadas principalmente para aplicação como filmes em bandagens, por exemplo, e, por isso, a mistura da mesma com outros materiais é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse. O grande desafio consiste em obter um material que resista de forma controlada à degradação em ambiente fisiológico.

Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação deste polissacarídeo, pode-se utilizar reticulantes. Eles permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes, além de bloquear os grupos amino com um agente bifuncional (COSTA Jr. e MANSUR, 2008). A quitosana pode ser reticulada, por vários agentes químicos, incluindo o glutaraldeído, o formaldeído, o ácido sulfúrico, ácidos carboxílicos e por agentes físicos, como a genipina o tripolifosfato de sódio e o alginato.

Recentemente, o uso de complexação entre macromoléculas de cargas opostas para reticular compostos de quitosana têm atraído muita atenção, por este processo ser bastante simples. Além disso, a reticulação reversível causada por interações eletrostáticas, no lugar de ligações químicas, é proposta para evitar toxicidade e outros efeitos indesejáveis (SHU e ZHU, 2002).

A imersão de membranas de quitosana em uma solução de tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) induz uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados da quitosana, como mostrado na Figura 4.15. A reticulação da quitosana previne que o polímero seja dissolvido em meio ácido e introduz grupos fosfatos, os quais possuem sítios básicos que poderão interagir com íons H_3O^+ e íons metálicos em solução aquosa (LAUS *et al.*, 2006).

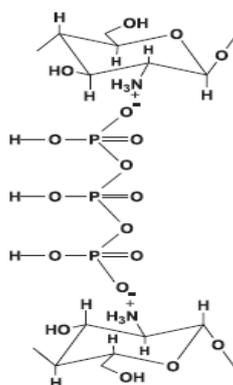


Figura 4.15. Esquema da reticulação física da quitosana pelo tripolifosfato de sódio. Adaptada de LAUS *et al.* (2006).

As micrografias de microscopia ótica das membranas reticuladas exibiram superfícies lisas, com a presença de precipitados, supostamente do reticulador tripolifosfato de sódio. A Figura 4.16 apresenta micrografias de baixo aumento de membranas de quitosana reticulada com solução 1% (p/v) de tripolifosfato de sódio por 3h.

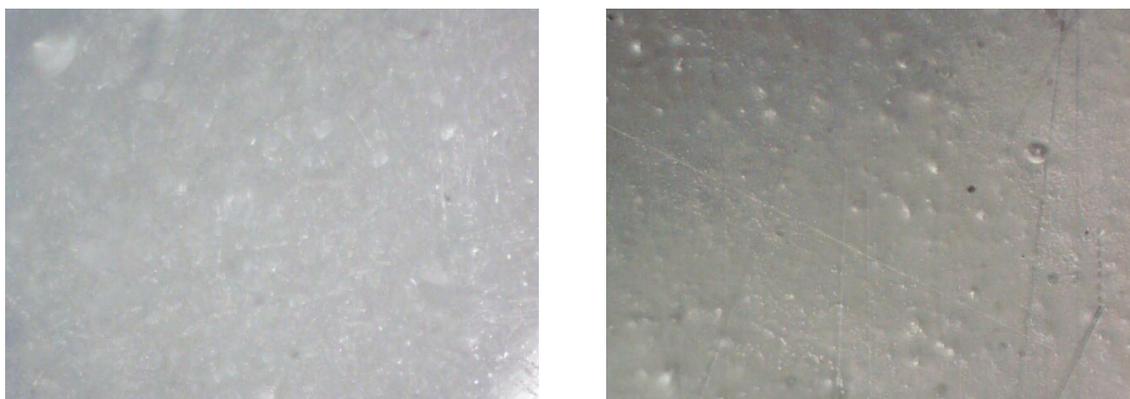


Figura 4.16. Membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio (1%) por 3h: 50x (esquerda) e 100x (direita).

Através de EDS, pôde-se avaliar a composição química de partículas encontradas por microscopia eletrônica de varredura sobre a superfície das amostras. Como pode ser visto na Figura 4.17, a análise pontual do precipitado indica a presença de fósforo e sódio. Isto confirma que as partículas são de reticulador.

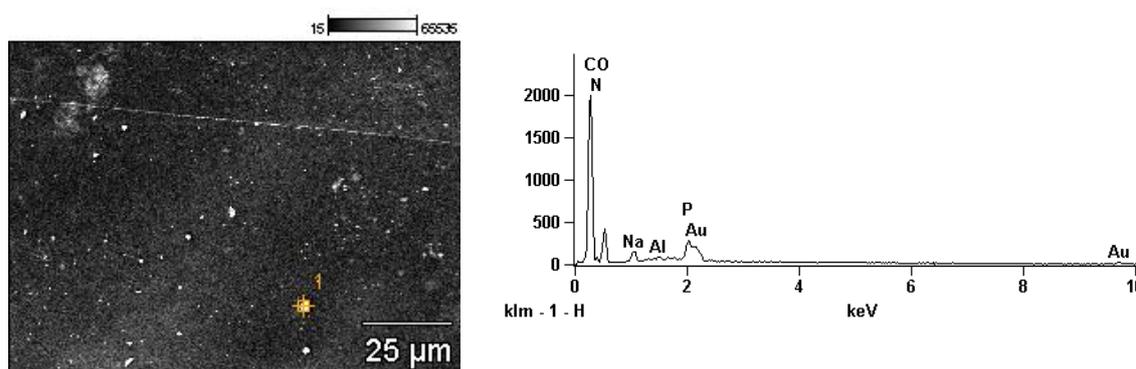


Figura 4.17. Espectroscopia de energia dispersiva de uma membrana reticulada com 1% de tripolifosfato de sódio por 3h.

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para verificar a presença das bandas do tripolifosfato no espectro das amostras reticuladas. Os espectros foram feitos para números de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} .

LIN *et al.* (2007) relatam que o reticulador tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) possui bandas características de absorção para números de onda entre 1200 e 1250 e de 1050 cm^{-1} , os quais representam a presença do grupo $\text{P}=\text{O}$ e o grupo R-O-P-O , respectivamente. Adicionalmente, LAUS *et al.* (2006) identificaram uma banda de absorbância para o número de onda de 889 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo $\text{P}=\text{O}$. O espectro do reagente tripolifosfato de sódio pode ser observado na Figura 4.18.

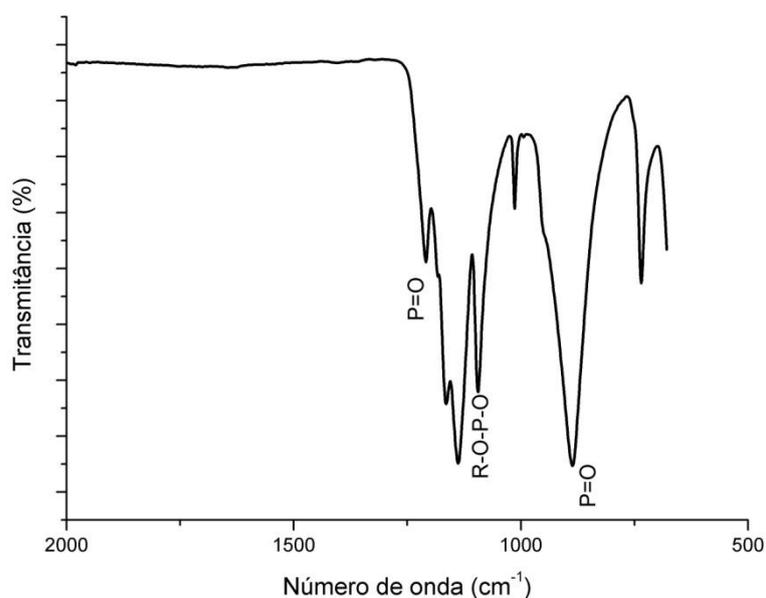


Figura 4.18. Espectro no infravermelho do tripolifosfato de sódio.

As Figuras 4.19 e 4.20 apresentam, respectivamente, os espectros típicos de uma membrana de quitosana reticulada com solução 1% (p/v) de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ e uma comparação entre os espectros da quitosana e do reticulador puros e da membrana reticulada.

Como pode ser visto na Figura 4.18, foi identificada uma banda muito pequena, para o comprimento de onda de 1200 cm^{-1} , indicando a presença do grupo R-O-P-O na membrana de quitosana. Também foi identificada uma banda de absorbância para o comprimento de onda de 1550 cm^{-1} , correspondente ao grupo amino protonado. Isso indica a presença de interações iônicas da quitosana (LAUS *et al.*, 2006). Essas duas bandas mostram que existe uma interação entre o grupo amino e o fosfato.

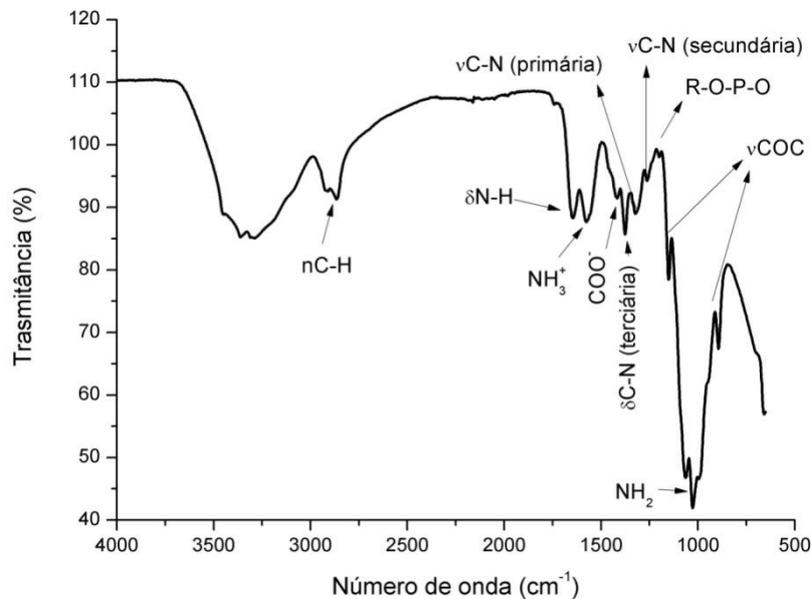


Figura 4.19. Espectro no infravermelho de uma membrana de quitosana reticulada com solução 1% (p/v) $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$.

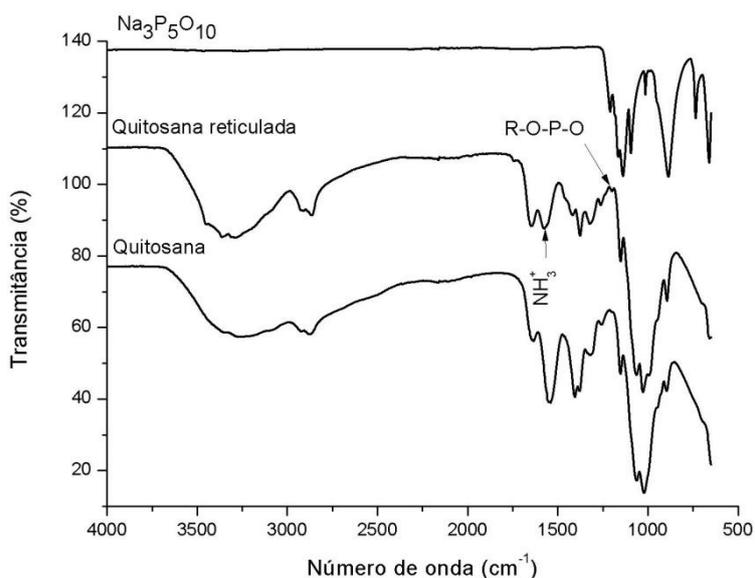


Figura 4.20. Comparação entre os espectros no infravermelho da quitosana e do tripolifosfato de sódio puros com o da membrana reticulada com solução de 1% (p/v) de $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$.

A reticulação foi, então, confirmada pela análise de FTIR. No entanto, foi, também, detectado um excesso de reticulador sobre a superfície das membranas por microscopia ótica e EDS. Assim sendo, é necessário rever a concentração da solução utilizada ou mesmo reavaliar toda a metodologia de reticulação, para evitar esse acúmulo. Adicionalmente, seria adequado filtrar a solução de reticulador.

O efeito da reticulação sobre a temperatura de degradação da quitosana foi estudado através da análise termogravimétrica. O gráfico de percentual de perda de massa por temperatura da quitosana pura e da quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio é apresentado na Figura 4.21.

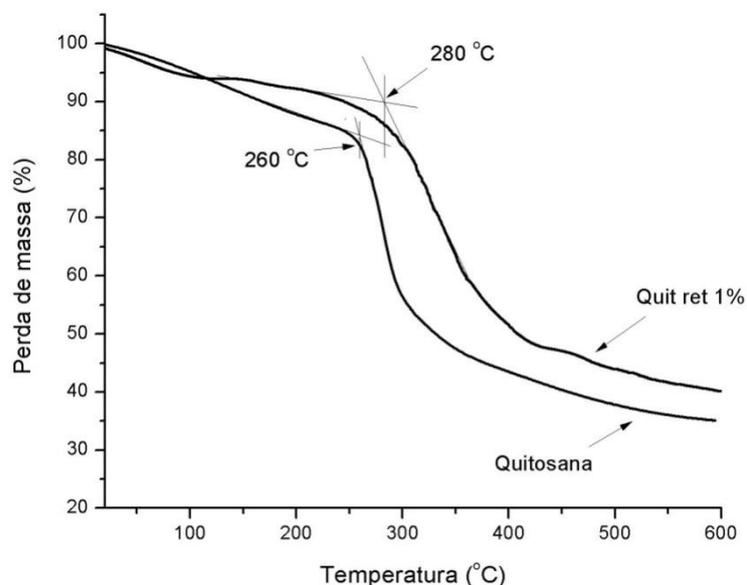


Figura 4.21. Análise termogravimétrica de uma membrana de quitosana e uma membrana de quitosana reticulada com sulfato de tripolifosfato de sódio.

O termograma da membrana de quitosana pura apresenta duas quedas distintas. A primeira representa um processo de desidratação, o qual é responsável por uma queda de massa de 15%. A segunda fase corresponde à decomposição da quitosana, começando para a temperatura de 260 °C. A curva de termogravimetria derivativa (DTG) apresenta um pico para 280 °C, indicando que esta é a temperatura para a qual ocorre a máxima perda de massa.

O resultado da análise membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio apresenta os mesmos processos de desidratação e de decomposição do material, identificados para a quitosana pura. A perda de massa registrada pela desidratação foi de 7%. A temperatura para a qual a decomposição se inicia está em torno de 280 °C, sendo o máximo de perda de massa registrado para 340 °C. De forma semelhante ao que ocorre para a quitosana pura, o processo de decomposição da membrana reticulada não se completa, mesmo para temperaturas de 600 °C. O percentual de massa restante, após o final da análise é superior àquele da quitosana pura.

A análise termogravimétrica mostrou que a reticulação física aumentou a estabilidade térmica da quitosana, pois o processo de decomposição da membrana reticulada teve início a uma temperatura superior. O processo de decomposição, também, foi mais lento.

ORREGO e VALENCIA (2009) relataram um aumento semelhante da estabilidade térmica para a quitosana reticulada com o glutaraldeído. Entretanto, LAUS *et al.* (2006) observaram a diminuição da estabilidade térmica, ao estudar microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio. Eles atribuíram esse fato à redução da cristalinidade da quitosana e da introdução de grupos fosfato.

4.4. INTUMESCIMENTO

Na quitosana, há predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade, tornando, assim, favorável o rearranjo das moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água (ASSIS *et al.*, 2003). Essa habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de nutrientes e metabólitos (THEIN-HAN e KITTYANANT, 2007)

Essa elevada taxa de absorção de água traz conseqüências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero. Ou seja, a presença constante de umidade na estrutura do polissacarídeo provoca o intumescimento da matriz com conseqüente desagregação das fibras e destacamento do filme, além da aceleração da degradação por ataque de microorganismos.

Por essa razão, o grau de intumescimento, ou grau de absorção de água, foi medido para membranas de quitosana pura, com sulfato de condroitina e reticuladas. As medidas de ganho de massa de cada uma das composições foram usadas para averiguar o efeito de cada uma das modificações da quitosana sobre essa propriedade.

O experimento para medir a absorção de água foi feito em triplicata. Foram medidas as massas das amostras úmidas, após a imersão por uma, três e vinte e quatro horas em solução PBS. Os valores médios de ganho percentual de massa estão listados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Dados de intumescimento

Membrana	% 1hora	% 3 horas	% 1 dia
quit pura	648,08	536,41	373,31
quit ret	735,79	601,18	555,62
quit+CS	332,54	226,09	289,52

A quitosana pura apresenta um alto grau de intumescimento para a primeira hora de imersão, chegando a mais de 850% para uma das amostras. As membranas contendo sulfato de condroitina apresentaram uma absorção de líquido, significativamente inferior. Por outro lado, as membranas reticuladas absorveram uma grande de líquido superior a todas as outras composições.

Para os tempos seguintes, existe uma tendência de redução do intumescimento, para todas as composições estudadas. Há uma grande redução da massa das amostras para o tempo de um dia. Isso pode ser um indício de que o processo de absorção de água atingiu o equilíbrio, para esse tempo.

Como já mencionado anteriormente, a hidrofiliabilidade da quitosana, em particular, se dá como função de seus grupos desacetilados que, naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares. Esses grupos possuem uma grande influência sobre o montante de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no filme interfere com a água absorvida (ASSIS *et al.*, 2003).

A reticulação com o tripolifosfato de sódio não foi eficiente, pois as membranas reticuladas absorveram mais PBS do que aquelas puras. Acredita-se que, tanto a quitosana quanto próprio reticulante absorvem água, dado que para cada molécula do tripolifosfato de sódio, dois átomos de hidrogênio estão disponíveis para formar ligações de hidrogênio.

SILVA *et al.* (2004) propõem uma explicação alternativa para o maior intumescimento das membranas reticuladas. Eles atribuem a maior absorção de água à menor cristalinidade do polímero reticulado, provocada por um espaçamento maior entre as cadeias da quitosana, devido à presença do reticulador.

Nas membranas com sulfato de condroitina, por outro lado, existem menos grupos amino livres, reduzindo os sítios para a formação de ligações de hidrogênio com a água. Isso fez com que houvesse uma redução da absorção de água e, conseqüentemente, do grau de intumescimento.

4.5. DEGRADAÇÃO

Uma das características mais notórias da quitosana é sua biodegradabilidade. Por esta razão, foi feito um ensaio para estudar a degradação das membranas produzidas em um meio com pH fisiológico (7,4), à temperatura do corpo humano (37 °C).

A degradação foi avaliada a partir da perda de massa das amostras, como uma função do tempo. Os dados obtidos estão registrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Dados de degradação das membranas.

Composição	Perda de massa (%)		
	1 dia	7 dias	14 dias
quit pura	14,02	-8,55	20,83
quit pura	-83,78	-13,40	13,92
quit pura	-11,11	-9,15	18,29
quit ret	68,93	72,98	75,79
quit ret	56,71	83,02	83,56
quit ret	92,13	66,23	68,84
quit+CS	27,34	27,86	52,33
quit+CS	19,64	18,55	50,56

Informações auxiliares foram obtidas a partir de medidas de absorbância das soluções feitas por espectrofotometria no ultravioleta e no visível. Uma varredura foi feita para todo o espectro e descobriu-se que a quitosana apresentava um pico de absorbância para o comprimento de onda de 198 nm. Por conseguinte, fizeram-se leituras dos meios de degradação no espectrofotômetro. As leituras de absorbância estão registradas na Tabela 4.5.

A quitosana foi o único polímero detectado pela espectrofotometria. Razão para tal é que o sulfato de condroitina, isoladamente, não apresenta absorção característica na região do ultravioleta-visível (ROSSIGNOLI *et al.*, 2008).

Para obter leituras confiáveis, foi necessário fazer diluições dos meios. Para os tempos de um e sete dias, foi arbitrado um fator de diluição de vinte. Para o tempo de quatorze dias, foi necessário diluir o meio para uma concentração duzentas vezes menor. As medidas registradas na Tabela 4.5 para o tempo de quatorze dias correspondem, então, a dez vezes a leitura de absorbância. Esse aumento foi feito, para que fosse possível fazer uma comparação destes dados com aqueles correspondentes aos tempos de um e sete dias.

Tabela 4.5. Leituras de absorvância para o comprimento de onda de 198 nm, para os tempos de um, sete e quatorze dias.

Quitosana		Quitosana reticulada		Quitosana + CS	
Tempo (dias)	Absorvância	Tempo (dias)	Absorvância	Tempo (dias)	Absorvância
1	0,434	1	0,343	1	0,928
7	0,539	7	0,531	7	0,591
14	0,44	14	0,78	14	2,213

Como pode ser observado na Tabela 4.4, as membranas de quitosana pura apresentaram um ganho de massa para os tempos de um e sete dias. Esse ganho é atribuído à precipitação de partículas do meio sobre a superfície, que não se conseguiu remover por lavagem. A perda de massa para quatorze dias foi menor que 20% para todas as amostras, o que revelou estabilidade das membranas no ambiente de degradação.

Os dados da Tabela 4.4 indicam que as membranas de quitosana com sulfato de condroitina degradaram mais rápido do que aquelas de quitosana pura. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a redução da cristalinidade da quitosana pela adição do sulfato de condroitina. Pela alta solubilidade do sulfato de condroitina em água, é possível que ele esteja sendo liberado, ampliando a degradação da quitosana.

A interação eletrostática forte entre a quitosana e o sulfato de condroitina dificultaria o empacotamento das cadeias do polissacarídeo, reduzindo sua cristalinidade. Sendo menos ordenada, a estrutura da quitosana é mais facilmente rompida, acelerando seu processo de degradação.

Na Tabela 4.5, pode-se verificar que não houve diferença significativa de absorvância entre os tempos de um e sete dias. Entretanto, para quatorze dias, a liberação de quitosana com sulfato de condroitina foi significativamente superior à registrada para os tempos anteriores.

A perda de massa registrada para as amostras de quitosana reticulada foi alta para todo o período de degradação. As leituras de absorvância registradas na Tabela 4.5 indicam uma crescente presença da quitosana no meio, o que indica que a perda de massa também corresponde à perda de polímero.

Espectros no infravermelho foram feitos para confirmar se, realmente, as membranas teriam perdido o reticulador para o meio. As Figuras 4.22 e 4.23 apresentam os espectros obtidos.

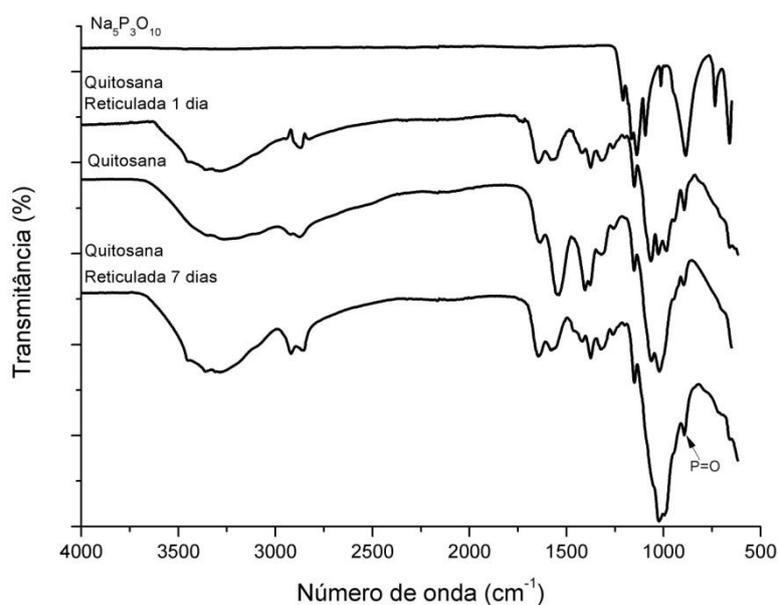


Figura 4.22. Espectros no infravermelho de membranas para um e sete dias de degradação.

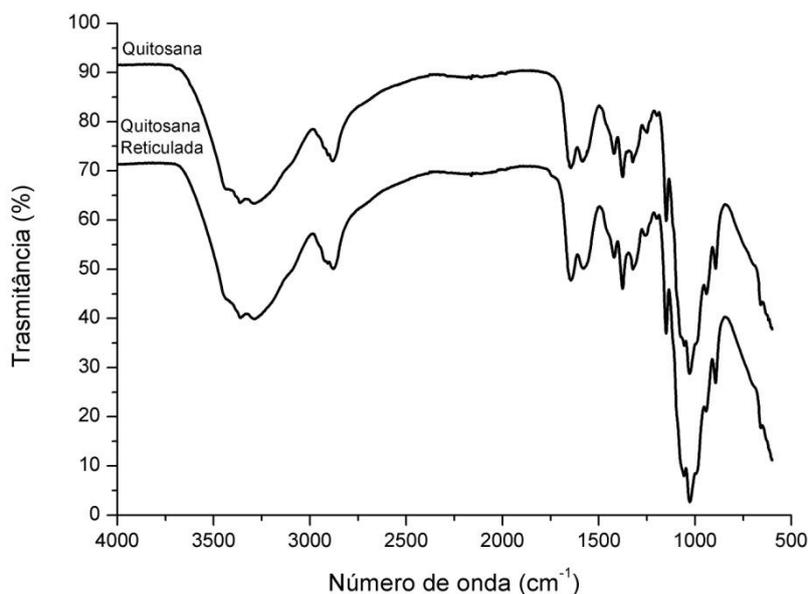


Figura 4.23. Espectros no infravermelho de membranas para quatorze dias de degradação.

Entre todos os espectros feitos, foi encontrada somente uma banda característica do tripolifosfato de sódio, identificada na Figura 4.18. Os demais apresentam somente as bandas da quitosana. Esses dados reforçam a suspeita de que as membranas tenham perdido o reticulador para o meio de degradação, durante os testes. Tal perda não foi observada por CHEN *et al.* (2004) e KUO *et al.* (2006), os quais estudaram a

degradação de membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio. Eles registraram uma perda de massa menor do que 30% para um tempo de degradação de cem dias.

Acredita-se que a perda de massa das membranas seja devida à perda de partículas de reticulador na superfície. Essa hipótese é corroborada pelo excesso de tripolifosfato de sódio identificado sobre a superfície das membranas por microscopia. A perda de tais partículas para o meio, devido à densidade do reticulador, provocaria uma redução percentual da massa da membrana elevada.

As membranas de quitosana com 25% de sulfato de condroitina apresentaram baixa perda de massa para os tempos de um e sete dias, como pode ser visto nas Tabelas 4.4 e 4.5. Para quatorze dias, houve um aumento na degradação das amostras, o que é corroborado pela leitura de absorvância na região do ultravioleta.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

- Todas as membranas produzidas possuíam superfícies lisas, quando observadas ao microscópio ótico e eletrônico.
- A análise da topografia feita por microscopia de força atômica revelou uma superfície uniforme e nanorugosa.
- A adição de sulfato de condroitina à quitosana modificou a estrutura de sua superfície, como visto por microscopia de força atômica.
- O ângulo de contato da quitosana com a água é reduzido pela adição de sulfato de condroitina.
- O grau de intumescimento da quitosana aumentou, quando da reticulação com o tripolifosfato de sódio e diminuiu pela adição do sulfato de condroitina.
- Todas as membranas resistiram à degradação em PBS a 37 °C, por quatorze dias.
- A reticulação com o agente tripolifosfato aumentou a estabilidade térmica da quitosana. Entretanto, ele não alterou o comportamento de degradação das membranas, pois foi perdido para o meio durante o ensaio. Além disso, o grau de intumescimento das membranas reticuladas foi superior ao da quitosana pura, pois o ânion tripolifosfato absorve água, por fazer ligações de hidrogênio.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Padronizar a produção das membranas, de modo que haja reprodutibilidade de espessura e transparência.
- Fazer estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) ou de análise térmica diferencial (DTA) para estudar a temperatura de transição vítrea dos componentes das membranas e aprofundar o estudo da degradação térmica desses polímeros.
- Testar outros agentes reticulantes.
- Estudar a degradação das amostras para tempos superiores a quatorze dias, além de quantificar a liberação do sulfato de condroitina.
- Estudar o comportamento de degradação fisiológica de membranas com as composições estudadas em meio de cultura de células e pela ação da lisozima.
- Fazer testes de citotoxicidade das membranas produzidas.
- Fazer testes *in vitro* e *in vivo* das membranas.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGNER, T., McKENNA L., 2002, “Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, pp. 5–18.
- ASSIS, O. B .G., SILVA, V. L., 2003, “Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, pp. 223-228.
- BEPPU, M. M., ARRUDA, E. J., SANTANA, C. C., 1999, “Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 9, n. 4, pp. 163-169.
- BERGER J., REIST M., MAYER J. M. *et al.*, 2004, “Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, pp. 35–52.
- BOATENG J. S., MATTHEWS K. H., STEVENS H. N. E. *et al.*, 2008, “Wound healing dressings and drug delivery systems: A review”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 8, pp. 2892–2923.
- CANELLA K. M. N. C. E GARCIA R. B., 2001, “Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel influência do método de preparação e do solvente”, *Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 13-17.
- CHATELET C., DAMOUR O., DOMARD A., 2001, “Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 261-268.
- CHEN W., KUO S. M. , CHANG S.J. *et al.*, 2004, “Fabrication and evaluation of chitosan membranes for guided tissue regeneration”, *Biomedical Engineering Applications, Basis and Communications*, 2004, v. 16, pp. 259-264.
- CHEN W. B., WANG L. F., CHEN J. S. *et al.*, 2005, “Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state” *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 75A, pp. 128-137.
- CHEN Y. L., CHEN H. C., CHAN H. Y. *et al.*, 2008, “Co-conjugating chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate to chitosan scaffold alters chondrocyte gene expression and signaling profiles”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, n. 4, pp. 821-830.

- CHEN Y. L., CHEN H. C., LEE H. P. *et al.*, 2006, “Rational development of GAG-augmented chitosan membranes by fractional factorial design methodology”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 2222–2232.
- CHEN Y. L., LEE H. P., CHAN H. Y. *et al.*, 2007. Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 28, pp. 2294–2305.
- CLARK, G. e SMITH, A. F., 1937, “X-ray diffraction of chitin, chitosan, and derivatives”, *Journal of Physical Chemistry*, v. 40, n.7, pp. 863–879.
- COOPER S. L., VISSER S. A., HERGENROTHER R. W. *et al.*, 2004, “Polymers” In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. (eds), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. 2^a edição, Seção 2.2, San Diego, Elsevier.
- COSTA Jr. E. S. e MANSUR H. S., 2008, “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, pp. 1460-1466.
- COSTA SILVA H. S. R., SANTOS K. S. C. R. e FERREIRA E. I., 2006. “Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços”, *Química Nova*, v. 29, n. 4, pp. 776-785.
- CRAVEIRO A. A. e CRAVEIRO, A. C., 2000. “Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações” *PI 9805480-5A* Brasil, 12 de 9 de 2000.
- DALLAN, P. R. M., 2005, *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele*. Tese de D.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- DENUZIERE, A., FERRIER, D. e DOMARD, A., 1996, “Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects”, *Carbohydrate Polymers*, v. 29, pp. 317-323.
- DENUZIERE, A., FERRIER, D., DAMOUR, O. *et al.*, 1998, “Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties”, v. 19, pp. 1275-1285.
- Di MARTINO, A., SITTINGER, M. e RISBUD, M. V., 2005, “Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 5983-5990.
- FOOT, M. e MULHOLLAND, M., 2005. “Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using

- chemometric techniques.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, pp. 397-407.
- GARNJANAGOONCHORN, W., WONGEKALAK, L. e ENGKAGUL, A, 2007, “Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage”, *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, pp. 465-471.
- GOMES, A.M.M., 2008, *Preparação, caracterização e avaliação da biodegradabilidade de blendas amido/quitosana/PVA*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.
- HAMILTON, V., YUAN, Y., RIGNEY, D. A., *et al.*, 2006, “Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, pp. 1373–1381.
- HARDINGHAM T., 1998, “Chondroitin sulfate and joint disease”, *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 6, supl. A, pp. 3-5.
- HEIN, S., WANG, K., STEVENS, W. F. *et al.*, 2008, “Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives”, *Materials Science and Technology*, v. 24, n. 9, pp. 1053-1061.
- HOWLING, G. I., DETTMAR, P. W., GODDARD, P. A., *et al.*, 2001, “The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 2959-2966.
- HSU, S. H., WHU, S. W., TSAI, C. L. *et al.*, 2004, “Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation”, *Journal of Polymer Research*, v. 11, pp. 141-147.
- KARAKEÇILI, A. G., SATRIANO, C., GÜMÜSDERELIOĞLU, M. *et al.*, 2008, “Enhancement of fibroblastic proliferation on chitosan surfaces by immobilized epidermal growth factor” *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, pp. 989–996.
- KIM, I-Y., SEO, S-J., MOON, H-S. *et al.*, 2008. “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications” *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 1-21.
- KUO, S. M., CHANG, S. J., CHEN, T. W. *et al.*, 2006, “Guided tissue regeneration for using a chitosan membrane: An experimental study in rats”, *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 76, n. 2, pp. 408-415 .
- LAUS, R., LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O. *et al.*, 2006, “Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(iii) e manganês(ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão”, *Química Nova*, v. 29, n.1, pp. 34-39.

- LIN, H. R., CHEN, K. S., CHEN, S. C. *et al.*, 2007, “Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$.”, *Materials Science and Engineering C*, v. 27, pp. 280–284.
- LUCAS, E. F., SOARES B. G. e MONTEIRO E., 2001, *Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. 1 ed. Rio de Janeiro, e-Papers.
- NAIR, L. S. e LAURENCIN, C. T., 2007 “Biodegradable polymers as biomaterials”, *Progress in Polymer Science*, v. 32, pp. 762-798.
- NEWMAN, A. P., 1998, “Articular Cartilage Repair”, *American Journal of Sports Medicine*, v. 26, n. 2, pp. 309-324.
- OKUYAMA, K., NOGUCHI, K., KANENARI, M. *et al.*, 2000, “Structural diversity of chitosan and its complexes”, *Carbohydrate Polymers*, v. 41, pp. 237-247.
- ORREGO, C. E. E VALENCIA, J. S., 2009, “Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 32, pp. 197–206.
- PENG, C. K., YU, S. H., MI, F. L. *et al.*, 2006, “Polysaccharide-based artificial extracellular matrix: preparation and characterization of three-dimensional, macroporous chitosan and chondroitin sulfate composite scaffolds”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 99, pp. 2091–2100.
- PENICHE, C., FERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, G. *et al.*, 2007, “Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 18, pp. 1719-1726.
- PONEDEL’KINA, I. Yu., LUKINA, E. S. e ODINOKOV, V. N., 2008, “Acid glycosaminoglycans and their chemical modification”, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 34, 1, pp. 5-28.
- PIAI, J. F., 2008. *Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de Quitosana/Sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada*. Dissertação de M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.
- RANA, V., TIWARYA, A. K., JAINA, S. *et al.*, 2007, “Chitosan-chondroitin composite films: comparison with *in vitro* skin permeation data of hydrophilic and lipophilic drugs”, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 6,n. 4, pp. 231-242.
- RATNER, B. D., 2004, “Surface properties and surface characterization of materials”, In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. (eds), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. 2ª edição, Seção 1.4, San Diego, Elsevier.

- RINAUDO, M., 2006, “Chitin and chitosan: Properties and applications”, *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 603-632.
- ROSSIGNOLI, P., PONTAROLO, R., CORRER, C. J. et al., 2008, “Determinação espectroscópica multivariada de glucosamina e condroitina em formulações farmacêuticas”, *Química Nova*, v. 31, n. 6, pp. 1285-1289.
- SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R. et al., 2003, “Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, pp. 242-249.
- SANTOS, T. C., MARQUES, A. P., SILVA, S. S. et al., 2007, “In vitro evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes”, *Journal of Biotechnology*, v. 132, pp. 218–226.
- SECHRIEST, V. F., MIAO, Y. J., NIYIBIZI, C. et al., 2000, “GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 49, pp. 534 – 541.
- SHI, C., ZHU, Y., RAN, X. et al., 2006, “Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine”, *Journal of Surgical Research*, v. 133, pp. 185-192.
- SHI, G., CHEN, Y., WAN, C. et al., 2008, “Study on the preparation of chitosan–alginate complex membrane and the effects on adhesion and activation of endothelial cells”, *Applied Surface Science*, v. 255, pp. 422–425.
- SHU, X. Z. e ZHU, K. J., 2002, “Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 233, pp. 217–225.
- SILVA, R. M., SILVA, G. A., COUTINHO, O. P. et al., 2004, “Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, pp. 1105-1112.
- SILVA, S. S., LUNA, S. M., GOMES, M. E. et al., 2008, “Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies”, *Macromolecular Bioscience*, v. 8, pp. 568–576.
- SUGAHARA, K., MIKAMI, T., UYAMA, T. et al., 2003, “Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate”, *Current Opinion in Structural Biology*, v. 13, pp.612–620.

- SUH, J. K. F. e MATTHEW, H. W. T., 2000, “Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 1-21.
- THEIN-HAN, W. W. e KITIYANANT, Y., 2007, “Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80, n. 1, pp. 92-101.
- THEIN-HAN, W. W., KITIYANANT, Y. e MISRA, R. D. K., 2008, “Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering”, *Materials Science and Technology*, v. 24, n. 9, pp. 1062-1075.
- TOMIHATA, K. e IKADA, Y., 1997, “In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives”, *Biomaterials*, v. 16, pp. 567-575.
- TSAI, H.S. e WANG, Y. Z, 2008, “Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents”, *Polymer Bulletin*, v. 60, pp. 103–113.
- VINSOVA, J. e VAVRIKOVA, E, 2008, “Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan”, *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, pp. 1311-1326.
- WANG, D-A., VARGHESE, S., SHARMA, B. *et al.*, 2007, “Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue–biomaterial integration”, *Nature Materials*, v. 6, pp. 385-392.
- WIEGEL, D., KAUFMANN, J. e ARNOLD, K., 1999, “Polar interactions of chondroitin sulfate. Surface free energy and molecular dynamics simulations” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 13, pp. 143–156.
- ZHENG, Z., WEI, Y., WANG, G. *et al.*, 2009, “Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells” *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 24, pp. 63-82.
- ZOU, X. H., JIANG, Y. Z., ZHANG, G. R. *et al.*, 2009, “Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing”, *Acta Biomaterialia*, Article In Press, pp. 1742-7061.