

Rebeka de Oliveira Pepino

**Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas
quitosana/gelatina em ácido adípico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Guzzi Plepis

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

À minha Família

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que proporciona na minha vida.

À todos os meus familiares, pelo amor, compreensão, apoio, amizade e incentivo. Em especial ao meu filho Gabriel, ao meu marido Luis, a minha mãe Eliane e a minha irmã Beatriz que são meus maiores companheiros e amigos que me incentivam, me apoiam e enchem minha vida de alegria e amor.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade concedida.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, compreensão, incentivo e por toda a ajuda no decorrer do mestrado.

À Dr^a. Virginia da Conceição Amaro Martins, pelo apoio, incentivo e pela ajuda no decorrer do mestrado.

À Dr^a. Cláudia Bernal e à Prof^a. Dr^a. Janice Rodrigues Perussi pelas análises de citotoxicidade.

Ao pessoal do CAQI pelas análises realizadas de FTIR e MEV.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Biomateriais pelos momentos de descontração, amizade, ajuda e incentivo.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação do IQSC.

Ao pessoal da biblioteca do IQSC.

À CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

PEPINO, Rebeka de Oliveira. **Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A quitosana é um biopolímero estudado em diversas áreas, tais como, ambiental, alimentícia, farmacêutica, biomédica e biotecnológica. Ela pode ser obtida de diferentes formas polimórficas de quitina, dentre as quais a forma β tem se mostrado vantajosa, pois favorece modificações químicas mais homogêneas e leva a um produto final menos alergênico. A quitosana pode ser combinada com outros compostos a fim de interagir e/ou reagir com eles e modificar suas propriedades. O objetivo deste trabalho foi estudar como uso de ácido adípico, em substituição ao acético, afeta as propriedades de géis e esponjas de quitosana e de quitosana/gelatina, que foram posteriormente reticuladas com os agentes reticulantes EDC/NHS. As técnicas utilizadas para os estudos foram: reologia, FTIR, MEV, absorção em PBS e ensaios de citotoxicidade. Por reologia, observou-se que o aumento na concentração dos géis de quitosana tornou os géis mais elásticos e viscosos. O mesmo ocorreu na presença de gelatina ou EDC/NHS. O efeito do uso de ácido adípico em substituição ao acético também foi mostrado nos ensaios reológicos, pois os géis com 2% de quitosana e com quitosana/gelatina sem EDC/NHS se mostraram mais elásticos e mais viscosos quando o ácido adípico foi usado. Os espectros FTIR mostraram a presença de interações entre a quitosana e a gelatina e a formação de ligações amidas II após reticulação com EDC/NHS. Na preparação das esponjas observou-se que os géis de quitosana em ácido adípico geravam esponjas instáveis que se desfizeram durante a neutralização, mas essa instabilidade não ocorreu com a blenda. As esponjas preparadas com a blenda foram estudadas após neutralização e o MEV mostrou que o uso de EDC/NHS alterou a morfologia levando a formação de poros interconectados. Nos ensaios de absorção em tampão de PBS foi observado que o uso de ácido acético aumenta a absorção para as esponjas sem EDC/NHS, enquanto para as esponjas com EDC/NHS a absorção é maior quando se usa ácido adípico. Todas as esponjas foram não citotóxicas o que torna esses materiais promissores para serem estudados em aplicações na área médica, tais como material de curativo, implantes, liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: biomateriais, quitosana, gelatina.

ABSTRACT

PEPINO, Rebeka de Oliveira. **Development of gels and sponges of chitosan and blends chitosan/gelatin prepared in adipic acid.** 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Chitosan is a natural polymer studied in various fields such as environmental, food, pharmaceutical, biomedical and biotechnology. It can be obtained from different polymorphic forms of chitin, of which the form β has proven advantageous because it promotes more homogeneous and chemical modifications leads to a final product less allergenic. Chitosan can be combined with other compounds and thus further improve its properties. The aim of this study was to analyze how the use of adipic acid, replacing acetic acid affects the properties of gels and sponges of chitosan and chitosan/gelatin, which were subsequently crosslinked with EDC/NHS. The techniques used for these studies were: rheology, FTIR, SEM, absorption in PBS and cytotoxicity assays. In rheology, it was observed that increasing the concentration of chitosan was possible to prepare more elastic and viscous gels. The same occurs in the presence of gelatin or EDC/NHSO. The effect of the use of adipic acid to replace the acetic acid was also shown on rheological measurements, because the gels with 2% chitosan or chitosan/gelatin without EDC/NHS were more elastic and more viscous when the adipic acid has been used. The FTIR spectra showed the presence of interactions between chitosan and gelatin and the formation of amide II Bonds after crosslinking with EDC/NHS. In the preparation of the sponges it was observed that the gels of chitosan with adipic acid generated unstable sponges crumbled during neutralization, but this instability does not occur with the blend. Sponges prepared with the blend were studied after neutralization and SEM showed that the use of EDC/NHS altered the morphology leading to the formation of interconnected pores. The use of acetic acid increases the absorption in PBS for sponges without EDC/NHS, while for sponges with EDC/NHS the absorption is greater when adipic acid was used. All sponges were non-cytotoxic making them promising materials to be studied for applications in the medical field, such as dressing materials, implants, controlled drug release.

Keywords: biomaterials, chitosan, gelatin.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura da quitina	16
Figura 2 - Arranjo das moléculas de (a), (b) e (c) α -quitina e (d), (e) e (f) β -quitina ..	17
Figura 3 - Hierarquia dos principais níveis estruturais do gládio de lula.....	19
Figura 4 - Desacetilação parcial das unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose da quitina ($n=p+q$)	19
Figura 5 - Estrutura química do ácido adípico	22
Figura 6 - Representação da interação iônica entre a quitosana e um ácido dicarboxílico	23
Figura 7 - (a) Representação da reticulação por interação iônica na quitosana (b) Representação da formação de uma rede semi-interpenetrante	24
Figura 8 - Propriedades mecânicas de esponjas de quitosana feitas em diferentes ácidos: acético (Ace), glicólico (Gly), oxálico (Oxa), succínico (Suc), málico (Mal) e adípico (Adi)	24
Figura 9 - Representação da reação entre a quitosana e o ácido adípico após adição de EDC/NHS	25
Figura 10 - Representação da reação entre a quitosana e o ácido adípico após aquecimento.....	26
Figura 11 - Formação de amida mediada por EDC	27
Figura 12 - Hidrólise do intermediário O-acilisoureia.....	27
Figura 13 - Formação da ligação amida medida por EDC/NHS	28
Figura 14 - Representação do comportamento elástico	30
Figura 15 - Representação de um fluido viscoso e de um fluido viscoelástico.....	30
Figura 16 - Processo de obtenção da quitosana (HORN, 2012)	32
Figura 17 - Diagrama esquemático do ensaio de citotoxicidade	42
Figura 18 - Massas e porcentagens dos materiais obtidos antes e após desmineralização e desproteínização	43
Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica	44
Figura 20 - Curva de viscosidade reduzida versus concentração de quitosana.....	46

Figura 21 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-○-) em função da deformação para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -Δ- Q2G0C e -Δ- Q2G0D.....	48
Figura 22 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-○-) em função da deformação para os géis -■- Q1G1C, -■- Q1G1D, -Δ- Q1G1C(E) e -Δ- Q1G1D(E).....	48
Figura 23 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -Δ- Q2G0C e -Δ- Q2G0D.....	49
Figura 24 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis — Q1G1C e — Q1G1D.....	50
Figura 25 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E).....	51
Figura 26 - $\tan \delta$ em função da frequência angular para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -Δ- Q2G0C e -Δ- Q2G0D.....	54
Figura 27 - $\tan \delta$ em função da frequência angular para os géis — Q1G1C e — Q1G1D.....	55
Figura 28 - $\tan \delta$ em função da frequência angular para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E).....	56
Figura 29 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -Δ- Q2G0C e -Δ- Q2G0D.....	57
Figura 30 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis — Q1G1C e — Q1G1D.....	58
Figura 31 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E).....	59
Figura 32 - Viscosidade em função da temperatura para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -Δ- Q2G0C e -Δ- Q2G0D.....	61
Figura 33 - Viscosidade em função da temperatura para os géis -■- Q1G1C e -■- Q1G1D.....	61
Figura 34 - Viscosidade em função da temperatura para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E).....	63
Figura 35 - Espectros FTIR na região de 2000 a 400 cm^{-1} para os géis — Q1G0C, — Q1G0D, — Q2G0C e — Q2G0D.....	64

Figura 36 - Espectros FTIR na região de 2000 a 400 cm^{-1} para os géis — Q1G1C, — Q1G1D, — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E).....	66
Figura 37 - Fotografia digital das esponjas de quitosana/gelatina com e sem EDC/NHS	68
Figura 38 - Representação das reações de neutralização na esponja.....	68
Figura 39 - Fotomicrografias das esponjas de quitosana/gelatina (200x)	69
Figura 40 - Fotomicrografias das esponjas reticuladas (200x)	69
Figura 41 - Absorção das esponjas em PBS para as esponjas — Q1G1C, — Q1G1D, — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E)	71
Figura 42 - Reações possíveis para a formação de ligações amidas nos géis com quitosana, gelatina, ácido acético, EDC e NHS	72
Figura 43 - Ataque nucleofílico do ácido desprotonado sobre o EDC	72
Figura 44 - Combinações possíveis para a formação de ligações amidas nos géis com quitosana, gelatina, ácido adípico, EDC e NHS	73
Figura 45 - Redução do MTT	75
Figura 46 - Placas obtidas após ensaios de MTT	75
Figura 47 - Índices de sobrevivência das células VERO para as esponjas neutralizadas, a 100%, 50% e 25% da concentração inicial de 15 mg de esponja/mL de meio	76

Listas de Tabelas

Tabela 1- Porcentagem de quitina e carbonato de cálcio	18
Tabela 2 - Denominação dos géis preparados.....	35
Tabela 3 - Metodologias usadas para os diferentes ensaios reológicos	36
Tabela 4 - Objetivos de cada etapa feita para a obtenção de quitosana.....	43
Tabela 5 - Valores dos tempos médios de escoamento e da viscosidade reduzida para cada concentração de quitosana	46
Tabela 6 - Valores de G' e G'' (Pa) à diferentes valores de frequência e valor de frequência em que ocorre a gelação para as diferentes composições.....	52
Tabela 7 - Valores de viscosidade (Pa s^{-1}) à diferentes valores de taxa de cisalhamento para as diferentes composições.....	59
Tabela 8 - Valores de viscosidade (Pa s^{-1}) à diferentes valores de temperatura para as diferentes composições.....	63
Tabela 9 - Bandas características para as amostras de quitosana em ácido acético e adípico.....	65
Tabela 10 - Bandas características para as amostras de quitosana/gelatina	66
Tabela 11 - Valores de espessuras médias medidas.....	70
Tabela 12 - Valores de médios de absorbância após ensaio com MTT	76

Lista de Abreviaturas

EDC - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FTIR - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NHS - N-hidroxisuccinimida

PBS - tampão fosfato-salino

Q1G0C - 1% quitosana em ácido acético

Q1G0D - 1% quitosana em Ácido adípico

Q2G0C - 2% quitosana em ácido acético

Q2G0D - 2% quitosana em ácido adípico

Q1G1C - 1% quitosana e 1% gelatina em ácido acético

Q1G1D - 1% quitosana e 1% gelatina em ácido adípico

Q1G1C(E) - 1% quitosana e 1% gelatina em ácido acético reticulada com N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida e N-hidroxisuccinimida

Q1G1D(E) - 1% quitosana e 1% gelatina em ácido adípico reticulada com N-(3-dimetilaminopropil) - N'-etilcarbodiimida e N-hidroxisuccinimida

SFB - soro fetal bovino

Sumário

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
Lista de Figuras.....	6
Listas de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo.....	15
2.2 Plano de trabalho para atingir o objetivo.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Quitina.....	16
3.2 Quitosana.....	19
3.3 Gelatina.....	20
3.4 Blendas poliméricas.....	20
3.4.1 Blendas de gelatina e quitosana.....	21
3.5. Uso de ácido adípico com quitosana.....	22
3.7 Reticulação mediada por EDC/NHS.....	26
3.8 Reologia.....	29
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.1 Obtenção da quitosana.....	32
4.2 Caracterização da quitosana.....	33
4.2.1 Determinação do grau de acetilação.....	33
4.2.2 Determinação da massa molar média.....	33
4.3 Preparação dos géis.....	34
4.3.1 Ensaio reológicos dos géis.....	35
4.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	36
4.5 Preparação e neutralização das esponjas.....	36
4.6 Caracterização das esponjas.....	37
4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.6.2 Medidas de espessura.....	38
4.6.3 Avaliação da capacidade de absorção em PBS.....	38
4.6.4 Determinação das concentrações de íons no gel.....	39

4.6.5 Estudo de citotoxicidade	39
4.6.5.1 Preparo dos extratos	39
4.6.5.2 Crescimento celular	40
4.6.5.3 Determinação da viabilidade e da concentração celular	40
4.6.5.4 Ensaio de citotoxicidade	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Obtenção da quitosana	43
5.2 Caracterização da quitosana	44
5.2.1 Determinação do grau de acetilação	44
5.2.2 Determinação da massa molar média	45
5.3 Ensaio reológicos dos géis.....	47
5.3.1 Ensaio de oscilação	47
5.3.2 Ensaio de frequência	49
5.3.3 Tangente de perda para os ensaios de frequência.....	53
5.3.4 Ensaio de fluxo em função da taxa de cisalhamento	56
5.3.5 Ensaio de fluxo em função da temperatura.....	60
5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	64
5.5 Preparação e neutralização das esponjas	67
5.6 Caracterização das esponjas	69
5.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	69
5.6.2 Medidas de espessura.....	70
5.6.3 Avaliação da capacidade de absorção em PBS	70
5.6.4 Estudo de citotoxicidade	74
6 CONCLUSÃO.....	78
BIBLIOGRAFIA	79

1. INTRODUÇÃO

A quitina é um polissacarídeo encontrado naturalmente em diversos organismos e pode ser obtida pelo processamento dos resíduos das indústrias pesqueiras a partir de carapaças de crustáceos, moluscos, etc.

Um dos maiores interesses em relação à quitina é a obtenção de quitosana a partir de sua desacetilação, isto porque a quitosana possui maior reatividade e melhor solubilidade, o que aumenta o seu potencial em modificações e processamento (LARANJEIRA et al., 2009).

Dependendo do organismo de origem a quitina pode ser encontrada em diferentes formas polimórfica (α , β ou γ -quitina). A forma α -quitina é a mais estudada, por ser a mais abundante, porém a β -quitina tem ganhado destaque, pois estudos mostraram que seu uso leva a uma desacetilação mais homogênea e um produto final mais puro e menos alergênico (SHEPHERD et al., 1997; KHOR, 2001; KURITA, K., 2006). Além disso o uso de β -quitina favorece modificações químicas e enzimáticas e permite obter uma quitosana mais flexível e elástica (VENUGOPAL, 2011; GUNNARSON, 2011).

O polissacarídeo quitosana tem sido estudado em diversas áreas, tais como, ambiental, alimentícia, farmacêutica, biomédica e biotecnológica. Esse biopolímero tem ganho destaque como biomaterial, pois auxilia na proliferação celular, é biodegradável, biocompatível, possui atividade antibacteriana, etc (KURITA, K., 2006; GAVHANE et al. 2013).

Como a quitosana apresenta grupamentos capazes de fazer interações com outros compostos vários desses têm sido estudados a fim de interagir e/ou reagir com a quitosana e modificar suas propriedades físico-químicas para que ela possa ter características funcionais mais específicas e/ou melhoradas (PRASHANTH, et al. 2007; LARANJEIRA et al., 2009).

Exemplos desses são:

- A utilização de ácido adípico ao invés do acético para dissolver a quitosana derivada de α -quitina, pois ele não só atua como solvente, mas também melhora as propriedades mecânicas do material sem torna-lo citotóxico ou quebradiço (CHEN et al., 2008; GHOSH et al., 2012; MITRA et al., 2012; CAI et al., 2013; SAILAKSHMI et al., 2013).

- Preparação de blendas de quitosana/gelatina preparadas em ácido acético com quitosana derivada de α -quitina, pois a utilização de gelatina melhora a absorção de água e leva à melhores propriedades biológicas, tais como melhor afinidade celular e cicatrização de feridas (CHENG et al., 2003; YUAN et al., 2004; BINDU et al., 2010).
- Reticulação por ligações covalentes, pois ela melhora as propriedades de estabilidade física e química do material (ARGUELLES-MONAL et al. 1998; MOURA et al., 2007; GONSALVES et al., 2011).

Nesse estudo o agente reticulante escolhido foi o EDC/NHS, pois esses reagentes não estão presentes no produto final e podem ser facilmente retirados do material após lavagem do mesmo. Dessa forma, o material obtido não gera citotoxicidade (STAROSZCZYK et al. 2014). Além disso, o uso de EDC/NHS ainda não foi estudado para a blenda quitosana/gelatina obtida em ácido adípico e não foi encontrado estudo do uso de ácido adípico para dissolver quitosana derivada de β -quitina.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo

O objetivo proposto neste trabalho é estudar o uso de ácido adípico, em substituição ao ácido acético, na preparação de géis e esponjas de quitosana ou em blendas de quitosana/gelatina, utilizando quitosana derivada de β -quitina.

2.2 Plano de trabalho para atingir o objetivo

Para atingir o objetivo desse estudo, foi proposto o seguinte plano de trabalho:

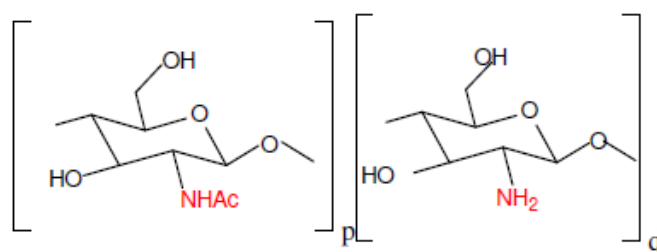
- Obter quitosana a partir de gládios de lula da espécie *Loligo ssp* que tem β -quitina e caracteriza-la quanto ao seu grau de desacetilação por titulação condutimétrica e sua massa molar média por viscosimetria.
- Preparar géis e esponjas de quitosana, quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/EDC/NHS em ácido acético e em ácido adípico.
- Neutralizar as esponjas com bicarbonato de sódio.
- Utilizar FTIR para caracterização dos grupos funcionais dos compostos presentes e estudo das interações nas diferentes composições.
- Caracterizar os géis por reologia, a fim de avaliar com as diferentes preparações afetam as interações e/ou enovelamentos entre as cadeias poliméricas.
- Estudar as propriedades das esponjas neutras por MEV (microscopia eletrônica de varredura) e medidas de espessura média.
- Determinar a absorção de PBS para as esponjas neutras a fim de correlacionar suas propriedades de absorção às diferentes preparações.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* por ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) para as esponjas neutralizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quitina

Dentro da categoria de polímeros naturais encontra-se a quitina (Figura 1) que é um polissacarídeo formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amido-2-deoxi-D-glicopirranose (LARANJEIRA et al., 2009).

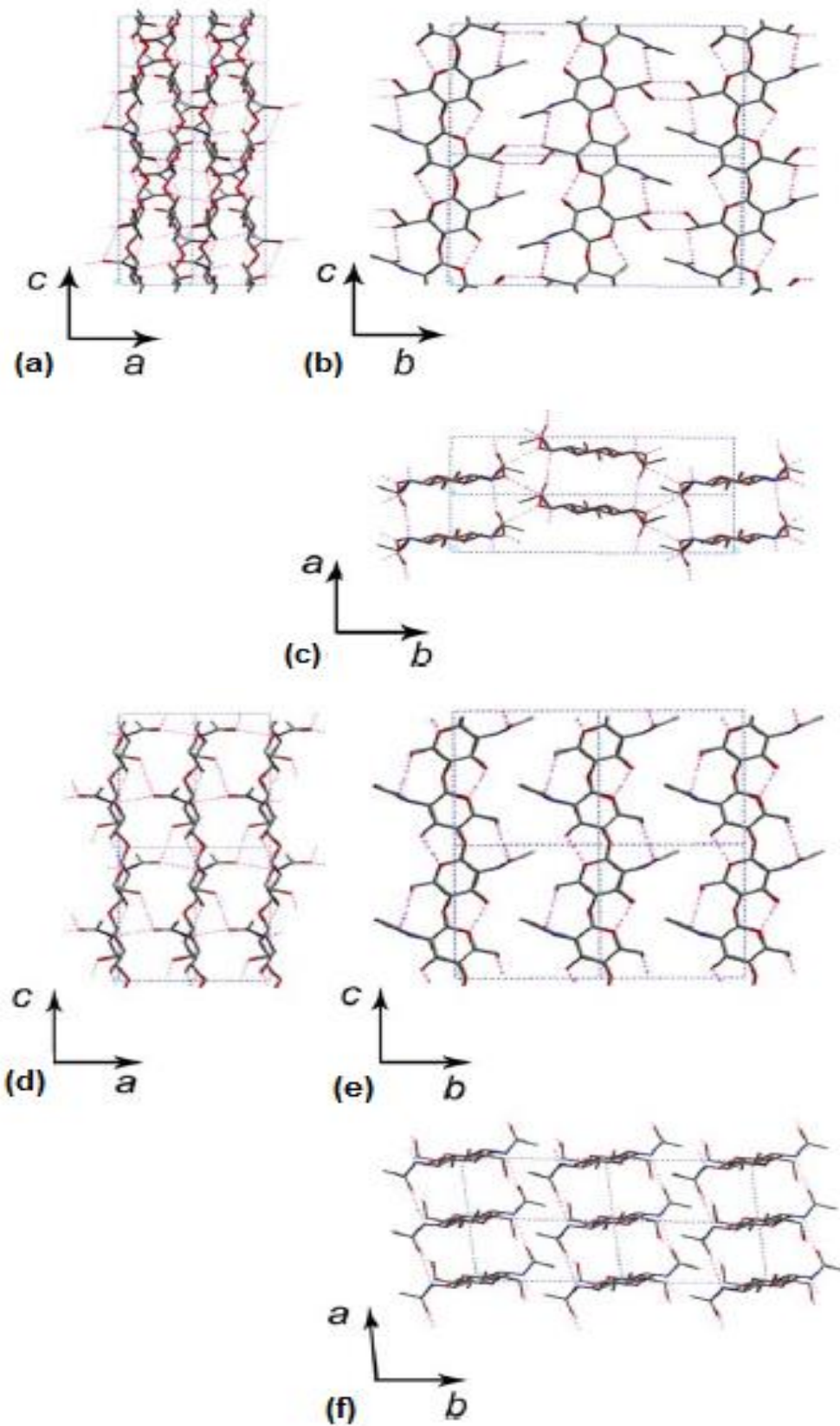
Figura 1 - Estrutura da quitina ($p > q$)



A quitina é encontrada como componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes e insetos, das paredes celulares de fungos e leveduras, da cutícula dos anelídeos e moluscos, e da concha de camarão, lagosta e caranguejo, a quitina é um dos polímeros mais abundante na natureza (KHOR, 2001; YANG et al., 2014).

Dependendo do organismo de origem, as cadeias desse polímero se arranjam de forma diferenciada no estado sólido, podendo formar duas estruturas polimórficas distintas que são denominadas de α e β -quitina. Há ainda estudos que relatam uma terceira forma, denominada de γ -quitina, mas essa é a menos abundante e ainda não foi totalmente caracterizada. Além disso, em alguns estudos ela é considerada como uma variante da forma α .

Quanto às formas já caracterizadas (Figura 2) sabe-se que a forma α , encontrada em crustáceos, insetos e fungos, gera um empacotamento denso com maiores interações inter e intracadeias, levando a uma estrutura estável, rígida e resistente. Já o arranjo adotado pela forma β dificulta o estabelecimento de algumas interações, o que leva a um empacotamento menos denso que gera uma estrutura mais flexível, porém ainda resistente (RINAUDO, 2006).

Figura 2 - Arranjo das moléculas de (a), (b) e (c) α -quitina e (d), (e) e (f) β -quitina

Fonte: RINAUDO, 2006

3. Revisão Bibliográfica

Encontrada em algas microscópicas e gládios de lula, a forma β foi escolhida para esse estudo, pois por formar menos ligações hidrogênio, permite um acesso mais fácil do solvente, o que facilita para obter reações mais homogêneas (KHOR, 2001).

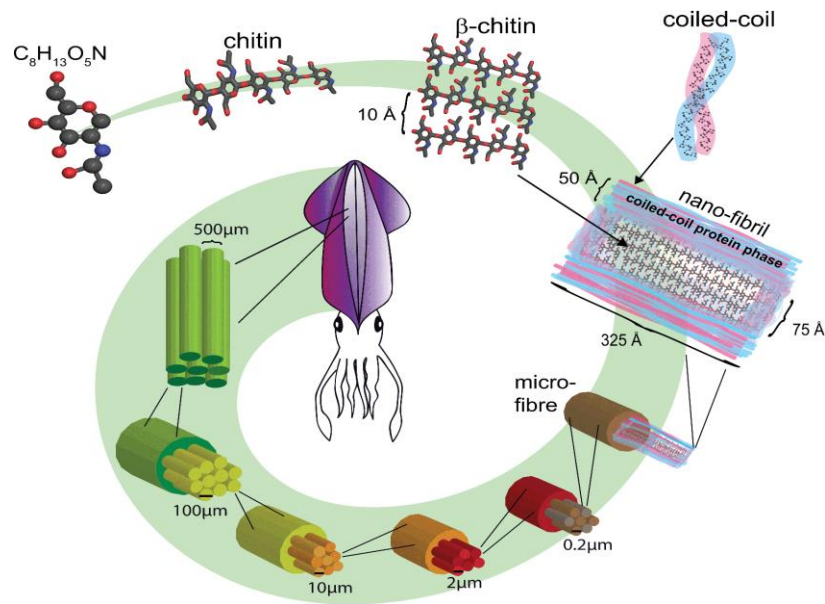
Além disso, ela tem menor teor de carbonatos (Tabela 1) e menor quantidade de pigmentos do que a forma α provinda de crustáceos o que a torna menos alergênica. (SHEPHERD et al., 1997; KURITA, K., 2006).

Tabela 1- Porcentagem de quitina e carbonato de cálcio

Fonte	Quitina(%)	CaCO(%)
Cutícula de caranguejo	15-30	40-50
Cutícula de camarão	30-40	20-30
Cutícula de Krill	20-30	20-25
Pena de Lula	20-40	Desprezível
Molusco / concha de ostra	3-6	85-90
Cutícula de inseto	5-25	Desprezível
Parede celular de fungo	10-25	Desprezível

Fonte: KURITA, K., 2006

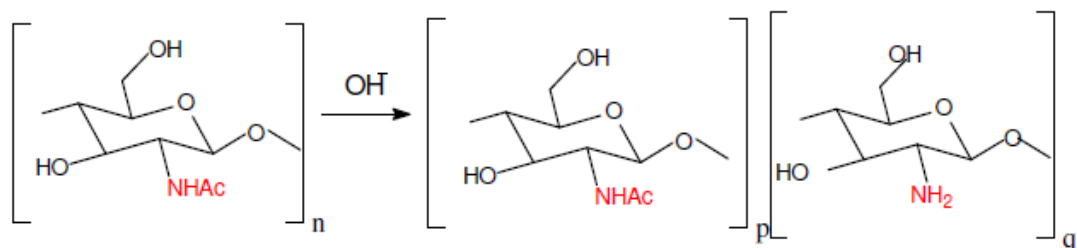
No gládio das lulas, as moléculas de quitina formam uma estrutura de nano-cristais envolvidos numa camada de proteína, resultando em nano-fibrilas de β -quitina. Estas fibrilas agregam-se e vão formando fibras cada vez mais grossas, que se arranjam e formam o gládio de lula, conforme mostra a Figura 3 (YANG et al., 2014).

Figura 3 - Hierarquia dos principais níveis estruturais do gládio de lula

Fonte: YANG et al., 2014

3.2 Quitosana

A partir da desacetilação da quitina obtêm-se a quitosana (Figura 4), que só passa a ser denominada assim quando essa passa a ser solúvel em ácido fraco diluído (LIMA, 2013). Alguns autores definem ainda a quitosana como tendo grau de acetilação maior que 50-60%, mas a porcentagem que define a quitosana é um assunto ainda não estabelecido que varia dependendo do autor (RINAUDO, 2006; LIMA, 2013, CAMPANA-FILHO et. al., 2007).

Figura 4 - Desacetilação parcial das unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose da quitina ($n=p+q$)

Fonte: HORN, 2012.

Por ser biocompatível, biodegradável, auxiliar na proliferação celular e possuir atividade antibacteriana a quitosana tem sido extensivamente utilizada e estudada para variadas aplicações, tais como transportadores de fármacos, agentes de cicatrização de feridas, agentes quelantes, embalagens de alimentos, etc (LARANJEIRA et al., 2009, GAVHANE et al. 2013; ZAGAR, et al, 2015).

Dependendo do processo e da quitina da qual a quitosana foi obtida a massa molar média (MM) e o grau médio de desacetilação (GD) desse biopolímero pode variar, o que pode interferir em suas propriedades físico-químicas e biológicas (LIMA, 2013).

3.3 Gelatina

Produzida pela hidrólise parcial do colágeno; principal constituinte de peles de animais, ossos, tendões e tecido conectivo, a gelatina é uma mistura heterogênea de proteínas de massas molares médias que variam entre 20.000 a 250.000, dependendo do grau de hidrólise do colágeno. (KIM et. al., 2006; BINDU et al., 2010).

A gelatina é um biomaterial insípido e inodoro (SUKKUNTA, 2005). Além disso, é biodegradável e biocompatível, possui plasticidade e adesividade, promove o crescimento e a adesão celular, exibe efeito hemostático e ainda apresenta ativação de macrófagos (CHENG et al., 2003; KIM et al., 2005; HA et al., 2013).

Essas características fazem da gelatina um biomaterial promissor em diversas aplicações, tais como na liberação de fármacos, em revestimento de produtos alimentares, nas paredes de microcápsulas, em embalagens degradáveis, em cosméticos, como agente de gelificação em alimentos e também em curativos (CHENG et al., 2003; KIM et al., 2006; DIOP, 2009; BINDU et al., 2010).

3.4 Blendas poliméricas

As blendas poliméricas têm atraído muita atenção devido à busca de novos materiais com propriedades específicas e/ou melhoradas. Isso é possível,

pois quando dois ou mais polímeros são misturados sem que ocorram reações químicas entre os componentes, tem-se uma mistura física chamada de blenda polimérica, que pode alterar as propriedades físicas e químicas da mistura quando essa é comparada aos componentes utilizados individualmente (WORK et al., 2004).

3.4.1 Blendas de gelatina e quitosana

Blendas de quitosana/gelatina têm sido estudadas para diversas aplicações, como liberação controlada de fármacos, curativos, matriz para engenharia de tecidos, etc (YIM, et al., 2003; KIM et al., 2005; PULIERI, et al. 2008; BINDU et al., 2010; HOSSEINI, et al., 2013).

Devido à boa compatibilidade e as boas propriedades biológicas da quitosana e da gelatina, uma combinação destes dois polímeros tem mostrado efeitos benéficos nas propriedades de biomateriais preparados com essa blenda.

CHENG, et. al. (2003), estudaram filmes de quitosana/gelatina para regeneração de nervo e observou que a blenda era melhor que a quitosana pura, pois ela possui melhor afinidade com as células nervosas e ainda propicia um material mais elástico e macio.

DENG, et. al. (2007), estudaram curativos de quitosana/gelatina na forma de esponja e mostrou que eles têm excelentes propriedades biológicas, pois a blenda mostrou melhor efeito antibacteriano contra *E. Coli* K88 do que a penicilina e maior atividade antibacteriana contra *Streptococcus* do que a cefradina. Além disso, o curativo de quitosana/gelatina levou um menor tempo para cicatrizar feridas se comparado à gaze esterilizada com vaselina.

Na área de engenharia de tecidos, YUAN, et. al. (2004) investigaram as propriedades de filmes preparados com a blenda e observaram que essa combinação aumentou a absorção de água, melhorou a permeabilidade ao oxigênio e tornou o filme mais flexível e biocompatível.

RAHMAN, et. al. (2013) mostraram que a blenda, quando comparada a filmes de quitosana ou gelatina puros, possui melhores propriedades de tração e de atividade antimicrobiana, menor dissolução em água e maior absorção de tampão.

Como suporte para liberação controlada de fármacos, a blenda também tem ganho destaque. LEFFLER, et. al. (2000), demonstraram ser possível manipular as propriedades mecânicas e a taxa de libertação de fármacos por utilização de diferentes ácidos para dissolver a quitosana e a gelatina.

NANDARIGI, et al. (2011) mostraram que o fármaco artesinina pode ter sua liberação prolongada ao ser encapsulado com a blenda quitosana/gelatina.

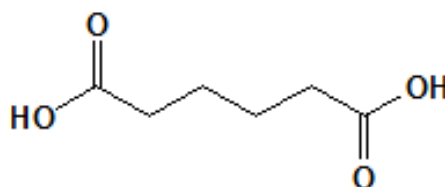
Os trabalhos citados acima têm estudado a blenda após o preparo em diferentes ácidos, tais como, ácido acético, láctico, hidrolórico, fórmico, cítrico, tartárico, etc (CHENG et al., 2003; YUAN et al., 2004; BINDU et al., 2010). No entanto, não foi encontrado estudo dessa blenda preparada em ácido adípico.

3.5. Uso de ácido adípico com quitosana

Conhecido quimicamente como ácido hexanodióico (Figura 5) o ácido adípico é um composto orgânico dicarboxílico com valores de pKa de 4,43 e 5,62 (RODRIGUES, 2000). Sua produção mundial gira em torno de 2,2 milhões de toneladas por ano e seu uso ocorre principalmente na produção de nylon 6,6 (LENARDÃO et al., 2003).

Esse composto também é utilizado em excipientes e formulações farmacêuticas e na indústria de alimentos, onde pode agir auxiliando na tamponação, fermentação, gelificação, acidificação e conservação (MITRA et al., 2012; GHOSH et al, 2012; CHEN et al., 2008; ROWE et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura química do ácido adípico



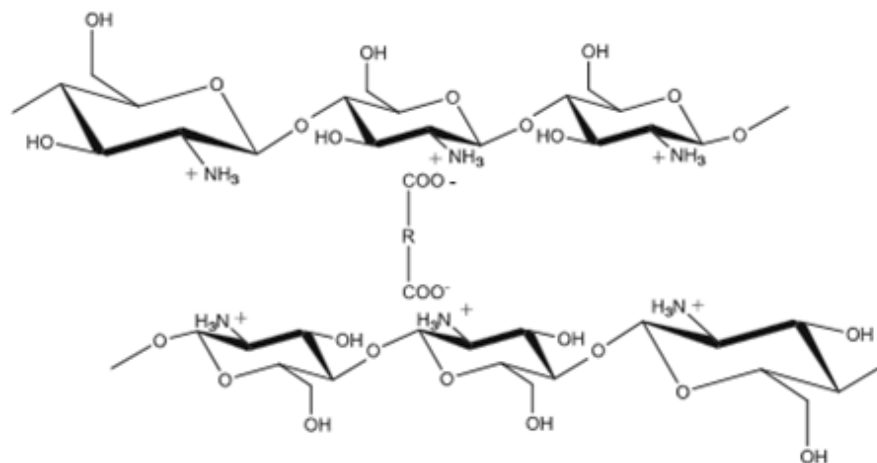
A utilização do ácido adípico como solvente, ao invés do ácido acético (mais utilizado), tem se mostrado uma alternativa promissora para dissolver a

quitosana, pois esse ácido também pode atuar como agente reticulante por interação iônica.

Além disso, o fato deste reticulante não possuir toxicidade, o torna um substituinte ideal a outros potencialmente tóxicos, tal como glutaraldeído (CHEN et al., 2008).

A reticulação da quitosana por um ácido dicarboxílico ocorre, pois suas cargas negativas formam interações entre as cadeias poliméricas de quitosana carregadas positivamente (Figura 6).

Figura 6 - Representação da interação iônica entre a quitosana e um ácido dicarboxílico

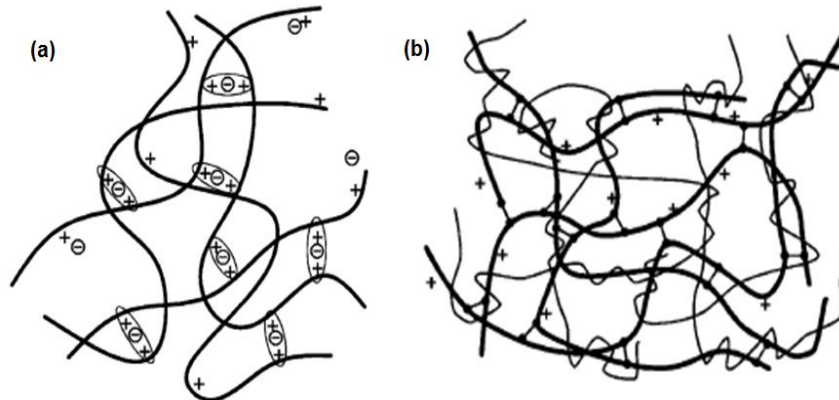


Fonte: GHOSH, et al., 2012

Mas apesar das ligações iônicas serem o principal tipo de interação presente há ainda ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que são favorecidas devido à redução da repulsão eletrostática das cargas positivas da quitosana após a formação das interações iônicas.

Além disso, após a reticulação (Figura 7a) pode ocorrer a formação adicional de redes semi-interpenetrantes (semi-IPN) que são obtidas quando as cadeias poliméricas não se ligam, mas ficam parcialmente aprisionadas umas a outras fisicamente (Figura 7b).

Figura 7 - (a) Representação da reticulação por interação iônica na quitosana (b) Representação da formação de uma rede semi-interpenetrante

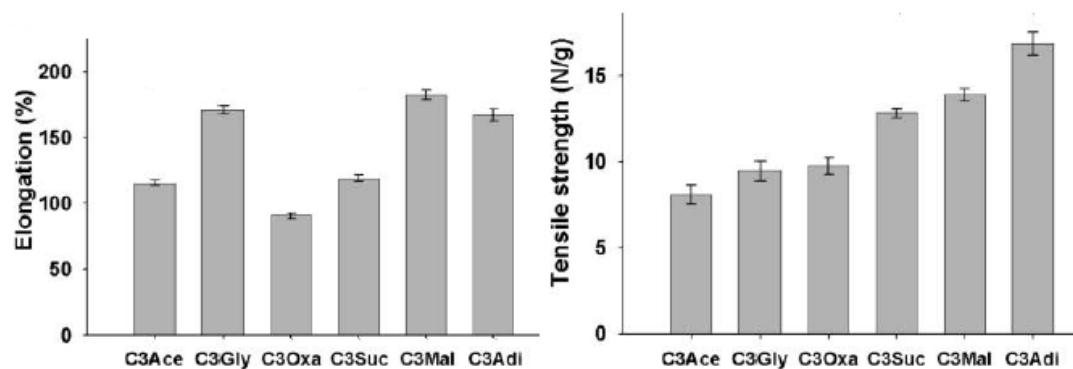


Fonte: BERGER, J. et. al. 2004

Tanto a formação de redes semi-IPN como a elevação do grau de reticulação, reduzem a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas. Essas modificações têm grande potencial para aplicações de liberação controlada, para reduzir a taxa de degradação ou de solubilidade, para aumentar a barreira a substâncias externas e para melhorar a resistência mecânica (GONSALVES et al., 2011).

CHEN et al. (2008) mostraram que o uso de ácido adípico, comparado ao uso de ácido acético (mais utilizado para dissolver a quitosana) melhora as propriedades de resistência à tração e de alongação em esponjas (Figura 8).

Figura 8 - Propriedades mecânicas de esponjas de quitosana feitas em diferentes ácidos: acético (Ace), glicólico (Gly), oxálico (Oxa), succínico (Suc), málico (Mal) e adípico (Adi)



Fonte: CHEN et al., 2008

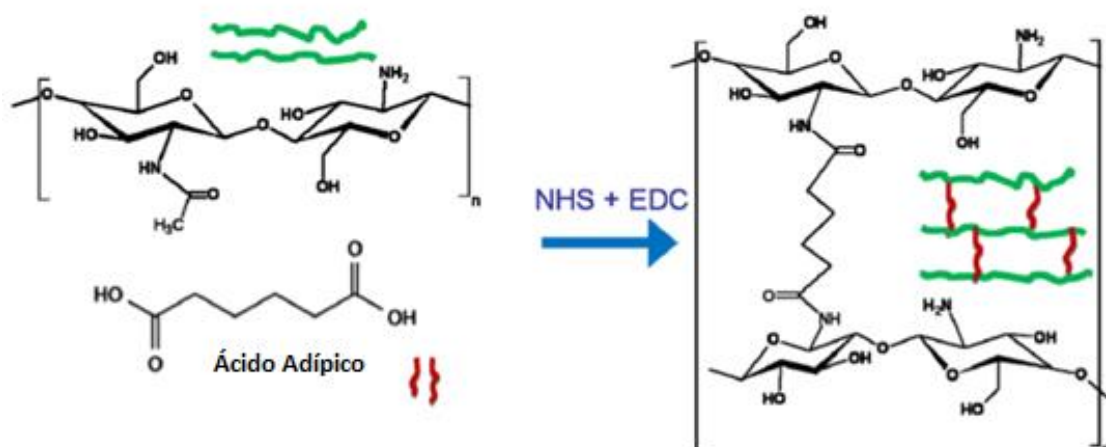
A importância da biocompatibilidade com fibroblastos após substituição do ácido acético por adípico foi comprovada por MITRA et al. (2012) que mostrou que as interações não covalentes entre o ácido adípico e a quitosana geram materiais com potencial para utilização em aplicações biomédicas.

PAJAK, 2010 mostrou ser possível obter sais de quitosana com ácido adípico, succínico ou fumárico. Em seu estudo foi observado que a temperatura do processo, a estrutura do ácido, o grau de desacetilação, e a massa molar da quitosana alterava a solubilidade dos sais, devido as diferentes interações entre os compostos presentes nos géis.

As diferenças entre quitosanas de diferentes massas molares dissolvidas em ácido adípico foi estudada por BRODAZCZEWSHA, et al., 2013. Eles observaram que a atividade da quitosana depende dessa massa, pois a de baixa massa induziu mecanismos de inflamação celular, enquanto a quitosana de alta massa molar mostrou uma menor resposta à estimulação celular.

PASQUI, et al., 2012 estudaram o uso de ácido adípico em hidrogéis de quitosana e observaram que a adição de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS) levava à formação de uma rede tridimensional feita de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas de quitosana e o ácido adípico (Figura 9). Essas ligações tornaram o hidrogel estável nas condições fisiológicas (em NaCl 0,1 M à pH 7,4).

Figura 9 - Representação da reação entre a quitosana e o ácido adípico após adição de EDC/NHS



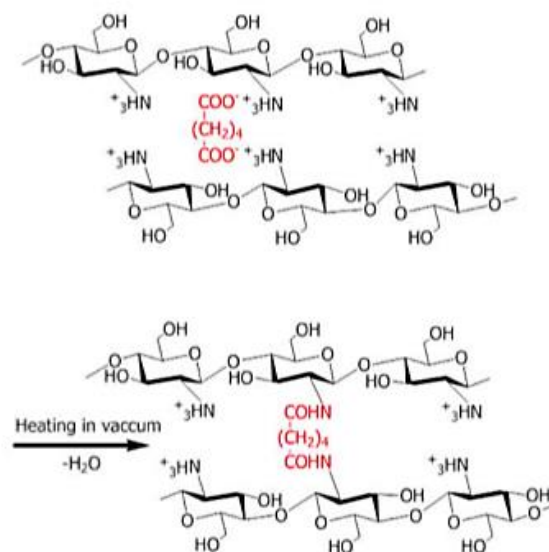
Fonte: PASQUI, et al., 2012.

3. Revisão Bibliográfica

MARTINS, et al., 2012 estudaram filmes de quitosana dissolvida em ácido adípico e observaram ser possível reticulá-lo com EDC/NHS.

CAI, et al., 2013 mostraram ser possível formar ligações covalentes com a quitosana após aquecimento (sob vácuo) de um filme de quitosana dissolvida em ácido adípico (Figura 10).

Figura 10 - Representação da reação entre a quitosana e o ácido adípico após aquecimento

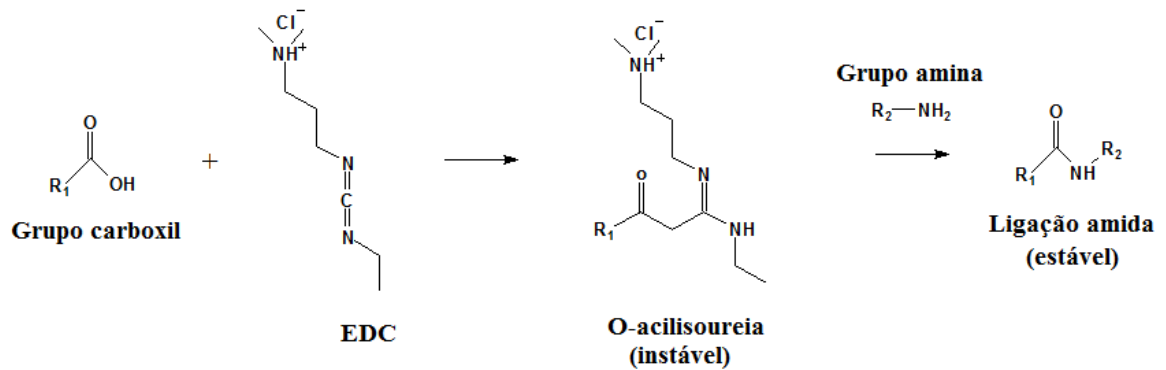


Fonte: CAI, et al., 2013.

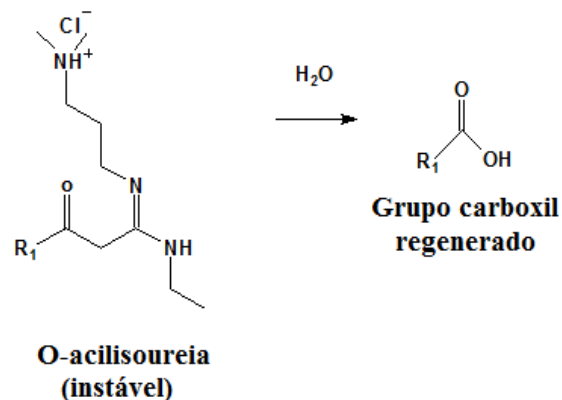
Todos esses estudos mostram um crescente interesse do uso de ácido adípico.

3.7 Reticulação mediada por EDC/NHS

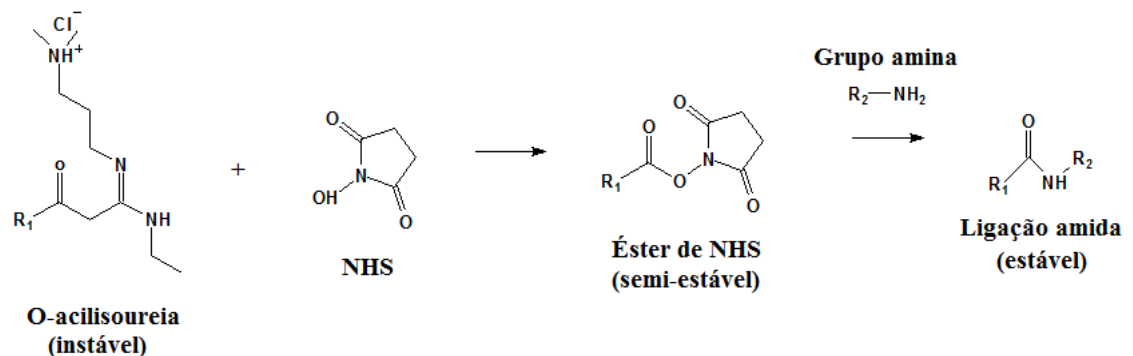
O EDC é uma carbodiimida que torna possível a formação de amida pela reação entre grupos carboxil (presentes no ácido e na gelatina) e grupos amins (presentes na quitosana e na gelatina). Essa reação é possível, pois o EDC reage com o grupo carboxil e forma um intermediário O-acilisoureia, que ao reagir com uma amina primária forma uma ligação amida com o carboxil (Figura 11).

Figura 11 - Formação de amida mediada por EDC

No entanto, em solução aquosa, o intermediário O-acilisoureia é suscetível à hidrólise, a qual resulta na regeneração do grupo carboxil (Figura 12), minimizando a formação de grupos amidas.

Figura 12 - Hidrólise do intermediário O-acilisoureia

Diante disso, para aumentar a eficiência do EDC, adiciona-se NHS, que ao reagir com o intermediário O-acilisoureia (instável), forma um novo intermediário semi-estável, o éster de NHS, o qual é capaz de reagir com a amina de forma mais eficiente (Figura 13) (LOPEZ, M. C. P., 2012).

Figura 13 - Formação da ligação amida medida por EDC/NHS

Os reagentes EDC e NHS já foram usados em alguns estudos para reticular a quitosana. WANG, et al. (2003) prepararam uma matriz composta de colágeno/quitosana e a reticularam com EDC/NHS após dissolução dos polímeros em ácido acético.

Nesse estudo a matriz mostrou-se um biomaterial promissor para implantes de fígado, pois o produto final foi considerado não citotóxico e biocompatível. Além disso, o uso desses reagentes mostrou melhorar as propriedades mecânicas do biomaterial, pois ao reticular os polímeros melhorou-se a resistência mecânica da matriz.

Com os polímeros dissolvidos em ácido acético, KOLODZIEJSKA, et al. (2006) mostraram ser possível diminuir a solubilidade de filmes de quitosana/gelatina com a reticulação com EDC/NHS. Em 2014, STAROSZCZYK, H., et al. estudaram como o uso de EDC/NHS para reticular filmes de quitosana/gelatina alterava os espectros de FTIR.

Quanto aos outros estudos envolvendo quitosana e EDC, TSAO, et al. (2011) estudaram o uso de dois ácidos dicarboxílicos diferentes (ácido glutâmico e ácido succínico) para solubilizar e reticular um hidrogel de quitosana após reação com EDC. O material obtido mostrou-se homogêneo e transparente, além disso, a formação de grupo amida aumentou a afinidade celular e a regeneração do tecido foi aumentada em 50% quando se utilizava o hidrogel como curativo.

Além de TSAO, et al. (2011), outros autores também estudaram o uso de ácidos dicarboxílicos. MARTINS, et al. (2012) estudaram o uso de ácido adípico para reticular hidrogéis de quitosana e observou que o uso de EDC combinado ao uso de ácido adípico propiciava a reticulação covalente entre as cadeias de quitosana e as moléculas de ácido adípico.

BODNAR, et. al. (2005) utilizaram EDC para estudar a obtenção de nanopartículas biodegradáveis de quitosana. Para reticular as cadeias desse polímero eles utilizaram ácidos di- e tricarboxílicos (ácidos succinico, málico, tartárico e cítrico), com os quais eles obtiveram nanopartículas promissoras para utilizações biomédicas. No trabalho de 2007, BODNAR, et. al. mostraram ser possível incorporar às suas nanopartículas, fluorescência.

Todos esses trabalhos mostram o potencial dos reagentes EDC/NHS para reticular a quitosana com diferentes composições, no entanto não são encontrados na literatura estudos que utilizam EDC e NHS em materiais preparados de quitosana/gelatina em ácido adípico. Dessa forma o atual trabalho vem contribuir com novas informações sobre a reticulação da quitosana/gelatina com EDC/NHS.

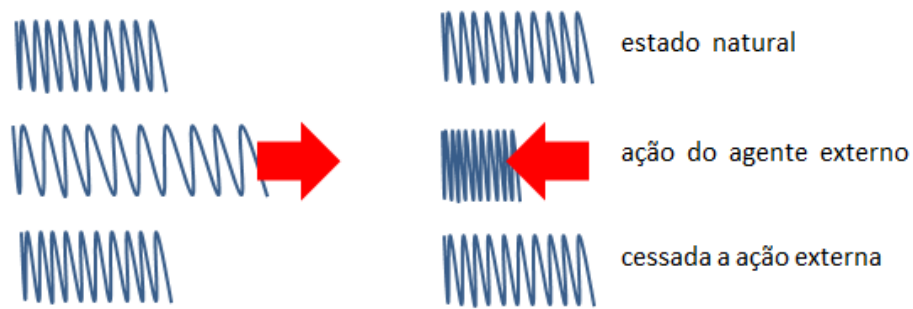
3.8 Reologia

A reologia estuda a deformação e a fluidez dos materiais. Para isso ela investiga a resposta desses materiais após a aplicação de uma deformação ou tensão (BRETAS et al., 2000).

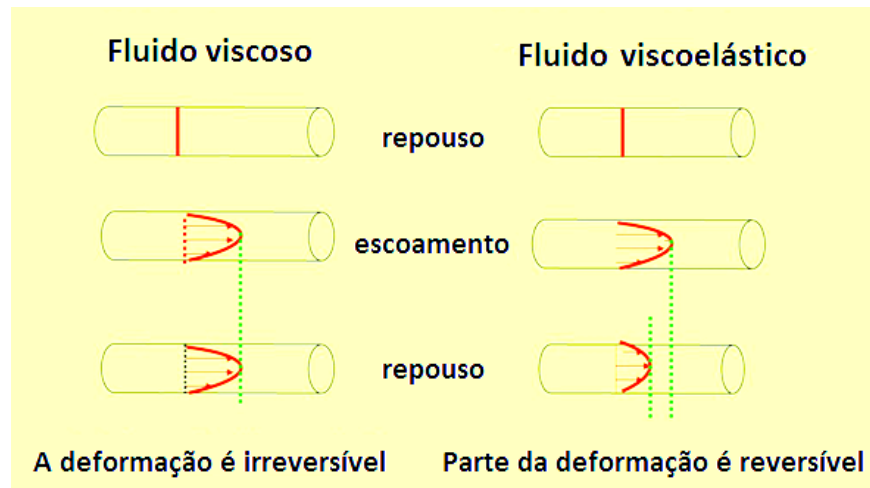
De forma geral, o comportamento reológico pode ser dividido em:

- Comportamento elástico, no qual o material consegue restaurar a sua forma original quando a força externa é removida;
- Comportamento viscoso ou plástico, no qual após cessada a deformação, o material não é capaz de recuperar a sua forma.
- Comportamento viscoelástico, no qual o material apresenta ao mesmo tempo os dois comportamentos anteriormente citados.

As representações desses comportamentos podem ser observadas nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Representação do comportamento elástico

Fonte: <http://pir2.forumeiros.com/h69-molas-pag-1>

Figura 15 - Representação de um fluido viscoso e de um fluido viscoelástico

Fonte: Adaptado de <<http://slideplayer.com.br/slide/374857/>>

O comportamento viscoelástico ocorre em muitos sistemas formados por materiais poliméricos e está relacionado com as interações e com o arranjo das cadeias poliméricas no gel formado (BRETAS et al., 2000).

Matematicamente esse comportamento pode ser desmembrado em dois módulos (Equação 1): o primeiro (G') é denominado de módulo de armazenamento ou módulo elástico, em que após aplicada a deformação as cadeias poliméricas retornam a sua posição original; e o segundo (G'') é denominado módulo viscoso ou módulo de perda, em que após aplicada a deformação as cadeias poliméricas não retornam a sua posição original (BRETAS et al., 2000; ROHR, 2007).

$$G^* = G' + iG'' \quad (1)$$

Na literatura, diversos trabalhos relatam como as propriedades reológicas de blendas são afetadas pelas interações entre os componentes utilizados na preparação do gel. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo reológico de quitosana/gelatina em ácido adípico.

Em 2009 WANG, et al. estudaram, por reologia e por ensaios de tração, filmes de quitosana/gelatina obtidos em ácido láctico. Nesse estudo eles observaram ser possível projetar filmes com propriedades reológicas e mecânicas desejadas, apenas variando a proporção entre os polímeros. Além disso, com esses ensaios foi possível estudar que a formação de um complexo entre quitosana e gelatina ocorre principalmente através de ligações de hidrogênio.

A formação de ligações de hidrogênio com a quitosana também foi estudada por EL-HEFIAN, et al. (2010) utilizando a blenda quitosana/ágar. O ágar é uma mistura de polissacarídeos extraído da família de algas Rhodophyceae e assim como a gelatina, possui a capacidade de gelificação devido à formação de ligações de hidrogênio.

No estudo reológico da blenda quitosana/ágar EL-HEFIAN, et al. (2010) observaram que diferentes proporções mostravam diferentes propriedades reológicas devido aos diferentes graus de interação entre a quitosana e o ágar.

Também há na literatura vários trabalhos que mostram o efeito da reticulação nas propriedades reológicas, por exemplo, ARGUELLES-MONAL et al. (1998) e MI (2000) estudaram a reologia da quitosana dissolvida em ácido acético sem e com reticulação por glutaraldeído. Eles observaram que um aumento da reticulação levava a um gel mais forte e com maiores interações e/ou enovelamentos, o que levou a géis com módulos elásticos maiores e menores frequência de gelação ($G' = G''$). O mesmo foi observado por MOURA et al. (2007) no estudo reológico de soluções de quitosana reticulada com genipina.

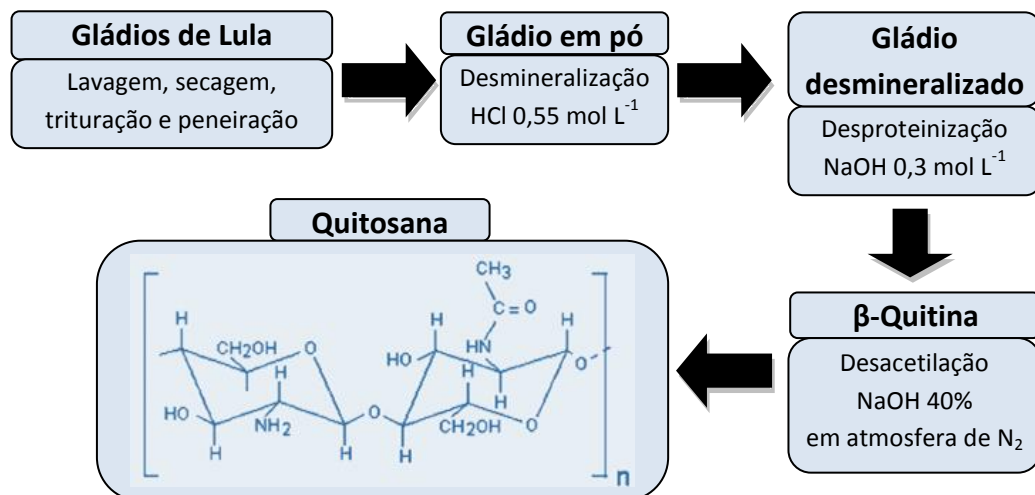
ROHR (2007) mostraram que géis altamente reticulados apresentarem um comportamento predominantemente elástico em todo o intervalo de frequência analisado o que pode ser explicado pela alta reticulação tornar os movimentos moleculares muito restritos o que faz com que o gel mostre um comportamento característico de sólido ($G' > G''$) em todo o intervalo de frequência analisado.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Obtenção da quitosana

A obtenção de quitosana foi feita a partir de β -quitina, extraída dos gládios de lula da espécie *Loligo ssp*, cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia-SP). O esquema geral para a obtenção de quitosana é mostrado na Figura 16.

Figura 16 - Processo de obtenção da quitosana (HORN, 2012)



Inicialmente os gládios foram lavados com água corrente, secos em estufa (40°C), triturados e peneirados de modo a obter 40,0 g de gládio em partículas com diâmetros menores que 0,25 mm. Em seguida o gládio em pó foi submetido à desmineralização, a desproteínização e a desacetilação (HORN, 2012).

Na etapa de desmineralização foram adicionados 600 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) $0,55 \text{ mol L}^{-1}$ à 40,0 g de gládio. A solução foi mantida sob agitação mecânica constante por 2 horas e em seguida filtrada. O procedimento foi repetido uma vez para maior eficiência da desmineralização. O sólido obtido foi lavado, com agitação mecânica, com água destilada por diversas vezes até alcançar

a neutralidade. Após as lavagens o gládio desmineralizado foi filtrado e seco em estufa a 50°C.

Para a desproteíntização, foram adicionados 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,3 mol L⁻¹ para cada 1,0 g do material obtido após a desmineralização. A solução obtida foi mantida a 80°C sob agitação mecânica constante por 1 hora e em seguida filtrada. O processo foi repetido uma vez e o sólido obtido foi lavado e filtrado, do mesmo modo que na etapa anterior.

Na desacetilação foram adicionados 20 mL de solução de hidróxido de sódio 40% para cada 1,0 g de β-quitina. O sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e sob agitação mecânica constante por 3 horas à 80°C, em seguida a solução foi filtrada. O processo foi repetido uma vez, e a quitosana obtida foi lavada e seca, conforme descrito na etapa de desmineralização.

4.2 Caracterização da quitosana

4.2.1 Determinação do grau de acetilação

A quitosana obtida foi caracterizada quanto ao seu grau de acetilação por titulação condutimétrica (RAYMOND, L. et. al., 1993). Após secagem em estufa a 50°C por uma semana, 250 mg de quitosana foram adicionadas a 50 mL de uma solução de HCl 0,05 mol L⁻¹. Em seguida a mistura foi mantida sob agitação magnética constante até completa homogeneização (cerca de 24 horas). A solução obtida foi diluída para 250 mL com água deionizada. Desta retirou-se três alíquotas de 50 mL para titulação com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, previamente padronizada com ácido oxálico. Para as medidas de condutividade utilizou-se um condutivímetro da Digimed modelo DM-32 à 25°C.

4.2.2 Determinação da massa molar média

A determinação da massa molar média da quitosana foi feita por viscosimetria (MATHEW et al., 2006). Os tempos de escoamento foram medidos em

um viscosímetro capilar de vidro tipo Ubbelohde, à T de 25°C, com um cronômetro digital. As concentrações de quitosana nas soluções analisadas variaram de 1,5 a 4,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas em tampão 0,3 mol L⁻¹ ácido acético/0,2 mol L⁻¹ acetado de sódio pH 4,5. Para cada concentração foram feitas dez determinações independentes do tempo de escoamento e utilizou-se o tempo médio de escoamento da solução (t) e o tempo médio de escoamento do tampão (t₀) para determinar a viscosidade reduzida da solução (η_{red}) conforme mostrado na equação 2.

$$\eta_{red} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Após os cálculos um gráfico de viscosidade reduzida versus concentração foi obtido e a viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada pela extrapolação a concentração zero da reta obtida por ajuste matemático.

Por fim o valor da massa molar média (M) foi determinado usando a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3).

$$[\eta] = k M^\alpha \quad (3)$$

Em que k e α são constantes empíricas que dependem do solvente, da temperatura e do polímero utilizado.

4.3 Preparação dos géis

Os géis de quitosana foram preparados na concentração de 1% e 2% (massa/massa), por solubilização de quitosana nos ácidos acético (0,14 mol L⁻¹) e adípico (0,07 mol L⁻¹). As concentrações dos ácidos foram escolhidas para manter o mesmo número de funções ácido carboxílico. Além disso, a dissolução foi feita lentamente e a adição do polímero foi aos poucos até completa diluição. A agitação foi mecânica, a temperatura ambiente e para a completa diluição do polímero o gel ficou sob agitação por 24 horas.

4. Procedimentos Experimentais

Nos diferentes ácidos também foram preparadas blends de quitosana/gelatina na proporção 1:1 usando soluções de quitosana e de gelatina na concentração de 1%. A gelatina utilizada foi do tipo A obtida de pele de porco, da Sigma.

Para completa solubilização, todos os géis foram submetidos a agitação mecânica por 24 horas, seguida de aquecimento a 60°C por 30 minutos.

Por fim, os géis de quitosana/gelatina foram reticulados com EDC/NHS após adição desses reagentes previamente dissolvidos em etanol na proporção molar 1:1. A massa de EDC usada na reticulação do gel foi calculada para obtenção de uma concentração de 1% no gel.

A nomenclatura dada para os géis pode ser visualizada na tabela 2.

Tabela 2 - Denominação dos géis preparados

Nomenclatura	Composição
Q1G0C	1% Quitosana + Ácido acético
Q1G0D	1% Quitosana + Ácido adípico
Q2G0C	2% Quitosana + Ácido acético
Q2G0D	2% Quitosana + Ácido adípico
Q1G1C	1% Quitosana + 1% Gelatina + Ácido acético
Q1G1D	1% Quitosana + 1% Gelatina + Ácido adípico
Q1G1C(E)	1% Quitosana + 1% Gelatina + Ácido acético + EDC:NHS
Q1G1D(E)	1% Quitosana + 1% Gelatina + Ácido adípico + EDC:NHS

4.3.1 Ensaio reológico dos géis

Os géis foram submetidos à quatro diferentes ensaios em um reometro AR1000N, da TA Instruments, com geometria cone/placa de 20 mm de diâmetro, ângulo de 2° e gap de 69 µm. As metodologias usadas são mostradas na tabela 3.

Tabela 3 - Metodologias usadas para os diferentes ensaios reológicos

Ensaio	Metodologia
Ensaio de Oscilação	Foram determinados os valores de G' e G'' em função da variação de deformação à T de 25°C e frequência de 1,0 Hz.
Ensaio de Frequência	Variando-se os valores de frequência angular de 0,1 a 100 rad s^{-1} a T de 25°C e deformação de 10% foram medidos os valores de G' e G'' .
Ensaio de fluxo em função de cisalhamento	Foi medida a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento num intervalo de 0,2 a 1000 s^{-1} à T de 25°C.
Ensaio de fluxo em função da temperatura	Utilizando uma razão de aquecimento de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e cisalhamento de 1 s^{-1} foi determinado como a viscosidade varia na faixa de temperatura de 25 a 80°C.

4.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Para cada material, foram obtidos espectros FTIR a partir de filmes das amostras. Os filmes foram preparados pela pesagem de 0,3 g de gel em forma de Teflon® e deixado secar a T=25°C por 2 dias. Em seguida os filmes foram acondicionados em dessecador com pastilhas de hidróxido de sódio por 48 horas.

As medidas foram feitas em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo IRAffinity-1, Shimadzu. Por espectro foram feitos 64 scans, com resolução de 4 cm^{-1} , a faixa de medição foi de 4000 a 400 cm^{-1} e o software utilizado foi o IR solution.

4.5 Preparação e neutralização das esponjas

Para a obtenção de materiais em forma de esponja, 1 g de cada gel foi colocado em forma de Teflon® circular. Em seguida, os géis colocados nas formas foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos no congelador por 24 horas. Por fim os materiais congelados foram submetidos à liofilização em um liofilizador da EDWARDS modelo FREEZE DRYER Modulyo.

Após a obtenção das esponjas por liofilização, as amostras foram submetidas à neutralização para retirar os compostos ácidos e os compostos provenientes da reação de EDC/NHS que não ficaram ligados aos polímeros.

Para isso, cada esponja foi submersa por 2 horas em 50 mL de solução de bicarbonato de sódio 1 mol L^{-1} e mantida na geladeira por 24 horas. Em seguida a esponja foi submersa por 3 dias em 100 mL de água deionizada e mantida na geladeira, sendo efetuada três trocas de água no primeiro dia e quatro trocas de água nos outros dias (duas de manhã e duas à tarde). Todas as trocas de água foram feitas com água deionizada mantida na geladeira.

Ao final da neutralização as esponjas foram congeladas com nitrogênio líquido e mantidas no congelador por 24 horas. Em seguida foram novamente liofilizadas.

4.6 Caracterização das esponjas

Apenas as esponjas com a blenda quitosana/gelatina foram caracterizadas.

Isso foi feito, pois as esponjas com quitosana pura em ácido adípico se mostraram instáveis durante a neutralização com bicarbonato de sódio, pois se desfizeram parcialmente durante a neutralização.

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de avaliar e caracterizar morfológicamente as diferentes esponjas utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram cortadas, colocadas em stubs por fita condutora de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s.

Além disso, utilizando o software UTHSCSA Image Tool versão 3.0 nas imagens transversais obtidas por MEV, mediu-se o tamanho de poros para as esponjas, para cada qual fez-se 30 medidas em diferentes pontos da esponja e calculou-se o valor médio.

4.6.2 Medidas de espessura

Para avaliar e comparar como as diferentes composições afetam a espessura dos materiais preparados determinou-se a espessura média de cada esponja. A medida foi feita utilizando o software UTHSCSA Image Tool versão 3.0 nas imagens transversais obtidas por MEV. Para cada preparação fez-se 15 medidas em diferentes pontos da esponja e calculou-se o valor médio.

4.6.3 Avaliação da capacidade de absorção em PBS

Para cada esponja os seguintes passos foram seguidos:

- Pesagem para determinação de sua massa inicial;
- Imersão em 20 mL de PBS (pH=7,4) a 34°C em béquer de 50 mL;
- Pesagem para cálculo de absorção de água após 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 minutos.

Para cada composição o experimento foi feito em quintuplicata. Antes de cada pesagem a esponja foi colocada em contato com papel filtro por 5 segundos de cada lado, para retirada do excesso de água.

A quantidade de água absorvida (%) foi calculada pela equação 4:

$$\text{Absorção (\%)} = \left(\frac{m_t - m_0}{m_0} \right) \times 100\% \quad (4)$$

Em que m_0 representa o valor da massa (g) da esponja antes da imersão e m_t o valor após a absorção.

4.6.4 Determinação das concentrações de íons no gel.

Para calcular os íons proveniente do ácido adípico no gel mediu-se o valor de pH com um pHmêtro e em seguida as equações 5, 6 e 7 foram utilizadas (BUTLER, J. N. 1998).

$$[H^+] = 10^{-pH} \quad (5)$$

$$[HD^-] = \frac{CK_1[H^+]}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2} \quad (6)$$

$$[D^{2-}] = \frac{CK_1K_2}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2} \quad (7)$$

Em que:

$[H^+]$ = concentração de íons H^+

$[HD^-]$ = concentração de íons $C_6H_9O_4^-$

$[D^{2-}]$ = concentração de íons $C_6H_8O_4^{2-}$

pH = 4,38. Valor esse compatível com o pH da pele que varia de 4,0 a 6,0 (BRANGEL, 2011).

$K_1=3,80 \times 10^{-5}$; $K_2=3,89 \times 10^{-6}$; $C= 0,07 \text{ mol L}^{-1}$

4.6.5 Estudo de citotoxicidade

Os experimentos referentes ao ensaio de citotoxicidade foram feitos no Laboratório de Fotossensibilizadores – IQSC/USP, pela técnica responsável, Dra. Cláudia Bernal e orientação da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi.

Todas as manipulações foram feitas em capela de fluxo laminar, com materiais esterilizados e os experimentos seguiram a norma ISO 10993.

4.6.5.1 Preparo dos extratos

Para cada esponja adicionou-se uma quantidade de meio de cultura suficiente para a obtenção de relação esponja/extrato de 15 mg/mL. Essa quantidade de meio foi escolhida por ser suficiente para deixar todas as esponjas

submersas. Para o controle positivo e negativo o método de extração foi o mesmo das esponjas, e foram utilizadas luvas de látex para controle positivo e papel filtro esterilizado para controle negativo.

O meio utilizado foi ISCOVE com 10% de SFB (soro fetal bovino) e após submersas as esponjas foram deixadas em repouso, em estufa à 37°C por 13 dias. Após esse tempo o extrato foi coletado e utilizado nas análises.

4.6.5.2 Crescimento celular

Nos ensaios biológicos, foram utilizadas células VERO (ATCC CCL-81), de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*. As células cresceram aderidas em garrafas de polipropileno com 5 mL de meio de cultura (ISCOVE com 10% de SFB). As garrafas foram mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

Para retirar as células que não aderiram às garrafas o meio foi trocado após 24 horas e após 4 dias foi realizado o primeiro repique, o qual gerou quantidade de células ainda insuficiente para a realização do ensaio. Diante disso, as células foram mantidas em estufa sob condições já citadas, por mais 3 dias e um novo repique foi feito. Após esse repique as células permanecerem em estufa por mais 4 dias e então foi feita uma nova contagem das células. Essa nova contagem gerou células suficientes para o ensaio.

Vale relatar, que a contagem de células foi feita prevendo que seriam usadas 1×10^5 células por poço, conforme relatado por FRESHNEY, 2010.

4.6.5.3 Determinação da viabilidade e da concentração celular

A fim de determinar a quantidade de células viáveis e sua concentração, o meio de cultura contido nas garrafas foi descartado e as garrafas foram lavadas com uma solução de PBS. Esse procedimento possibilitou deixar apenas as células que aderiram à superfície da garrafa.

Em seguida adicionou-se uma solução de Tripsina com 0,02% de EDTA para “descolar” as células aderidas. Essa solução foi mantida por 2 minutos em contato com as células e então foram adicionados 5 mL de meio de cultura

ISCOVES com 10% de SFB. A adição de meio contendo o soro fetal bovino foi feita a fim de desativar a tripsina (FRESHNEY, 2010). Após 5 minutos a solução resultante foi transferida para um tubo cônico e centrifugado a 1000 rpm/min por 2 minutos.

A solução sobrenadante obtida após centrifugação foi então descartada e as células foram suspendidas em 1 mL de meio de cultura. Em seguida 100 µL dessa suspensão celular foi retirada e adicionou-se a esses 100 µL, 400 µL de PBS e 500 µL de solução 0,4% de corante *trypan blue*. Essa mistura foi então colocada em câmara de Neubauer para contagem das células. Vale relatar que o corante adicionado foi escolhido por ser incorporado apenas nas células mortas, permitindo diferenciá-las das células vivas.

Para contagem das células na câmara de Neubauer utilizou-se um microscópio óptico e a porcentagem de células viáveis foi calculada utilizando a equação 8:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número de células coradas}} \times 100\% \quad (8)$$

O resultado obtido foi de 95%, o qual permite prosseguir para o ensaio de citotoxicidade (FRESHNEY, 2010).

4.6.5.4 Ensaio de citotoxicidade

Em duas placas de 96 poços foram adicionadas 200 µL de meio contendo células na concentração de 1×10^5 células mL⁻¹ em todas as cavidades. Em seguida incubou-se as placas por 24 horas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C.

No dia seguinte, o sobrenadante foi retirado por aspiração e adicionou-se o extrato de cada uma das amostras sem diluição (200 µL de extrato) e com diluição de 50% (100 µL de extrato e 100 µL de meio) e de 25% (50 µL de extrato e 150 µL de meio). Cada concentração foi adicionada em quadruplicata. Além disso, para o controle negativo de células foi utilizado o extrato preparado com papel filtro esterilizado e para o controle positivo utilizou-se o extrato preparado com luvas de látex. Tudo foi incubado em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C.

Após 24 horas foram retirados os extratos por aspiração e adicionou-se, em todos os poços, 200 µL de tampão PBS e aspirou-se novamente. Em seguida

4. Procedimentos Experimentais

adicionou-se 200 μL de meio nos poços e as placas foram incubadas sob as mesmas condições já citadas. Após 24 horas foram acrescentados 50 μL de uma solução de MTT com concentração de 1 mg mL^{-1} e as placas foram novamente incubadas por 3 horas.

O sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) foi utilizado pois as células viáveis são capazes de reduzir o anel tetrazólico presente nesse sal. Isso ocorre devido à ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa dessas células. Essas enzimas ao reduzirem o anel tetrazólico formam cristais de coloração roxa, que permitem a quantificação das células viáveis (MOSMANN, 1983).

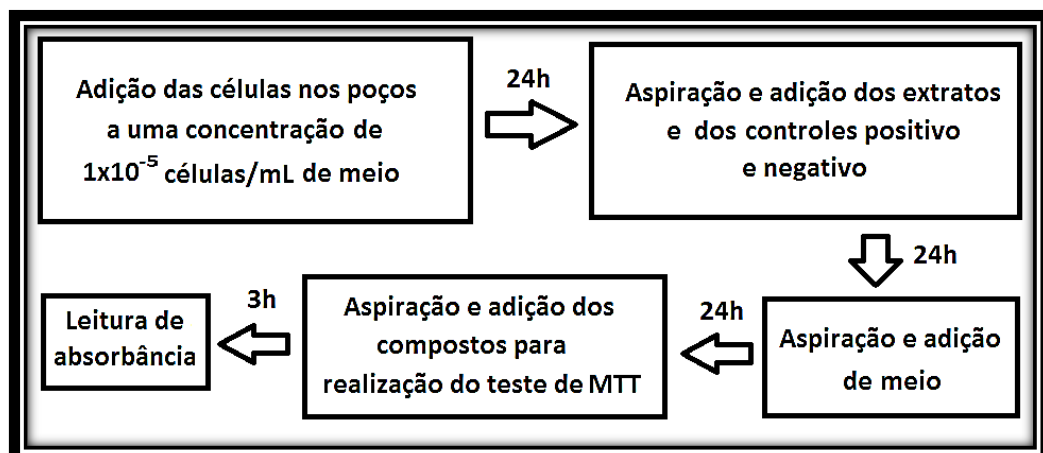
Após incubação com MTT por 3 horas, retirou-se o sobrenadante por aspiração e adicionou-se 50 μL de etanol P.A. para diluir os cristais formados. Em seguida, as células foram tratadas com 150 μL de uma solução de álcool isopropílico/PBS na proporção 1:1.

Para finalizar os ensaios as placas foram levadas à um leitor da Biotek, modelo Synergy HT, e em 570 nm fez-se a leitura de absorbância. Com essa leitura determinou-se o índice de sobrevivência celular pela equação 9.

$$\text{Índice de sobrevivência (\%)} = \frac{\text{média das absorbâncias da amostra}}{\text{média das absorbâncias do controle negativo}} \times 100\% \quad (9)$$

O esquema geral do ensaio de citotoxicidade pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Diagrama esquemático do ensaio de citotoxicidade



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da quitosana

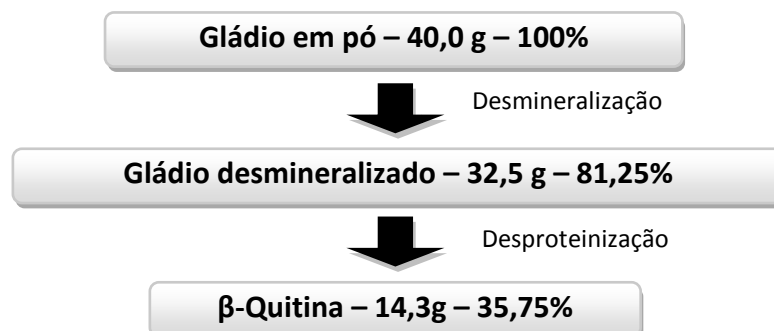
Conforme descrito no procedimento experimental a quitosana foi obtida após três etapas de preparação: desmineralização, desproteíntização e desacetilação. Os objetivos de cada etapa podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Objetivos de cada etapa feita para a obtenção de quitosana

Etapa	Objetivo
Desmineralização	Retirada dos materiais inorgânicos
Desproteíntização	Remoção das cadeias proteicas presentes entre as cadeias da quitina pela clivagem delas em peptídeos e/ou aminoácidos livres.
Desacetilação	Desacetilação da quitina para obter quitosana

Conforme pode ser observado na Figura 18, a porcentagem de quitina presente nos gládios é de 35,75% da massa inicial. Esse valor está dentro da faixa relatada por KURITA, K. (2006) para gládios de lula que é de 20 a 40%.

Figura 18 - Massas e porcentagens dos materiais obtidos antes e após desmineralização e desproteíntização



Além disso, o rendimento em relação à massa de quitosana obtida a partir de gládio foi de 28,5%, o que também está de acordo com o relatado por KURITA et. al. (1993), que está em torno de 30%.

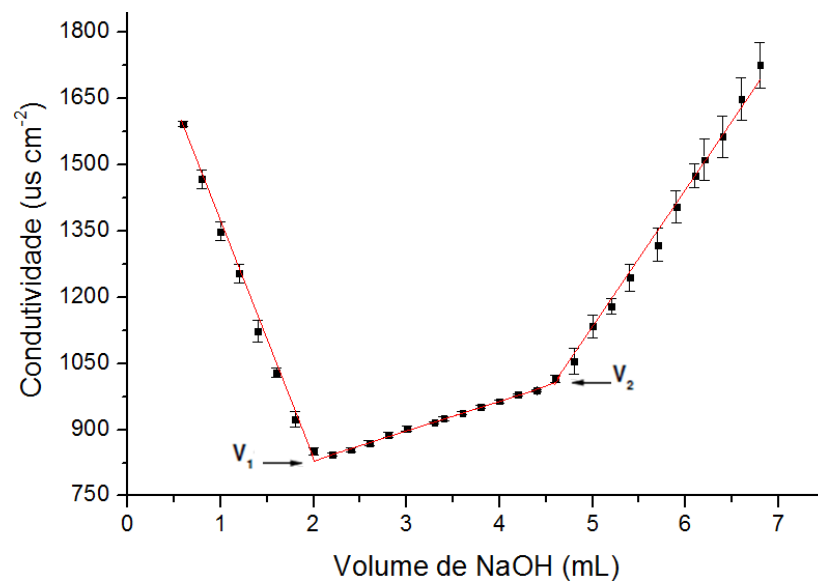
5.2 Caracterização da quitosana

5.2.1 Determinação do grau de acetilação

Para determinação do grau de acetilação da quitosana escolheu-se o método de titulação condutimétrica, pois além de simples, ele fornece valores próximos aos obtidos pela técnica de RMN 1H (ALVARENGA E. S., et. al. 2010, HORN, 2012).

A média dos valores obtidos pela titulação condutimétrica (feita em triplicata) e seus respectivos erros podem ser observados na curva mostrada na Figura 19. Esta curva representa a titulação da solução de quitosana com excesso de HCl pela adição de NaOH, previamente padronizado.

Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica



Conforme pode ser observado há dois pontos de inflexão, representados por v_1 e v_2 , esses correspondem respectivamente a neutralização de HCl, e a neutralização dos grupos amino da quitosana.

Após obtenção de v_1 e v_2 pela extrapolação das três retas obtidas na curva, o grau médio de acetilação foi calculado pela equação 10 (CARDOSO, 2008).

$$GA(\%) = \left(1 - \frac{(161 \times (v_2 - v_1) \times [NaOH])}{m}\right) \times 100 \quad (10)$$

Em que:

GA (%) = grau de acetilação médio da quitosana

161 = massa molar média da unidade repetitiva da quitosana (g mol^{-1})

$(v_2 - v_1)$ = volume de hidróxido de sódio utilizado para neutralizar a quitosana (L)

$[NaOH]$ = concentração de hidróxido de sódio (mol L^{-1})

m = massa de quitosana presente na alíquota (g)

O valor obtido para o grau médio de acetilação calculado foi de $11,9 \pm 0,4\%$, que está próximo ao citado por KURITA, K. (2006) que está entre 5 e 10%.

5.2.2 Determinação da massa molar média

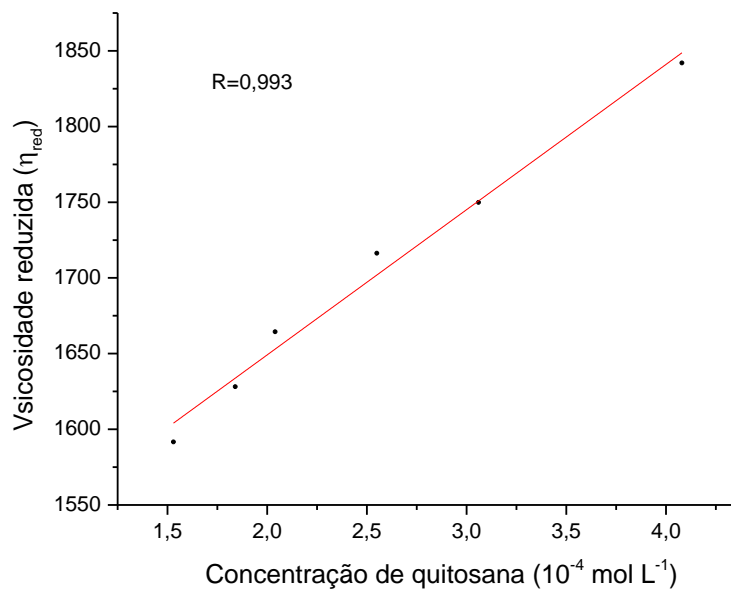
Visando determinar a massa molar média da quitosana, os tempos médios de escoamento de diferentes concentrações de quitosana em tampão acetato de sódio/ácido acético foram determinados conforme procedimento já descrito (tópico 4.2.2).

Após obtenção dos tempos médios de escoamento, para cada concentração calculou-se a viscosidade reduzida (equação 2). Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos tempos médios de escoamento e da viscosidade reduzida para cada concentração de quitosana

Concentração (10^{-4} g mL $^{-1}$)	Tempo médio (s)	Viscosidade reduzida (mL g $^{-1}$)
0	506,6±0,003	-
1,5	630,0±0,008	1591,7
1,8	658,4±0,009	1628,1
2,0	678,7±0,002	1664,4
2,5	728,4±0,006	1716,3
3,0	777,9±0,012	1749,9
4,0	887,4±0,008	1842,0

Com os valores das viscosidades reduzidas e das diferentes concentrações de quitosana em tampão acetato de sódio/ácido acético, construiu-se uma reta com índice de correlação linear de 0,993 e equação $f(x) = 95,9x+1457$ (Figura 20).

Figura 20 - Viscosidade reduzida em função da concentração de quitosana

Após a extrapolação da reta a concentração zero, encontrou-se a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, como sendo de $1457,3 \text{ mL g}^{-1}$.

Utilizando o valor de $[\eta]$, os valores de k e α para a quitosana com grau de acetilação de 12%, para o qual K vale $0,074 \text{ mL g}^{-1}$ e α vale 0,80 (RINAUDO, M. 2006), e a equação de Mark-Houwink (Equação 3), determinou-se a massa molar média da quitosana como sendo de $2,4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Esse valor está próximo ao encontrado por colegas de laboratório, tais como, DENARI (2014) que obteve uma massa molar média de $2,6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ e por SANTOS (2014) que obteve a massa molar média de $2,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. O resultado também está de acordo com o obtido por KURITA (1993), que obteve uma massa de $3,7 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Todos esses autores utilizaram o mesmo procedimento de obtenção da quitosana que o utilizado no nosso estudo.

5.3 Ensaio reológicos dos géis

5.3.1 Ensaio de oscilação

Os ensaios de oscilação fornecem a porcentagem de deformação no material após a aplicação de uma frequência fixa.

A partir desse ensaio é possível definir a região na qual as propriedades reológicas são independentes da tensão ou da deformação aplicada, isto é a região viscoelástica linear (BRETAS et al., 2000).

As Figuras 21 e 22 mostram os valores obtidos para G' (módulo elástico) e G'' (módulo viscoso) em função da deformação para os diferentes géis. Nas figuras é possível observar que a um valor de deformação de 10%, todos os géis estão na região viscoelástica linear. Dessa forma esse valor foi o escolhido para o ensaio de frequência.

5. Resultados e Discussão

Figura 21 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-○-) em função da deformação para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -△- Q2G0C e -△- Q2G0D

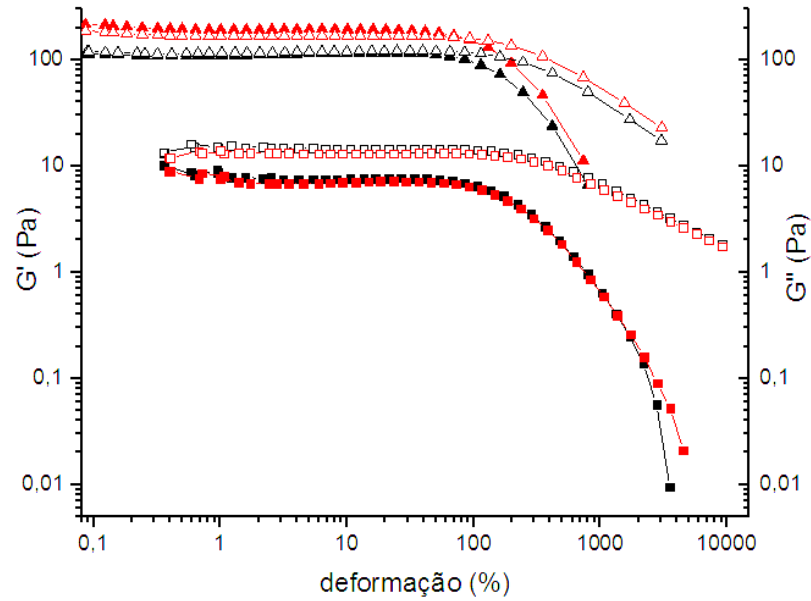
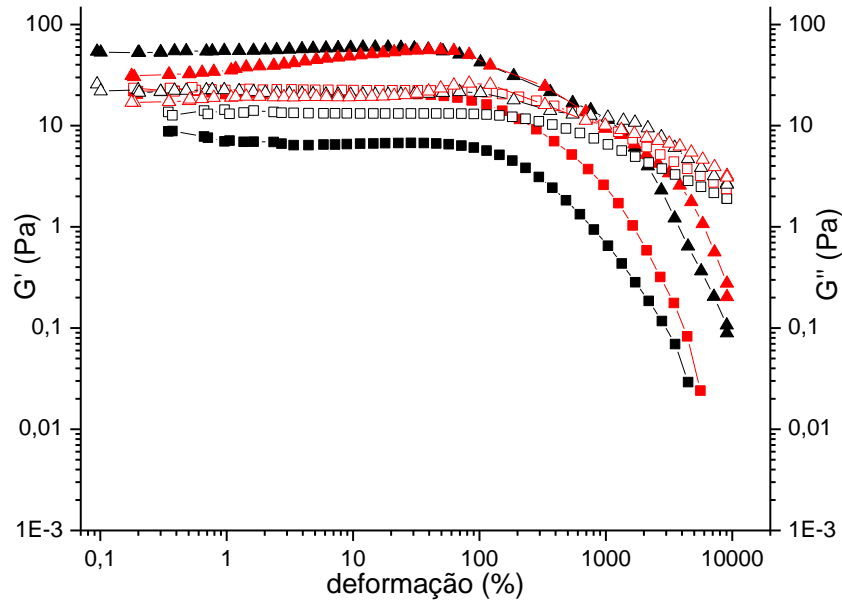


Figura 22 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-○-) em função da deformação para os géis -■- Q1G1C, -■- Q1G1D, -△- Q1G1C(E) e -△- Q1G1D(E)



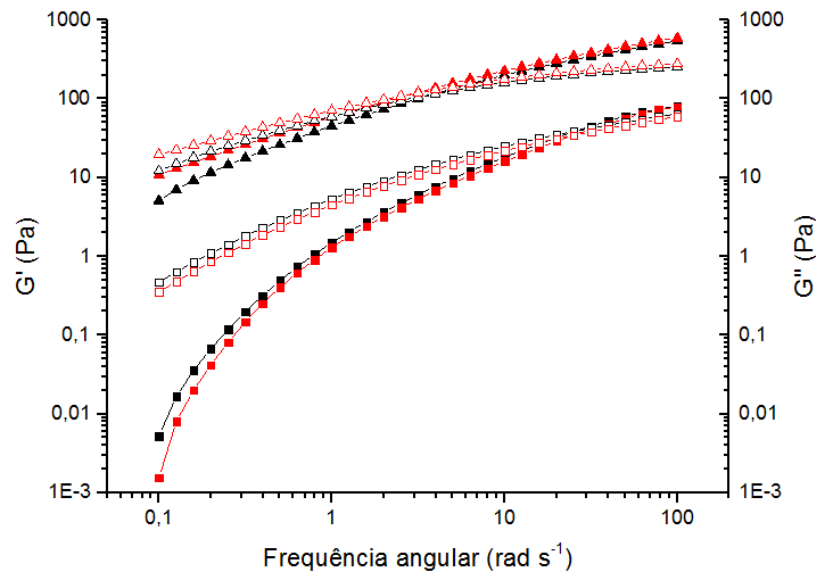
5.3.2 Ensaio de frequência

O ensaio de frequência foi utilizado para determinar os módulos elástico e viscoso para as diferentes composições quando essas são submetidas a diferentes frequências angulares. Na Figura 23 podem ser observados os resultados obtidos para os géis de quitosana.

Observa-se, a uma frequência angular de $0,1 \text{ rad s}^{-1}$, que quando a concentração de quitosana varia de 1% para 2% há um aumento de mais de 1000 vezes no valor de G' (módulo elástico) para o gel preparado em ácido acético. Já para o gel preparado em ácido adípico esse aumento é de mais de 10000 vezes.

Esse efeito é observado, pois à medida que a quantidade de polímero em solução cresce há um aumento do número de emaranhamentos do polímero e um aumento dos contatos intermoleculares e ambos atuam restringindo a movimentação polimérica (BRETAS et al., 2000; ALVES, 2008).

Figura 23 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -△- Q2G0C e -△- Q2G0D



Comparando-se os valores na concentração de 1%, observa-se que não há alteração nos módulos quando o polímero é dissolvido nos diferentes ácidos (acético ou adípico).

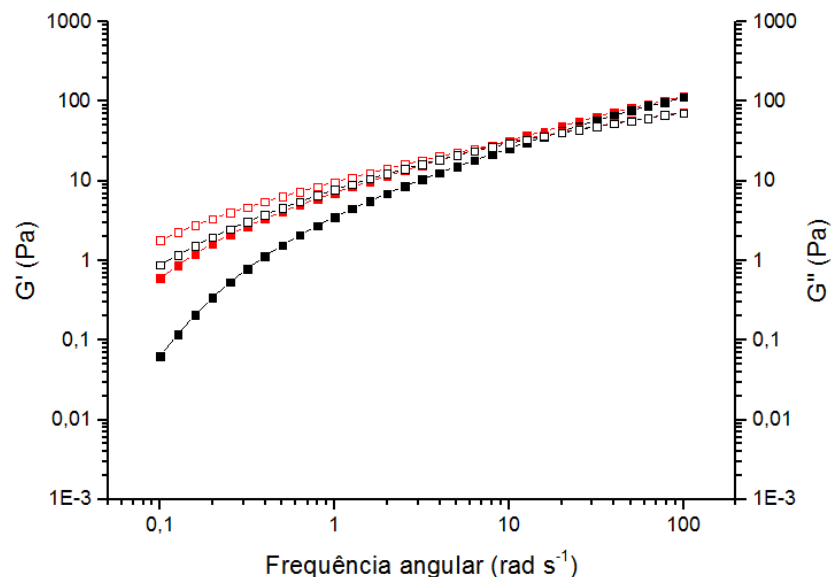
5. Resultados e Discussão

No entanto, na concentração de 2%, quando se usa ácido adípico para dissolver a quitosana em substituição ao acético, observa-se que há um aumento de 2 vezes no valor de G' (módulo elástico) à frequência angular de $0,1 \text{ rad s}^{-1}$.

Esse pequeno aumento, apenas a altas concentrações poliméricas, pode ser associado ao fato do ácido adípico possuir uma cadeia carbônica maior que o acético o que contribui para um maior emaranhamento das cadeias poliméricas quando há alta concentração de polímeros no gel.

Também pode ser observado pela Figura 23 que os géis de quitosana passam de um comportamento viscoso ($G'' > G'$) para um comportamento elástico ($G'' < G'$). Essa inversão de comportamento é denominada de gelação ($G' = G''$) e pode ser associada a soluções ou misturas em que as cadeias se apresentam enoveladas ou formam uma rede cruzada (ROHR, 2007). A gelação ocorre, pois sob altas frequências, os movimentos moleculares ficam restritos e o sistema tende a se comportar como um sólido ($G'' < G'$) (BRETAS et al., 2000; ROHR, 2007). Esse fenômeno também foi observado nas blendas de quitosana/gelatina (Figura 24).

Figura 24 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis — Q1G1C e — Q1G1D



Nas blendas de quitosana/gelatina (Figura 24) observa-se, comparando-as com o gel de 1% de quitosana (Figura 23) que, à frequência angular de

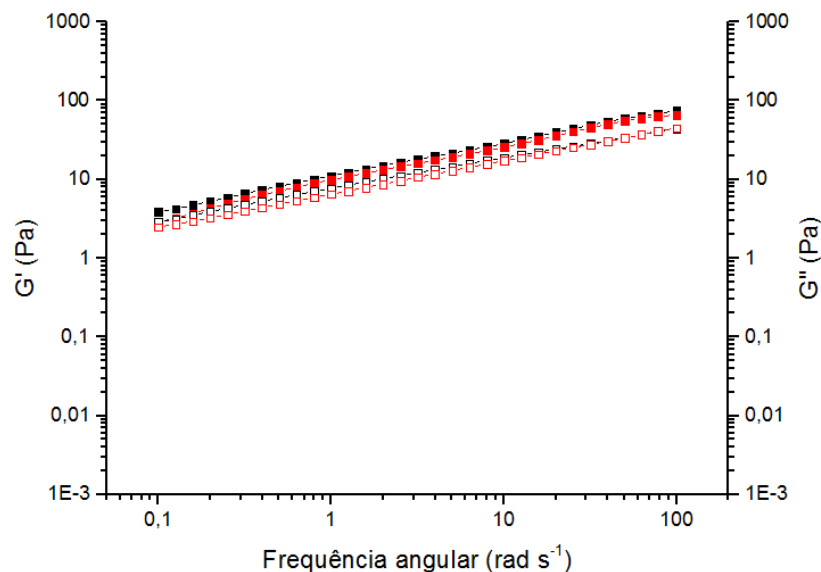
0,1 rad s⁻¹, o uso de gelatina aumenta em mais de 10 vezes o valor de G' (módulo elástico) no ácido acético e em cerca de 600 vezes no ácido adípico.

Um maior módulo elástico com o uso de gelatina ocorre devido a interação entre esses polímeros que aumentam o emaranhamento do gel (LEFFLER et. al.,2000; WANG et al., 2009).

Também na Figura 24, observa-se que G' (módulo elástico) aumenta em 10 vezes quando a blenda é dissolvida em ácido adípico, em substituição ao acético. Esse aumento ocorre devido ao tamanho da cadeia do ácido dicarboxílico, o que leva à um emaranhamento mais acentuado e conseqüentemente aumenta G'.

Na Figura 25 são mostradas as curvas G' e G'' para as blendas após adição de EDC/NHS.

Figura 25 - Módulo elástico - G' (-■-) e módulo viscoso - G'' (-□-) em função da frequência angular para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E)



Nessa figura pode ser observado que o módulo elástico é maior que o viscoso (G'>G'') em todo o intervalo de frequência analisado. O fato desses géis apresentarem um comportamento predominantemente elástico em todo o intervalo de frequência analisado pode ser explicado por um maior emaranhamento das cadeias poliméricas, promovido pela reticulação após o uso de EDC/NHS. Isso porque a reticulação gera um maior emaranhamento, o que torna os movimentos moleculares muito restritos e faz com que o gel mostre um comportamento

5. Resultados e Discussão

característico de sólido ($G' > G''$) em todo o intervalo de frequência analisado (ROHR, T. G., 2007, ARGUELLES-MONAL, W. et al., 1998; MI, F.L. et al., 2000).

Na tabela 6 são mostrados os valores dos módulos para as composições sem EDC/NHS à diferentes valores de frequência. Além disso, nessa tabela também é possível observar os valores de frequência em que ocorre a gelação ($G' = G''$) nos géis.

Tabela 6 - Valores de G' e G'' (Pa) à diferentes valores de frequência e valor de frequência em que ocorre a gelação para as diferentes composições

Amostras	G' e G'' (Pa)								Frequência da Gelação (rad s ⁻¹)
	Frequência (rad s ⁻¹)								
	0,1		1		100		1000		
	G'	G''	G'	G''	G'	G''	G'	G''	
Q1G0C	0,005	0,5	1,5	5,3	18,2	22,2	81,5	64,2	25
Q1G0D	0,001	0,3	1,3	4,5	16,1	19,4	79,1	59,3	25
Q2G0C	5,100	12,2	45,3	59,9	199,5	161,2	542,0	253,1	4
Q2G0D	10,80	19,8	58,7	70,9	227,3	177,5	592,9	279,1	3
Q1G1C	0,060	0,9	3,6	7,8	25,8	29,8	113,7	71,2	16
Q1G1D	0,600	1,8	7,2	9,7	32,3	31,1	115,3	72,8	8

Ao comparar os valores da Tabela 6 para os géis observa-se que os valores de módulos crescem na seguinte ordem:

$$Q1G0D < Q1G0C < Q1G1C < Q1G1D < Q2G0C < Q2G0D$$

Enquanto os valores de frequência em que ocorrem a gelação decrescem nessa ordem:

$$Q1G0D = Q1G0C > Q1G1C > Q1G1D > Q2G0C > Q2G0D$$

Conforme consta na literatura, maiores valores de módulo elástico (G') indicam interações e/ou enovelamentos entre as cadeias poliméricas mais fortes

devido à um comportamento predominantemente característico de sólido. E menores valores de frequência em que ocorrem a gelação indicam que os géis alcançam um comportamento característico de sólido à um menor valor de frequência, o que está associado à redes poliméricas com densidade e forças de associações mais fortes (ARGUELLES-MONAL, W. et al., 1998; MOURA, J. M. et al., 2007; MI, F.L. et al., 2000).

Sendo assim, pode ser concluído que a ordem crescente de interações e/ou enovelamentos para as composições sem EDC/NHS deste estudo é:

$$Q1G0D \cong Q1G0C < Q1G1C < Q1G1D < Q2G0C < Q2G0D$$

Com a Tabela 6 também é possível observar que a 1 rad s^{-1} , para a amostra de quitosana de concentração 1% preparada em ácido acético, o valor de G'' é de 5,3 Pa e o de G' é de 1,5 Pa. Além disso, o valor de frequência angular em que ocorre a gelação é de 25 rad s^{-1} .

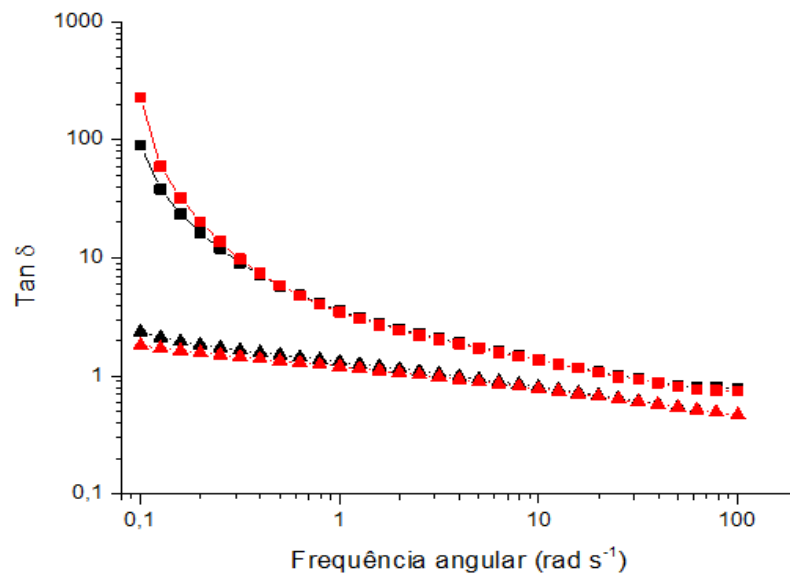
Esses valores numéricos estão próximos aos já relatados a 1 rad s^{-1} por DENARI (2014) para o gel de 1% quitosana de β -quitina em ácido acético, em que G'' foi obtido em torno de 5 Pa, G' em torno de 2 Pa e o valor de frequência angular em que ocorre a gelação foi de $28,13 \text{ rad s}^{-1}$. E estão próximos aos já relatados por CALERO, et. al. (2010) a 1 rad s^{-1} para o gel de 1% quitosana de α -quitina em ácido acético, em que G'' foi obtido em torno de 5 Pa e G' em torno de 1 Pa.

5.3.3 Tangente de perda para os ensaios de frequência

A razão entre o módulo viscoso (G'') e o elástico (G') é denominada de tangente de perda ($\tan \delta$). Quanto mais rígido o material, menor é o valor de $\tan \delta$ (BRETAS et al., 2000). Na Figura 26 podem ser observados os valores de da tangente de perda para os géis de quitosana.

Valores menores que 1 representam $G'' < G'$ (comportamento predominantemente elástico) e valores maiores que 1 representam $G'' > G'$ (comportamento predominantemente viscoso).

Figura 26 - $\tan \delta$ em função da frequência angular para os géis
 -■- Q1G0C, -■- Q1G0D, -▲- Q2G0C e -▲- Q2G0D



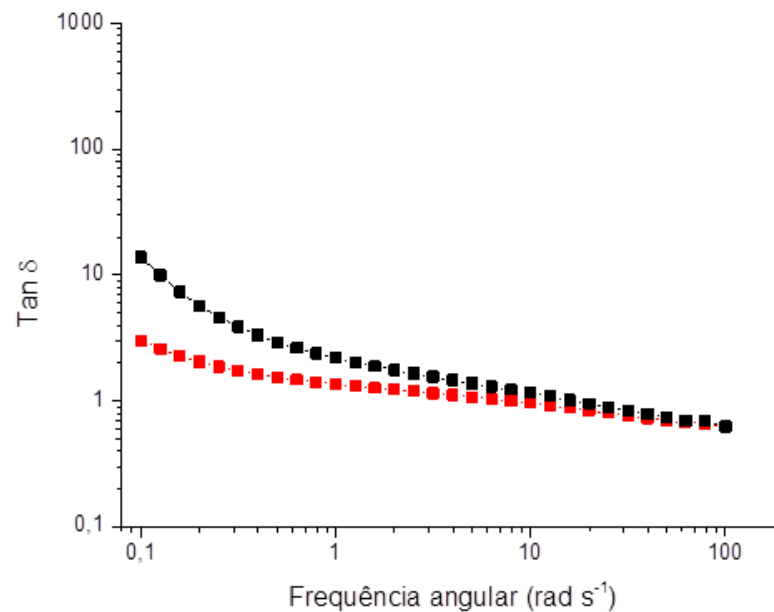
Para os géis com 1% de quitosana, independente do ácido, há uma maior dependência do valor de $\tan \delta$ com a frequência do que os géis com 2%. Isso pode ser observado na Figura 26, em que $\tan \delta$ decai exponencialmente para os géis com 1% de quitosana e após 1 rad s^{-1} decai linearmente. Esse comportamento já foi observado por MOURA et al.

No entanto quando há maior concentração de quitosana (2%), os géis, independente do ácido, tem um perfil de decaimento linear em todo o ensaio e os valores de $\tan \delta$ são mais baixos (gel mais rígido).

Isso ocorre pois há mais cadeias poliméricas no gel (maior emaranhamento) e por isso com 2% de quitosana o gel passa a se comportar predominantemente elástico ($\tan \delta < 1$) a menores valores de frequência.

Após o uso de gelatina (Figura 27), comparando com os géis de 2% de quitosana (Figura 26) observa-se que os valores de $\tan \delta$ estão abaixo dos valores encontrados para 2% de quitosana.

Figura 27 - $\text{Tan } \delta$ em função da frequência angular para os géis
— Q1G1C e — Q1G1D



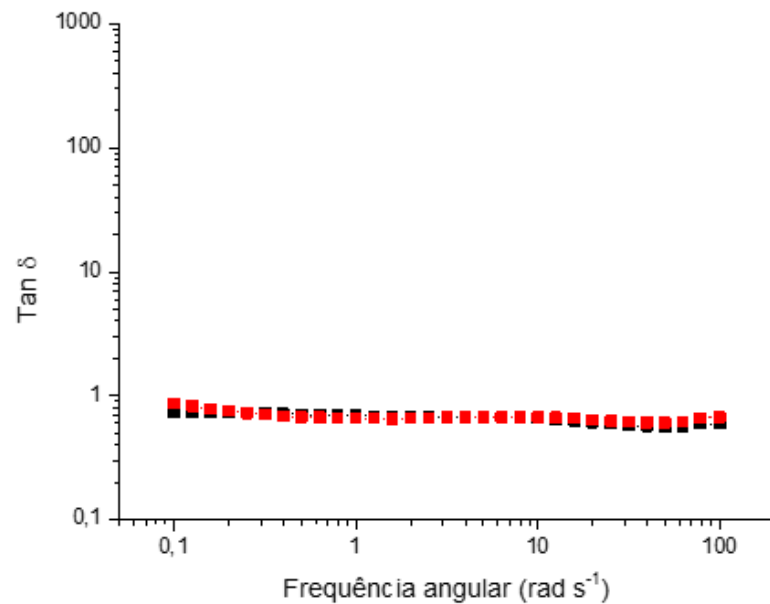
Isso mostra que o gel é mais rígido com 2% de quitosana do que com 1% de quitosana e 1% de gelatina. Como há a mesma porcentagem de polímeros no gel (2%), esse resultado pode ser associado ao tipo de interação entre os polímeros, pois quando há somente quitosana e ácido, a protonação da quitosana gera repulsão eletrostática entre as cadeias e essas ficam na forma de bastão rígido, o que favorece o emaranhamento a altas concentrações (ALVES, 2008).

Na presença de 1% de gelatina com 1% de quitosana, a interação entre os diferentes polímeros diminui a repulsão eletrostática e as cadeias tendem a se aproximar, favorecendo uma conformação na forma de “espiral” o que diminui o emaranhamento em relação ao gel com 2% de quitosana (WANG, 2009).

Com o uso de EDC/NHS (Figura 28) o emaranhamento é mais acentuado do que nos outros géis estudados, pois os géis apresentam tangente de perda menor que 1 em todo o ensaio de frequência, independente do ácido utilizado.

Esse maior emaranhamento pode ser associado a reticulação que faz com que as cadeias poliméricas apresentem um alto emaranhamento. O fato da reticulação diminuir o valor de $\text{tan } \delta$ já foi observado por MOURA, et. al. (2007), em estudos de reticulação de quitosana com glutaraldeído.

Figura 28 - $\tan \delta$ em função da frequência angular para os géis — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E)



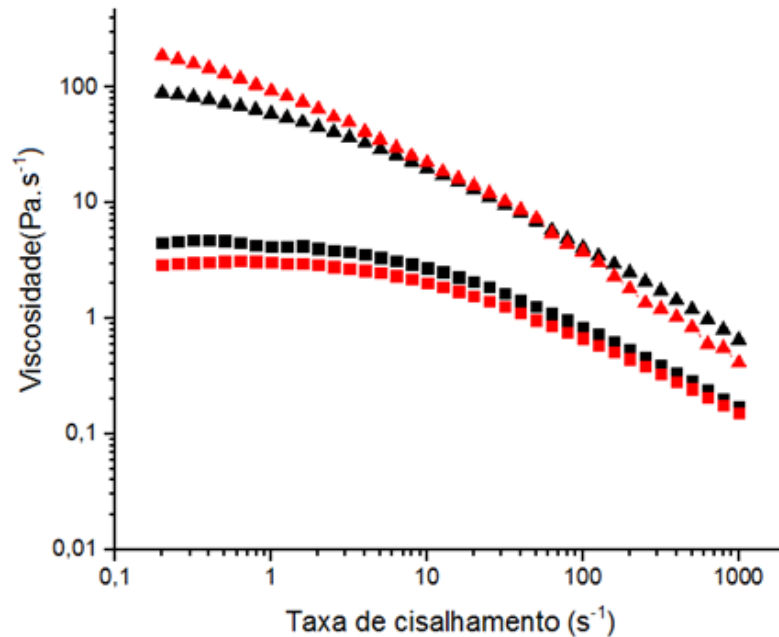
5.3.4 Ensaio de fluxo em função da taxa de cisalhamento

Os ensaios de fluxos foram feitos a fim de analisar como as viscosidades dos géis variam com as diferentes composições.

A viscosidade é a medida da resistência oferecida pelo gel quando uma de suas camadas se move em relação a sua camada subjacente. Uma maior viscosidade significa uma maior resistência ao movimento e uma menor capacidade de fluir/escoar (BRETAS et al., 2000).

Nos ensaios de fluxo para os géis de quitosana (Figura 29) pode ser observado que os géis com 1% iniciam com um comportamento newtoniano (os valores de viscosidade independem da taxa de cisalhamento), mas após 2 rad.s⁻¹ passam a ter um comportamento pseudoplástico (sua viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento). Já os géis com 2% de quitosana apresentam comportamento pseudoplástico em todo o intervalo analisado. O fato do efeito da pseudoplasticidade aumentar com o aumento da concentração de polímero está de acordo com o relatado para diversos sistemas de quitosana (DESBRIÈRES, 1996; ALVES, 2008).

Figura 29 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis —■— Q1G0C, —■— Q1G0D, —▲— Q2G0C e —▲— Q2G0D



Um comportamento pseudoplástico está associado a orientação das cadeias poliméricas após aplicação da taxa de cisalhamento. Desse modo, os resultados mostram que para a concentração de quitosana 1%, independente do ácido utilizado, as cadeias poliméricas só se orientam a uma maior taxa de cisalhamento. Isso ocorre pois, como elas estão em menor número, somente a taxas de cisalhamento acima de 2 s^{-1} é que as moléculas sentem o efeito da taxa cisalhante (BRETAS et al., 2000; ALVES, 2008; CHO, et al., 2006).

Na Figura 29 também se observa que a viscosidade à 1 s^{-1} aumenta em mais de 14 vezes com o aumento da concentração de quitosana de 1% para 2% quando se utiliza ácido acético e em mais de 30 vezes com o uso de ácido adípico.

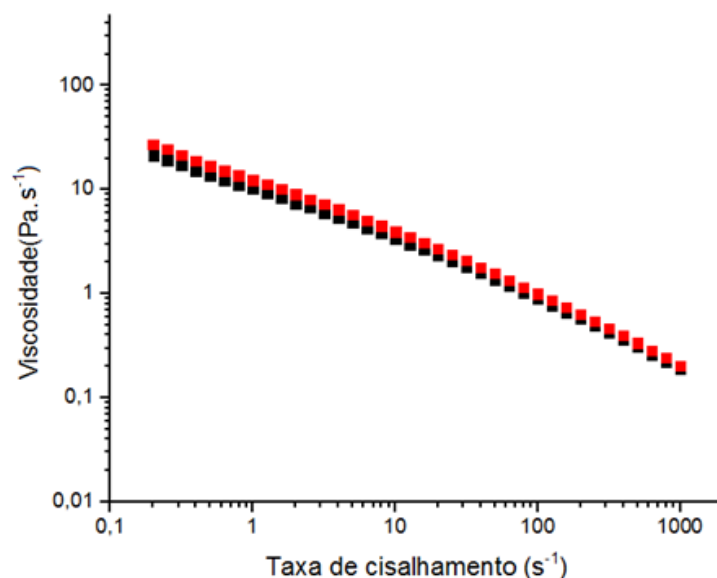
Esse aumento da viscosidade com o aumento da concentração de quitosana ocorre, pois em meio ácido a quitosana tem os grupos aminos protonados e assim geram cargas positivas (NH_3^+) que se repelem e geram um maior volume da molécula, o que aumenta a viscosidade da solução principalmente quando há mais moléculas de quitosana em solução (a 2% de concentração). Além disso, o aumento da concentração polimérica acarretará no aumento do número de emaranhamento que dificulta que o polímero flua (DESBRIÈRES et al., 1996; CHO et al., 2006; ALVES, 2008).

5. Resultados e Discussão

Quanto ao uso dos diferentes ácidos com quitosana observa-se que o uso de ácido adípico em substituição ao acético, leva a um aumento mais acentuado da viscosidade apenas com 2% de quitosana, pois a maiores concentrações há mais cadeias poliméricas e essas estão mais próximas, assim ao utilizar ácido adípico ao invés do acético há um aumento do emaranhamento das cadeias devido à maior cadeia desse ácido, o que dificulta o deslocamento entre as camadas do gel e aumenta o valor de viscosidade.

Quanto ao uso de gelatina com quitosana (Figura 30) também se observa um comportamento pseudoplástico em todo intervalo analisado.

Figura 30 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis — Q1G1C e — Q1G1D



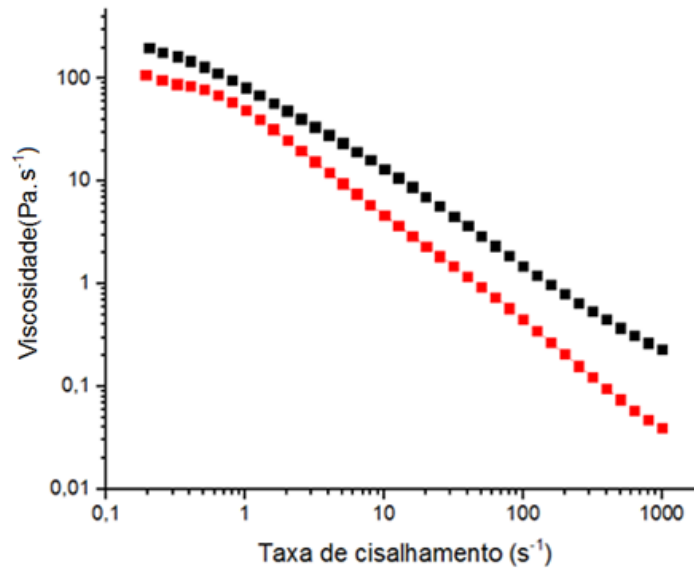
Além disso, nas blendas de quitosana/gelatina (Figura 30) observa-se, comparando-as com o gel de 1% de quitosana (Figura 29) que a 1 s⁻¹ há um aumento da viscosidade em cerca de 2,4 vezes quando se utiliza ácido acético e de cerca de 4 vezes quando se utiliza ácido adípico. Esse aumento de viscosidade mais acentuado torna o uso desse ácido promissor como agente espessante para a blenda de quitosana/gelatina.

Após a adição de EDC/NHS na blenda observa-se (Figura 31) que a viscosidade a 1 s⁻¹ aumenta em mais de 8 vezes com uso de ácido acético e em mais de 4 vezes com o uso de ácido adípico. Essa maior viscosidade está de acordo

5. Resultados e Discussão

com o obtido nos ensaios de frequência que mostraram um comportamento mais elástico para as blendas após adição de EDC/NHS.

Figura 31 - Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os géis — Q1G1C(E) e Q1G1D(E)



Os valores numéricos de viscosidade para as diferentes amostras sem EDC/NHS em diferentes taxas de cisalhamento foram coletados dos gráficos e expostos na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de viscosidade (Pa s⁻¹) à diferentes valores de taxa de cisalhamento para as diferentes composições.

Amostras	Viscosidade (Pa s ⁻¹)		
	taxa de cisalhamento (s ⁻¹)		
	1	100	1000
Q1G0C	4,2	0,8	0,2
Q1G0D	3,1	0,7	0,2
Q2G0C	59,0	4,1	0,7
Q2G0D	93,0	3,8	0,4
Q1G1C	10,1	0,8	0,2
Q1G1D	12,4	0,9	0,2

Ao analisar os valores da Tabela 7 pode ser observado que à baixas taxas cisalhantes (menor que 100 s^{-1}) a ordem de viscosidade para as diferentes composições não reticuladas crescem na seguinte ordem:

$$Q1G0D \cong Q1G0C < Q1G1C < Q1G1D < Q2G0C < Q2G0D$$

Essa ordem é a mesma que a encontrada nos ensaios de frequência. Ao observar a Tabela 7 também é possível notar que há uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, o que pode ser atribuído às taxas de ruptura serem superiores as taxas de formação de novas associações e emaranhamento. Assim, aumenta-se a mobilidade das cadeias de polímero, o que facilita o fluir e diminui a viscosidade.

Com a Tabela 7 também é possível observar que a 1 s^{-1} , para a amostra de quitosana de concentração de 1% preparada em ácido acético, o valor da viscosidade é de $4,2 \text{ Pa s}^{-1}$ e para a amostra de quitosana de concentração de 2% preparada em ácido acético a viscosidade é de $59,0 \text{ Pa s}^{-1}$.

Esses valores numéricos são maiores do que os já relatados a 1 s^{-1} por MARTINEZ, et. al. (2004) para o gel de 1% e 2% quitosana de α -quitina em ácido acético, em que as viscosidades observadas foram de cerca de 1 Pa s^{-1} e 40 Pa s^{-1} , respectivamente.

5.3.5 Ensaios de fluxo em função da temperatura

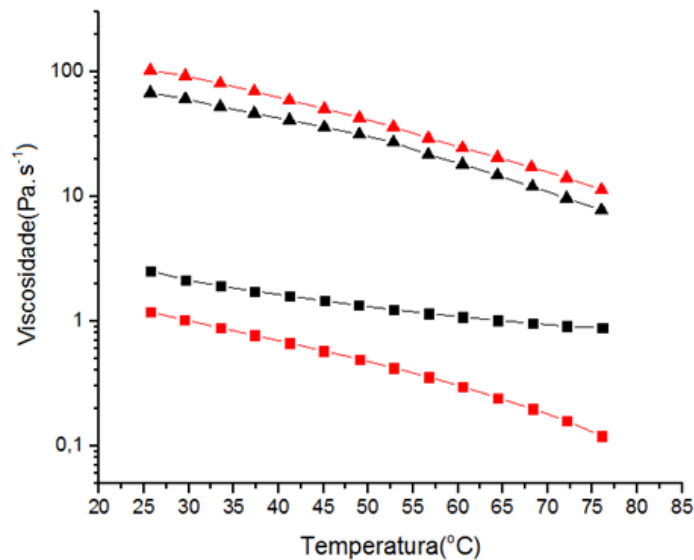
Nos ensaios de fluxo em função da temperatura para as amostras de quitosana (Figura 32) observa-se que o aumento da concentração de quitosana leva a um aumento de viscosidade de mais de 25 vezes no ácido acético e um aumento de mais de 80 vezes no ácido adípico. Esse aumento novamente foi mais acentuado com o uso de ácido adípico, o que indica seu maior efeito quando se aumenta a concentração de quitosana em solução, devido a maior cadeia carbônica do ácido adípico.

Além disso, na Figura 32, observa-se que as viscosidades dos diferentes géis de quitosana decrescem com o aumento da temperatura. Isso ocorre, pois com

5. Resultados e Discussão

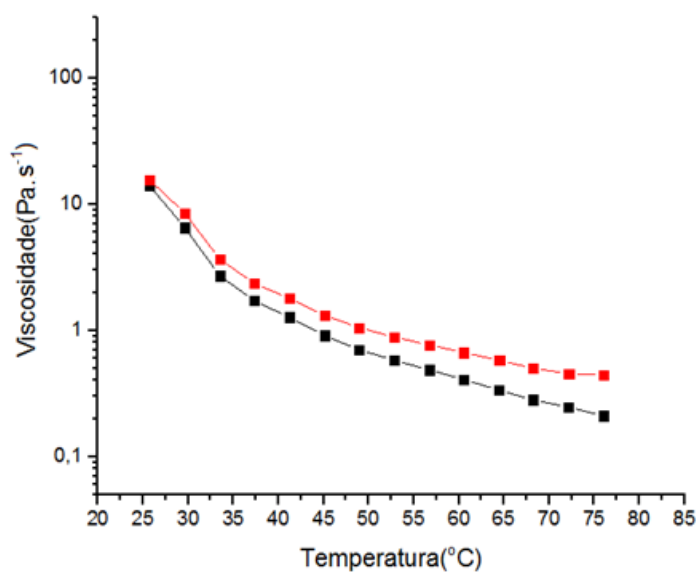
o aumento da temperatura, o fluxo molecular é facilitado, pois as ligações secundárias vão sendo quebradas e as tensões vão sendo aliviadas (BRETAS et al., 2000; ALVES, 2008).

Figura 32 - Viscosidade em função da temperatura para os géis
 —■— Q1G0C, —■— Q1G0D, —▲— Q2G0C e —▲— Q2G0D



Após a adição de gelatina (Figura 33) também se observa que a viscosidade decresce conforme aumenta-se a temperatura, o que já foi observado para a blenda em outros estudos.

Figura 33 - Viscosidade em função da temperatura para os géis
 —■— Q1G1C e —■— Q1G1D



No entanto nota-se que o decaimento antes de 30°C é menos acentuado, o que está associado ao fenômeno de gelificação (XING, et al. 2014). Isso ocorre porque uma solução de gelatina pode formar um gel por reticulação física em água abaixo de 30 ou 35 °C.

Esse processo ocorre, pois nessas condições as moléculas de gelatina conseguem agregar-se de modo a formar um enrolamento mais organizado. Além disso as cadeias de gelatina formam, nessas condições, ligações de hidrogênio intermoleculares que unem grandes porções do polímero e assim dificultam seu escoamento e aumentam a viscosidade da solução

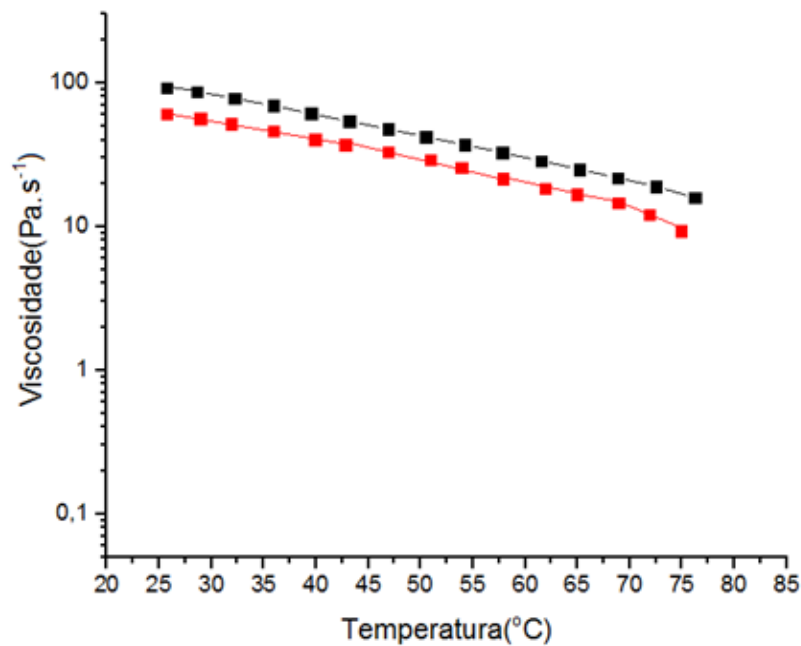
No entanto essas associações não são covalentes e assim são facilmente quebradas quando submetidas a temperaturas superiores a 30 ou 35 °C, dessa forma o aumento da temperatura leva a destruição da rede física o que diminui a viscosidade da solução (XING, et al. 2014).

Na figura 33 também pode ser observado que a 30°C, quando se compara a blenda com o gel de quitosana 1% (Figura 32), que o uso de gelatina leva a um aumento da viscosidade de cerca 1,5 vezes em ácido acético e um aumento de cerca de 4 vezes em ácido adípico.

Quanto ao efeito do uso de EDC/NHS na blenda (Figura 34) observa-se que a 30°C há um aumento de viscosidade de mais de 28 vezes em ácido acético e de mais de 14 vezes em ácido adípico, quando esses géis são comparados às blendas sem EDC/NHS (Figura 33). Esses aumentos ocorrem, pois, a reticulação aumenta o entrecruzamento entre as cadeias poliméricas por ligação covalentes e assim a movimentação molecular das cadeias é dificultada, o que aumenta a viscosidade da blenda.

Além disso, a maior viscosidade em ácido acético, também observada a 25°C nos ensaios de fluxo em função da taxa de cisalhamento, pode estar relacionada a reticulação da blenda ser maior nesse ácido, o que pode ser associado ao fato do ácido adípico dificultar a reticulação devido a sua maior cadeia carbônica que leva a um maior impedimento estérico.

Figura 34 - Viscosidade em função da temperatura para os géis
— Q1G1C(E) e — Q1G1D(E)



Os valores numéricos de viscosidade para as diferentes composições quando submetidas à diferentes valores de temperatura podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de viscosidade (Pa s^{-1}) à diferentes valores de temperatura para as diferentes composições.

Amostras	Viscosidade (Pa s^{-1})		
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	30	50	70
Q1G0C	1,9	1,3	1,0
Q1G0D	0,9	0,5	0,2
Q2G0C	52,31	31,3	11,9
Q2G0D	80,14	42,7	17,1
Q1G1C	2,71	0,7	0,3
Q1G1D	3,67	1,0	0,5
Q1G1C(E)	77,57	41,9	21,8
Q1G1D(E)	51,92	29,0	14,6

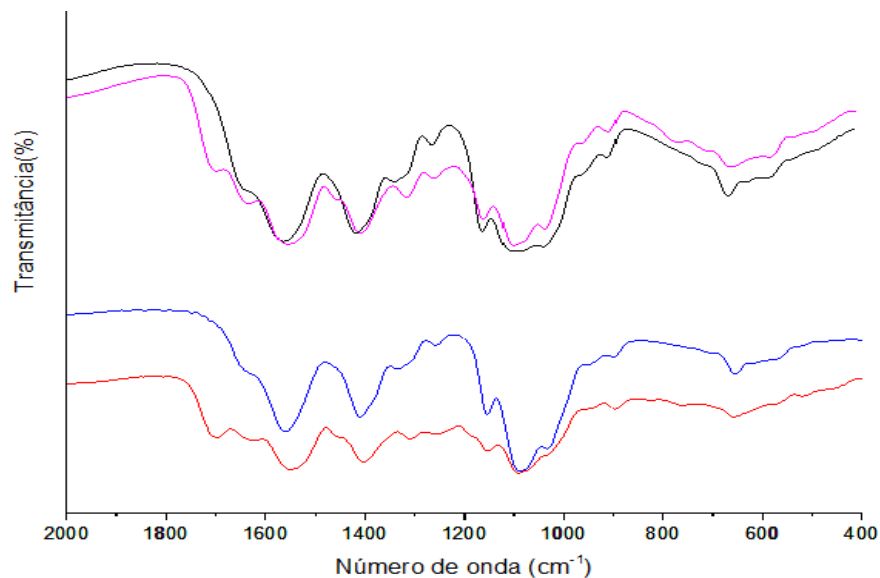
Nela observa-se que a ordem crescente de viscosidade está de acordo com a encontrada para os ensaios reológicos anteriores:

$$Q1G0D \cong Q1G0C < Q1G1C < Q1G1D < Q2G0C < Q2G0D$$

5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Em todas as preparações foi observada uma banda intensa de $3700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída à deformação axial de O-H, sobreposta a de N-H (Figura não mostrada). Na região de $2000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ os espectros obtidos para as amostras de quitosana podem ser visualizados na Figura 35.

Figura 35 - Espectros FTIR na região de $2000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ para os géis — Q1G0C, — Q1G0D, — Q2G0C e — Q2G0D



Os valores de número de onda encontrados na literatura para quitosana e ácido adípico em KBr e ácido acético gasoso e os obtidos nesse estudo podem ser observados na Tabela 9.

5. Resultados e Discussão

Tabela 9 - Bandas características para as amostras de quitosana em ácido acético e adípico
 Fonte: 1MITRA, et. al. 2012; 2 LI-FEN, et al. 2001; 3DENARI, N.S.M. 2014

Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)						
	Ácido Adípico ¹	Ácido Acético ²	Quitosana ³	Q1G0C	Q1G0D	Q2G0C	Q2G0D
C=O	1715	1733	-	-	1705	-	1700
Amida I ($\nu_{C=O}, \nu_{N-H}$)	-	-	1650	1640	1634	1640	1632
N-H: δ	-	-	1566	1560	1550	1560	1550
-COO⁻	1422	1428	-	1410	1406	1410	1404
-CO-N-	-	-	1334	1332	1311	1333	1310
C-N: ν	-	-	1257	1257	1257	1257	1256

Ao comparar as amostras de quitosana dissolvidas nos diferentes ácidos com a amostra de quitosana em pó, observa-se (Tabela 9) que o uso dos ácidos levou ao deslocamento dos picos de amida I, N-H e de -CO-N- para menores números de onda. NIAMSA E BAIMARK (2009) e DENARI, N.S.M. (2014) relataram que esses deslocamentos estão associados a presença de interações entre os grupos amida e amina da quitosana e as carbonilas do ácido. Além disso, pode ser observado que esses deslocamentos foram maiores com o uso de ácido adípico o que indica que com esse ácido há maior interação com a quitosana.

Na tabela 9 também pode ser observada nas amostras de quitosana preparadas nos diferentes ácidos a banda referente ao estiramento simétrico -COO⁻. Essa banda já foi relatada para a espoja de quitosana em ácido adípico por MITRA, et. al. 2012, em torno de 1407 cm⁻¹. O deslocamento para menores valores de onda indica a presença de interações eletrostáticas do ácido com a quitosana.

MITRA, et. al. 2012 também mostraram que as amostras de ácido adípico apresentam uma banda em 1715 cm⁻¹. Em nosso estudo as amostras Q1G0D e Q2G0D tiveram essa banda deslocada para menores valores de número de onda, o que também pode ser associado a interação desse ácido com a quitosana. FIORAMONTE, et al. (2014) estudou o efeito da interação de ácidos carboxílicos e mostrou que quando esse participa de interações em que o ácido atua como doador de prótons, a frequência no infravermelho associada ao estiramento do ácido

diretamente envolvido na interação é deslocada para menores valores no espectro, fenômeno conhecido como “redshift”.

Os espectros na região de 2000 a 400 cm^{-1} para as amostras de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/EDC/NHS podem ser observados na Figura 36, com os valores de número de onda mostrados na Tabela 10.

Figura 36 - Espectros FTIR na região de 2000 a 400 cm^{-1} para os géis — Q1G1C, — Q1G1D, — Q1G1C(E) e — Q1G1D(E)

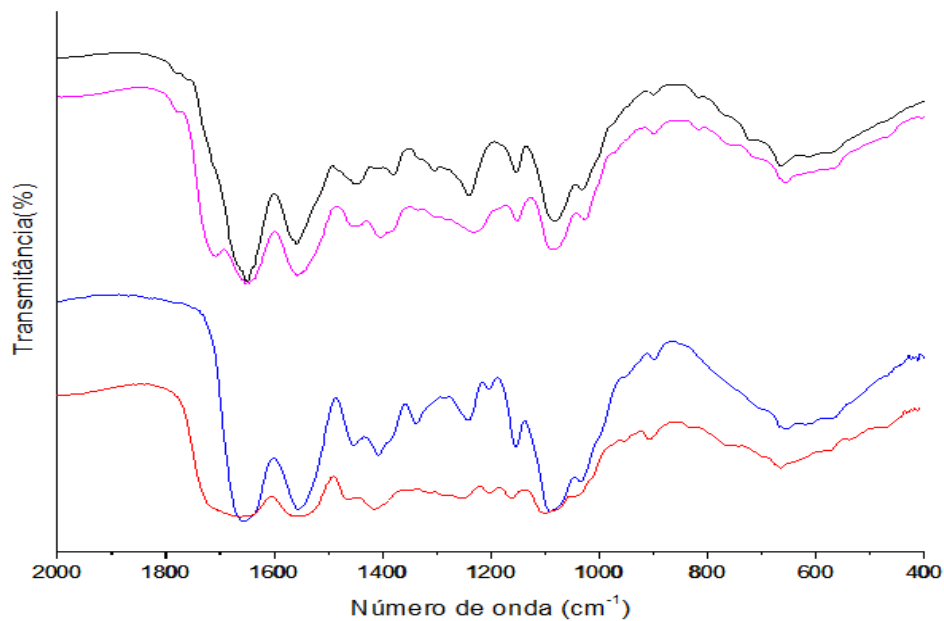


Tabela 10 - Bandas características para as amostras de quitosana/gelatina

Atribuições		Número de onda (cm^{-1})			
Quitosana	Gelatina	Q1G1C	Q1G1D	Q1G1C(E)	Q1G1D(E)
Amida I $\nu_{\text{C=O}}, \nu_{\text{N-H}}$	Amida I $\nu_{\text{C=O}}$	1654	1653	1650	1651
N-H: δ	Amida II $\delta_{\text{N-H}}, \nu_{\text{C-N}}$	1552	1552	1558	1560
	Amida III	1244	1242	1242	1242

Ao comparar os picos de amida I da Tabela 9 com os da Tabela 10, observa-se que o uso de gelatina deslocou essa banda para maiores comprimentos de onda. Esses aumentos podem ser explicados devido ao aumento das interações de NH_3^+ com COO^- . Esse deslocamento já foi observado em estudos de blends de quitosana/gelatina, para o qual o pico se deslocou de 1643 cm^{-1} para 1674 cm^{-1} após o uso de gelatina (SANTOS, 2014).

Além disso, na Tabela 10 observa-se que há um deslocamento da banda de N-H com o uso de EDC/NHS para maiores números de onda (próximos a 1560 cm^{-1}), independente do ácido. Esse aumento pode ser associado à formação de amida secundária pela reação do grupamento ácido carboxílico com o grupamento amina após reticulação promovida pelo uso de EDC/NHS. O grupo amida II, conforme relatado por LIMA, et. al. 2005, aparece em 1560 cm^{-1} .

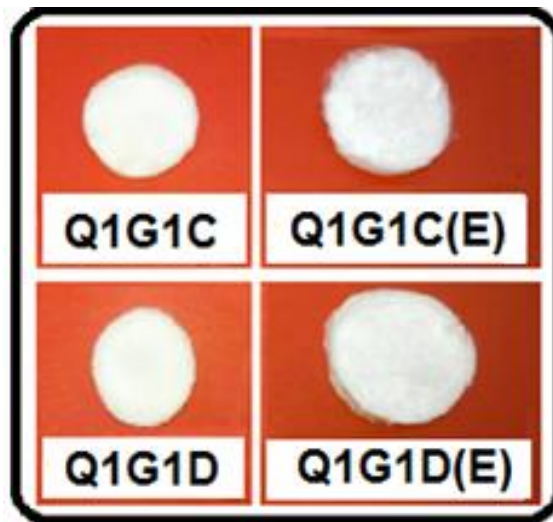
5.5 Preparação e neutralização das esponjas

A partir dos diferentes géis foram preparadas esponjas por liofilização. No entanto, as esponjas sem neutralização absorviam água e se deformavam com facilidade. Diante disso, essas esponjas foram neutralizadas.

Durante a neutralização, as esponjas de quitosana e ácido adípico se mostraram instáveis, pois após imersão em bicarbonato de sódio se desfizeram. Essa instabilidade não foi observada com as amostras de quitosana/gelatina, o que mostra que o uso de gelatina juntamente com a quitosana manteve a esponja estável durante o processo de neutralização.

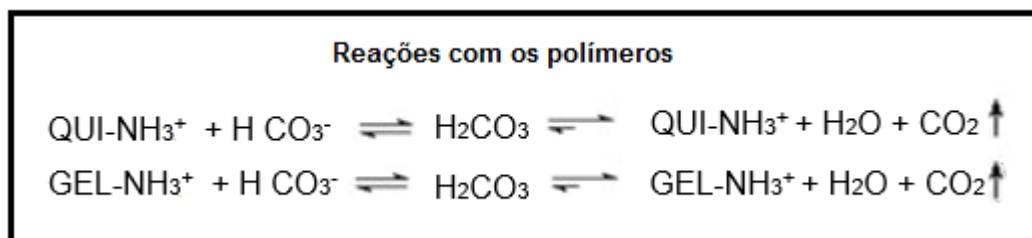
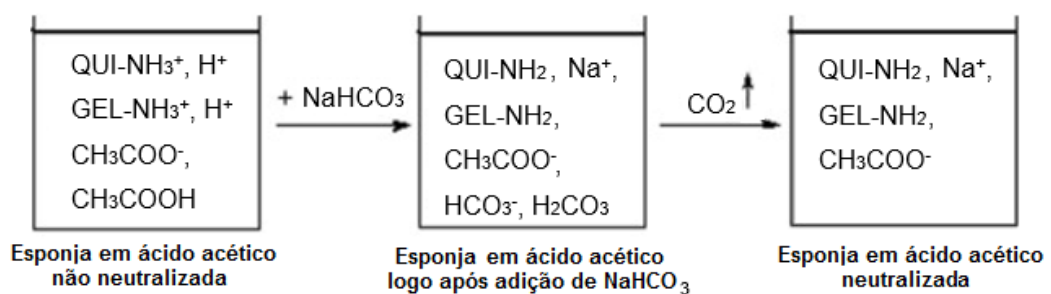
A fotografia digital das esponjas de quitosana/gelatina e quitosan/gelatina/EDC/NHS obtidas após neutralização podem ser observadas na Figura 37. Todas as esponjas obtidas possuem coloração branca e são macias ao toque, sendo as esponjas Q1G1C(E) e Q1G1D(E) levemente mais rígidas que as esponjas Q1G1C e Q1G1D.

Durante a neutralização observou-se ainda que as esponjas se expandiram, sendo a expansão maior para Q1G1D(E), como pode ser visto na Figura 37.

Figura 37 - Fotografia digital das esponjas de quitosana/gelatina com e sem EDC/NHS

A expansão durante a neutralização ocorre devido a formação de CO_2 com a neutralização das esponjas pelo bicarbonato (NaHCO_3), conforme esquematizado na Figura 38.

A maior expansão para Q1G1D(E), se comparada a Q1G1C(E) se deve as diferentes reações com EDC/NHS com os diferentes ácidos, a qual será mais detalhadamente explicada no experimento de absorção em PBS, no qual também observou-se uma maior absorção para Q1G1D(E).

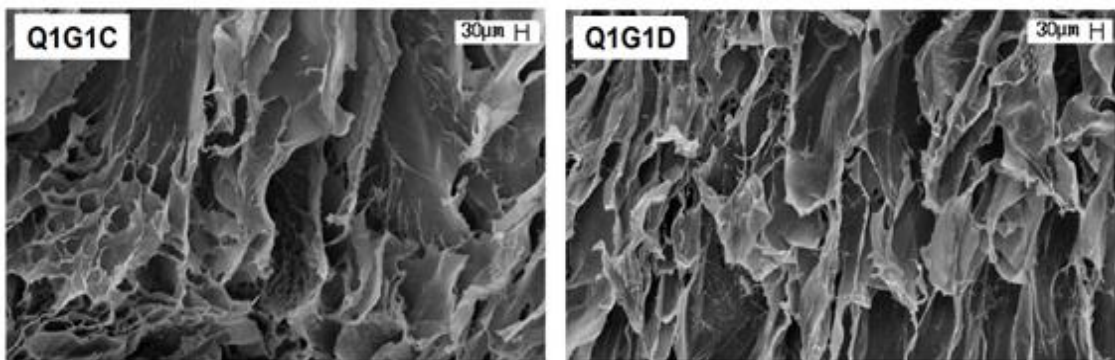
Figura 38 - Representação das reações de neutralização na esponja

5.6 Caracterização das esponjas

5.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

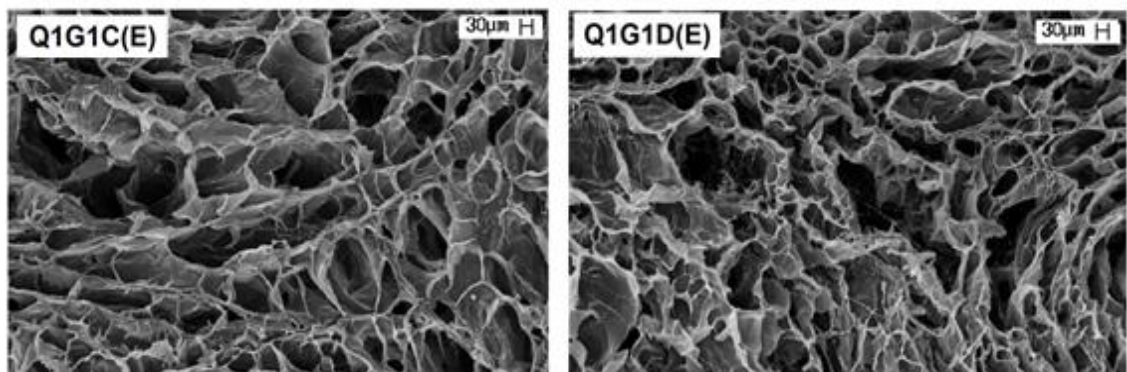
Os cortes transversais das esponjas de quitosana/gelatina e de quitosana/gelatina/EDC/NHS podem ser visualizados, respectivamente nas Figuras 39 e 40.

Figura 39 - Fotomicrografias das esponjas de quitosana/gelatina (200x)



Na Figura 39 observa-se que as esponjas Q1G1C e Q1G1D, apresentam morfologias em camadas. Na Figura 40, as amostras Q1G1C(E) e Q1G1D(E) apresentam poros interconectados formando redes, as quais possuem tamanhos médios de poro de $125,1 \pm 29,2 \mu\text{m}$ e $106,0 \pm 31,3 \mu\text{m}$, respectivamente.

Figura 40 - Fotomicrografias das esponjas reticuladas (200x)



A alteração da morfologia da esponja com o uso de EDC/NHS nos géis a partir dos quais as esponjas foram preparadas levou a formação de poros mais definidos (poros interconectados).

Essa mudança pode ser associada à reticulação promovida pelo uso desses reagentes que conectam as cadeias dos polímeros e conseqüentemente alteram o emaranhamento das cadeias conforme observou-se também por reologia.

5.6.2 Medidas de espessura

Na Tabela 11 são mostrados os valores de espessuras médias medidas das diferentes esponjas.

Tabela 11 - Valores de espessuras médias medidas

Esponjas	Q1G1C	Q1G1D	Q1G1C(E)	Q1G1D(E)
Espessura (mm)	2,30 ±0,08	2,19 ± 0,09	2,15 ± 0,17	2,00 ±0,09

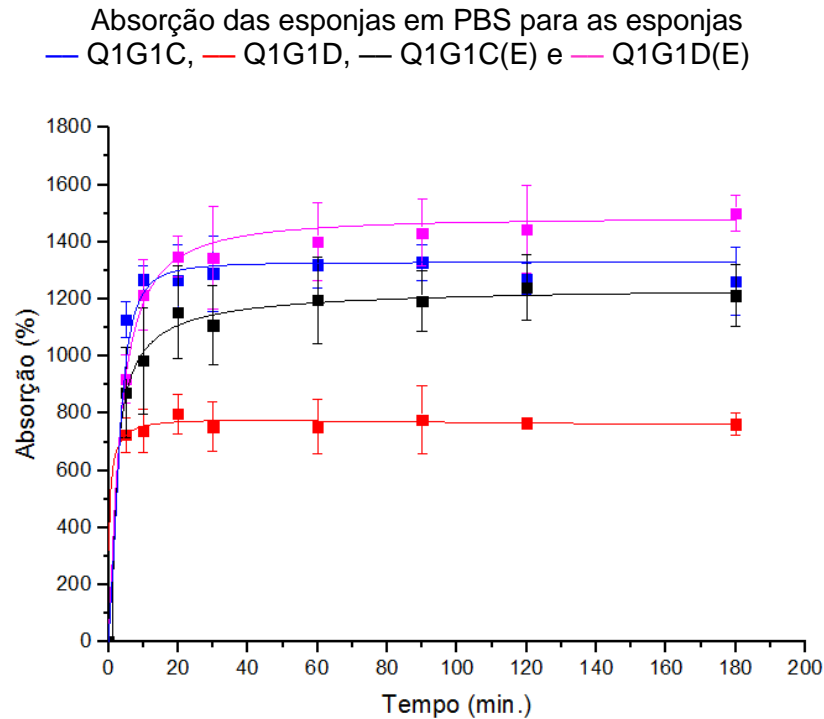
Conforme já esperado, não se observa diferenças entre as espessuras medidas para as diferentes composições.

Esse resultado é similar ao observado por SAILAKSHMI, et al., 2013, que mostraram que não teve diferença de espessura entre esponjas de quitosana obtidas com ácido acético ou com ácido adípico.

5.6.3 Avaliação da capacidade de absorção em PBS

Os resultados obtidos para absorção em PBS podem ser visualizados na Figura 41.

5. Resultados e Discussão

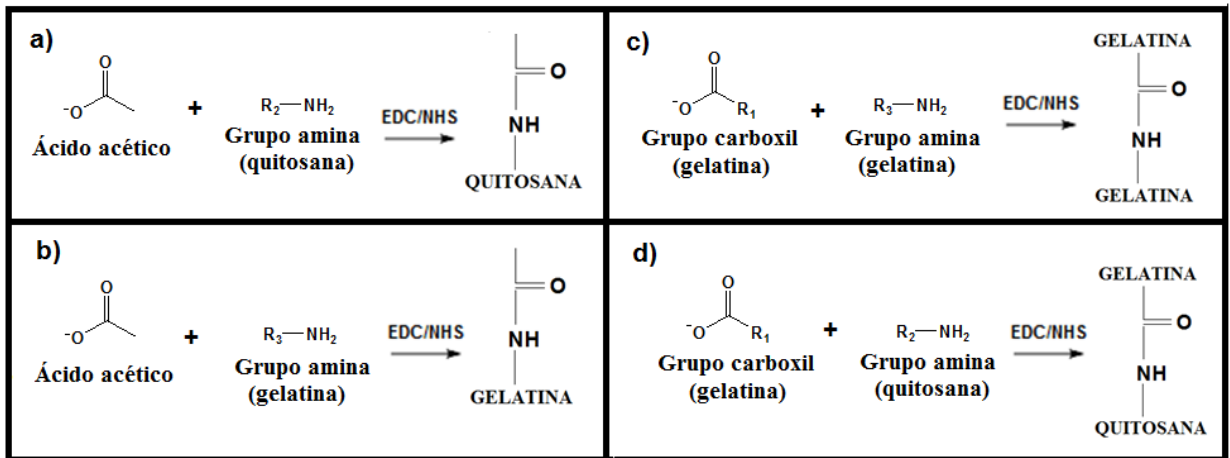


A esponja de quitosana/gelatina obtida a partir do gel preparado em ácido adípico chega a sua máxima absorção logo nos primeiros minutos. Além disso, ela é a que possui menor absorção de PBS. Isso ocorreu, pois o ácido adípico promoveu um maior emaranhamento entre as cadeias poliméricas aumentando as interações entre os polímeros (conforme mostrado por reologia), assim há menos grupamentos disponíveis para absorção de PBS (BERGER, J. et. al. 2004).

Na esponja obtida com o gel de gelatina/quitosana dissolvido em ácido acético observa-se que a máxima absorção ocorre em torno dos 10 minutos, no entanto nas esponjas obtidas com os géis de gelatina/quitosana/EDC/NHS a máxima absorção ocorre somente após cerca de 60 minutos, o que mostra que essas esponjas podem ter melhor aplicação em liberação controlada de fármacos, por exemplo.

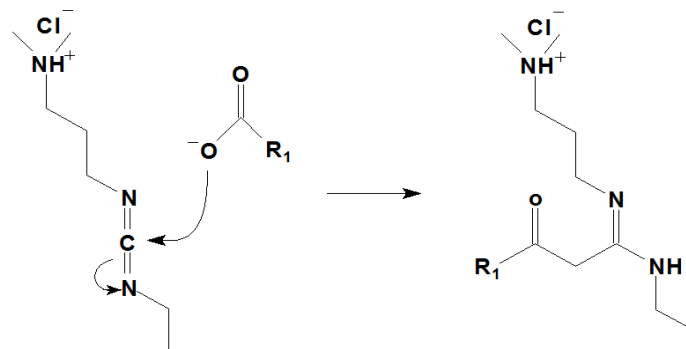
Também na Figura 41, observa-se que para as esponjas obtidas com os géis preparados em ácido acético o uso de EDC/NHS levou a uma diminuição da absorção de cerca de 10%. O uso de EDC/NHS em meio de ácido acético permite reações (Figura 42) que minimizam a absorção de PBS devido a formação de grupos menos polares provenientes da reação da carbonila (do ácido acético ou da gelatina) com os grupos amina da quitosana ou da gelatina.

Figura 42 - Reações possíveis para a formação de ligações amidas nos géis com quitosana, gelatina, ácido acético, EDC e NHS



Quanto a esponja Q1G1D(E), observa-se que ela apresenta maior absorção que a Q1G1D. Para entender esse resultado, é preciso saber que, conforme mostrado na Figura 43, a obtenção do intermediário O-acilisoureia é baseado no ataque nucleofílico do ácido desprotonado sobre o EDC (SOLOMONS, 2009).

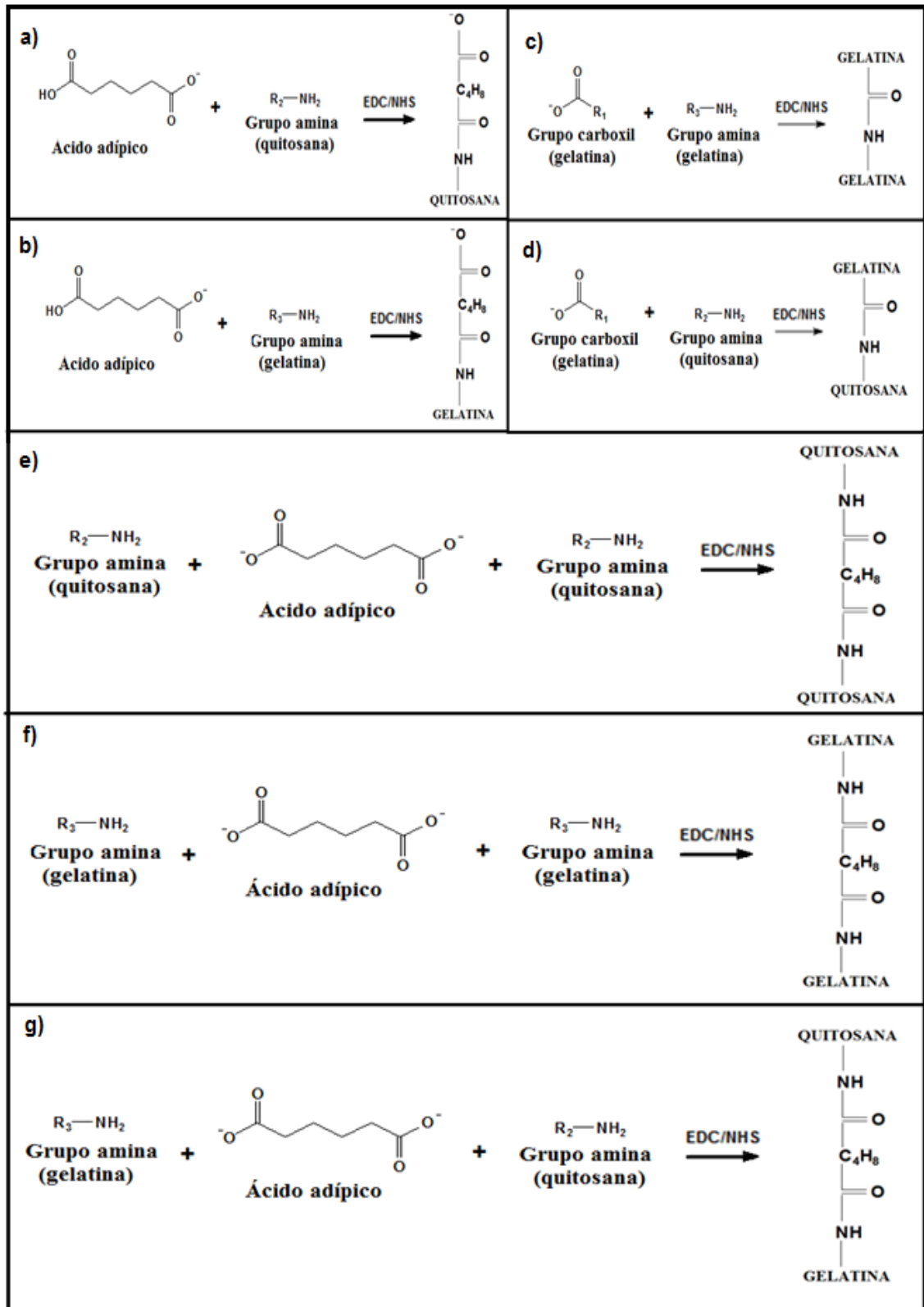
Figura 43 - Ataque nucleofílico do ácido desprotonado sobre o EDC



Assim, como o ácido adípico tem dois grupos carboxílicos que podem se desprotonar, o uso de EDC/NHS em ácido adípico pode tanto propiciar reações que inserem grupos negativos na cadeia polimérica e aumentam a absorção em PBS (Figura 44 a e b), quanto reações que diminuem a absorção devido a reticulação das cadeias poliméricas (Figuras 44 c, d, e, f e g).

5. Resultados e Discussão

Figura 44 - Combinações possíveis para a formação de ligações amidas nos géis com quitosana, gelatina, ácido adípico, EDC e NHS



Para saber quais reações possíveis serão predominantes, faz-se necessário calcular as espécies desprotonadas de ácido adípico em solução.

Assim, utilizando a metodologia descrita no tópico 4.6.4 obteve-se que $[HD^-] = 3190 \times 10^{-5}$ e $[D^{2-}] = 298 \times 10^{-5}$. Com isso, é possível observar que há mais íons monovalentes do que íons divalentes. Isso mostra que as reações da Figura 44 que predominam são aquelas que inserem grupamentos polares na cadeia polimérica (a, b) e conseqüentemente aumentam a absorção de PBS quando comparada a esponja de gelatina/quitosana em ácido adípico sem EDC/NHS (Figura 41).

A maior absorção da esponja Q1G1D(E) torna o uso de ácido adípico para reticular a quitosana e a gelatina promissora quando se deseja esponjas mais absorventes.

Além disso, os resultados obtidos por absorção em PBS mostram a importância da escolha do ácido e da reticulação para a preparação da blenda quando essa for utilizada como material absorvente para absorção de fluidos biológicos ou na taxa de liberação de fármaco, pois o uso de EDC/NHS e o uso de diferentes ácidos afetaram as absorções.

5.6.4 Estudo de citotoxicidade

Conforme já relatado a quitosana e suas modificações têm sido estudadas nas mais variadas áreas, no entanto têm ganhado destaque na área da saúde por ser bicompatível e possuir propriedades de afinidade celular e atividade antimicrobiana.

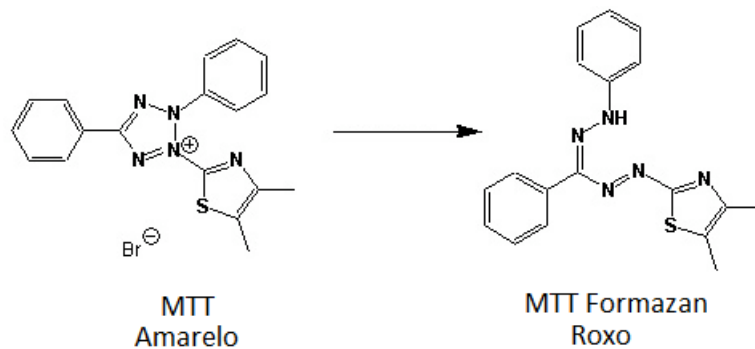
Diante disso, para avaliar o potencial de novas modificações desse polímero é fundamental avaliar a citotoxicidade do material final, assim torna possível avaliar o potencial deste como biomaterial.

Para isso as diferentes esponjas foram submetidas a ensaios de citotoxicidade com MTT, essa técnica é um ensaio quantitativo para determinar a viabilidade celular após a aplicação do extrato do material sobre as células.

Nela a quantificação de células viáveis é possível pois na mitocôndria dessas células ocorre a redução de MTT em cristais de formazam (Figura 45), que

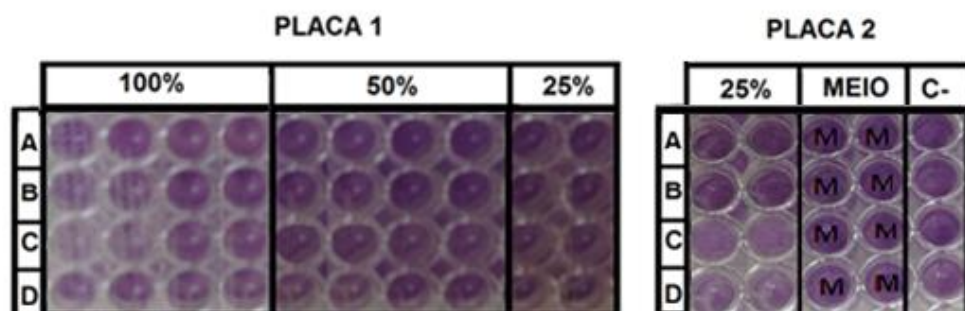
possuem coloração arroxeada. Essa coloração permite então que a porcentagem de células viáveis seja quantificada pela medida de absorbância (MOSMANN, 1983).

Figura 45 - Redução do MTT



As fotografias digitais das placas após ensaios com MTT podem ser observados, respectivamente na Figura 46. Nela as linhas A, B, C e D, representam respectivamente as amostras de Q1G1C, Q1G1D, Q1G1C(E) e Q1G1D(E). As colunas 100%, 50% e 25% representam, respectivamente, os testes para as concentrações de 15; 7,5 e 3,75 mg de extrato mL⁻¹ de meio. A letra M representam os poços onde não foi adicionado extrato e a coluna C⁻ os poços em que se adicionou o controle negativo.

Figura 46 - Placas obtidas após ensaios de MTT



Na figura 46, pode ser observado que todos os poços apresentam cor arroxeada, o que indica que, assim como o controle negativo, os extratos permitiram a redução do MTT à MTT formazan. Esses resultados mostram que em todos os poços há células viáveis.

5. Resultados e Discussão

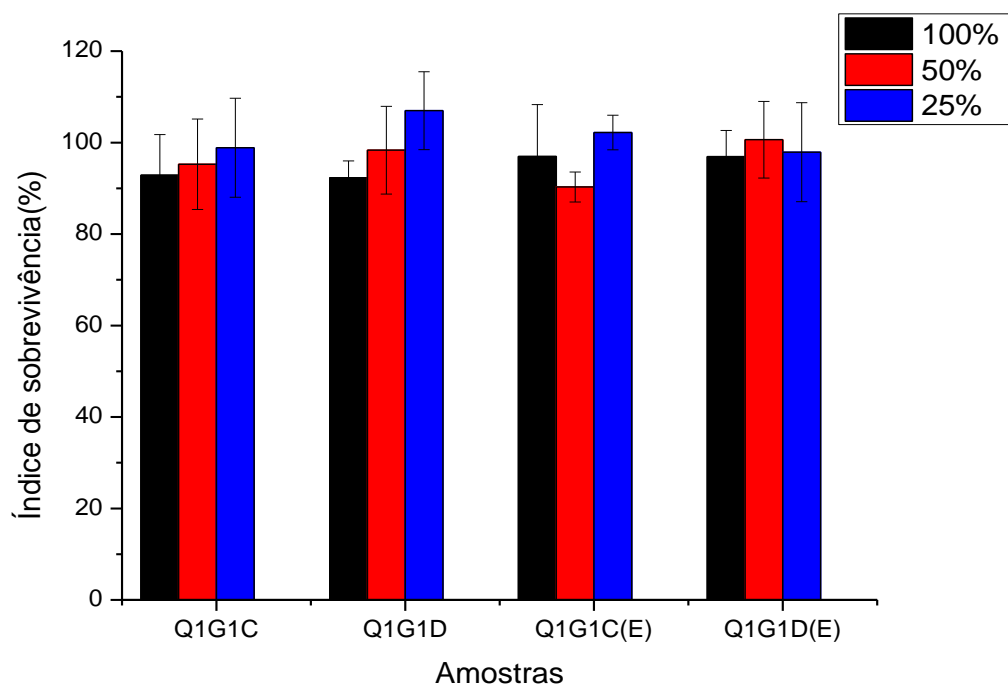
No entanto, para saber a quantidade de células viáveis, é necessário medir a absorbância. Os valores médios obtidos podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores de médios de absorbância após ensaio com MTT

Eponjas neutras	Média das absorbâncias para as diferentes concentrações (mg mL ⁻¹)		
	15	7,5	3,75
Q1G1C	0,660±0,059	0,677±0,067	0,703±0,076
Q1G1D	0,656±0,024	0,699±0,067	0,760±0,064
Q1G1C(E)	0,689±0,078	0,642±0,021	0,727±0,028
Q1G1D(E)	0,689±0,040	0,715±0,060	0,696±0,075

Para o controle negativo o valor obtido foi de 0,711±0,051. Com esse valor e com os valores das absorbâncias para as diferentes preparações, calculou-se, utilizando a equação 9, os índices de sobrevivência celular, os quais podem ser observados na Figura 47.

Figura 47 - Índices de sobrevivência das células VERO para as esponjas neutralizadas, a 100%, 50% e 25% da concentração inicial de 15 mg de esponja/mL de meio



Valores de 100% a 80% representam não citotoxicidade e valores de 60% a 80% baixa citotoxicidade (LONNROTH, 2005).

Na Figura 47 pode ser notado que as amostras mostraram nenhuma citotoxicidade e, portanto, as composições estudadas são promissoras para serem estudados em aplicações na área médica, tais como material curativo, implantes, liberação controlada de fármacos, etc.

6 CONCLUSÃO

Foi possível a obtenção de géis e esponjas de quitosana e quitosana/gelatina usando o ácido adípico como alternativa ao ácido acético.

Os géis obtidos eram homogêneos e incolores para todas as composições. Ao estudá-los por reologia foi possível observar:

- A influência da concentração de quitosana, pois o aumento da concentração de quitosana tornou os géis mais elásticos e mais viscosos.
- O efeito da substituição do ácido acético pelo ácido adípico, pois os géis com 2% de quitosana e com quitosana/gelatina sem EDC/NHS se mostraram mais elásticos e viscosos em ácido adípico do que em acético.
- O efeito do uso de gelatina, que tornou os géis mais elásticos e viscosos.
- O efeito da reticulação com EDC/NHS que levou os géis a apresentarem um comportamento mais elástico e viscoso para todas as composições estudadas.

Quanto às esponjas obteve-se esponjas brancas e macias ao toque que tiveram sua morfologia alterada após o uso de EDC/NHS, pois a reticulação promoveu a formação de poros interconectados com tamanhos médios de $125,1 \pm 29,2 \mu\text{m}$ e $106,0 \pm 31,3 \mu\text{m}$, respectivamente para os ácidos acético e adípico.

Na absorção em PBS, a reticulação e a escolha do ácido alteraram a absorção nas esponjas, pois o uso de ácido acético aumentou a absorção para as esponjas não reticuladas, enquanto que para as esponjas reticuladas o uso de ácido adípico é que aumentou a absorção.

Nos ensaios de citotoxicidade todas as composições mostraram potencial como biomaterial por serem não citotóxicas.

BIBLIOGRAFIA

ALVES, Keila dos Santos. **Alquilação redutiva da quitosana a partir do glutaraldeído e 3-amino-1-propanol**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química; Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 1155-1160, 2010.

ARGUELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F.M.; PENICHE, C.; HIGUERA-CIAPARA, I. Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, p. 429-440, 1998.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 199 p.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BINDU, H. T. V. L; VIDYAVATHI, M.; KAVITHA, K.; SASTRY, T. P.; KUMAR, S. R. V. Preparation and evaluation of ciprofloxacin loaded chitosan-gelatin composite films for wound healing activity. **International Journal of Drug Delivery** 2, p. 173-182, 2010.

BODNAR, M.; MINKO, T.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2521-2527, 2005.

BODNAR, M.; MINKO, T.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Fluorescent nanoparticles based on chitosan. **NSTI-Nanotech**, v. 2, p. 279-282, 2007.

BRETAS, R.E.S; D'ÁVILA, M.A. **Reologia de polímeros fundidos**. São Carlos: Editora da UFSCar, 2000. 196 p.

BRODAZCZEWSHA, K.; DOLIGALSKA, M. Differential effects of low and high molecular weight chitosan administered intraperitoneally to mice infected with heligmosomoides polygyrus. **Progress on Chemistry and Application of Chitin**, v. 18, p. 77-84, 2013.

BUTLER, J. N. **Ionic equilibrium: solubility and pH calculations**. New York: Wiley, 1998. 561 p.

CAI, M.; GONG, J.; CAO, J.; CHEN, Y.; LUO, X. *In situ* chemically crosslinked chitosan membrane by adipic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, p. 3308–3314, 2013.

CALERO, N.; MUNOZ, J.; RAMIREZ, P.; GUERRERO, A. Flow behaviour, linear viscoelasticity and surface properties of chitosan aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 659-666, 2010.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E., ABREU, F., CARDOSO, M. V.; BATTISTI, M.V.; SIM, P. C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARDOSO, Márcia Barreto. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência**. 2008. 102 f. Tese (Doutorado em Físico-Química).- , Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CHEN, P.H.; KUO, T.Y.; LIU, F.H.; HWANG, Y.H.; HO, M. H.; WANG, D. M.; LAI, J. Y.; HSIEH, H. J. Use of dicarboxylic acids to improve and diversify the material properties of porous chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9015–9021, 2008.

CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

CHO, J.; HEUZEY, M.C.; BEGIN, A.; CARREAU, P.J. Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 500-515, 2006.

DENARI, Nizia Sophia Mayer. **Biomateriais de quitosana/amido e quitosana/gelatina em L-ácido láctico**. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

DENG, M. C; HE, L.Z.; ZHAO, M.; YANG, D.; LIU, Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 583–589, 2007.

DESBRIÉRES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996.

DIOP, Jeanette Mirian. **Preparation and Characterization of Gelatin and Chitosan Films**. 2009. 27f. Dissertação (Mestre em Química) - Department of Chemical and Biological Engineering. Tufts University, Boston, 2009.

EL-HEFIAN, E. A.; NASEF, M. M.; YAHAYA, A. H.; KHAN, R. A. Preparation and characterization of chitosan/agar blends: rheological and thermal studies. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, p. 130-136, 2010.

FIORAMONTE, M.; BELARMINO, M.K.L.; SOARES, A.I.; JÚNIOR, G.P.C.; MACHADO, C.M.B.; LIMA, N.B. Interpretação dos efeitos da ligação de hidrogênio no espectro de infravermelho dos complexos envolvendo compostos sulfóxidos e ácidos carboxílicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 54., 2014, Natal. **Livro de resumos...** Natal: Química e Sociedade - Motores da Sustentabilidade, 2014. Ref. 4841.

FÓRUN PIR2 FÍSICA E MATEMÁTICA. **Força elástica e a lei de hooke (sistemas massa-mola)**. 2015. Disponível em: <<http://pir2.forumeiros.com/h69-molas-pag-1>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. 732 p.

GAVHANE, Y.; ATUL, G. ADHIKRAO, Y. Chitosan and its applications: a review of literature. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 312-331, 2013.

GHOSH, A.; ALI, A. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 1196-1204, 2012.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GUNNARSSON, Stefán Bragi. **Effect of chitosan on thermal stability of horseradish peroxidase**. 2011. 81f. Thesis (Magister Scientiarum degree in biochemistry) - Faculty of Physical Sciences, University of Iceland, Reykjavik, 2011.

HA, T. L. B.; QUAN, T. M.; VU, D. N.; SI, D. M. Naturally derived biomaterials: preparation and application. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**, p. 247-274, 2013.

HORN, Marília Marta. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 2012. 146 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatina-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1490-1495, 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods**. Genebra, 1992. 34 p.

KHOR, E. **Chitin: fulfilling a biomaterials promise**. Amsterdam: Elsevier, 2001. 136 p.

KIM, J. C.; LEE, H. Y.; KIM, M. H.; LEE H.; KANG, H.; KIM, S. M. Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 52-56, 2006.

KIM, S.; NIMNI, M. E.; YANG, Z.; HAN, B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 72, n. 2, p. 442-450, 2005.

KOŁODZIEJSKA, I.; PIOTROWSKA, B.; BULGE, M.; TYLINGO, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide on the solubility of fish gelatin-chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 404-409, 2006.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S. SHIMODA, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science: Part A Polymer Chemistry**, v. 31, p. 485-491, 1993.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEFFLER, C. C.; MULLER, B. W. Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 229-237, 2000.

LENARDÃO E. J. "Green chemistry" - os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p.123-129, 2003.

LI-FEN, L.; CHEN-FU, L.; JONG-LIANG, L. FTIR study of adsorption and photoreactions of acetic acid on TiO₂. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, p. 3831-3837, 2001.

LIMA, I. S.; RIBEIRO, E. S.; AIROLDI, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 501-506, 2006.

LIMA, Camila Renata Machado de. **Estudo de adsorção de tetraciclina e cromoglicano em partículas de quitosana**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

LIU, L.; TANG, X.; WANG, Y.; GUO, S. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1–2, p. 6-15, 2011.

LONNROTH, E.C. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. **International Journal of Occupational Safety and Ergonomics**, v. 11, p. 131-139, 2005.

LOPEZ, Mariana Campos da Paz. **Conjunção de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer**. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MARTINS, T.; JUNIOR, E.S.C. Análise comparativa entre blendas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e quitosana reticuladas com ácido adípico. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 7, 2012, Natal. **Livro de Resumos...** Rio Grande do Norte: Sociedade Latina Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos, 2012. ref. 01-071.

MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. M. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal and swelling properties of starch-chitosan blends films. **Biopolymers**, v. 82, p. 176-187, 2006

METHACANON, P.; PRASITSLIP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 119-123, 2003.

MI, F.L.; KUAN, C.Y.; SHYU, S.S.; LEE, S.T.; CHANG, S.F. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 389-396, 2000.

MITRA, T.; SAILAKSHMI, G.; GNANAMANI, A.; MANDAL, A. B. Adipic acid interaction enhances the mechanical and thermal stability of natural polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. 490-500, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, J.M.; FIGUEIREDO, M.M.; GIL, M.H. Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3823–3829, 2007.

NANDAGIRI, V. K.; GENTILE, P.; CHIORO, V.; TONDA-TURO, C.; MATSIKO, A. Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan-gelatin scaffolds: influence on physical properties and cell behavior. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, p. 1318-1327, 2011.

- NIAMSA, N.; BAIMARK, Y. Preparation and characterization of highly flexible chitosan films for use as food packaging. **American Journal of Food Technology**, v. 4, p. 162-169, 2009.
- PASQUI, D.; CAGNA, M.; BARBUCCI, R. Polysaccharide-based hydrogels: the key role of water in affecting mechanical properties. **Polymers**, v. 4, p. 1517-1534, 2012.
- PAJAK, A. W. Chitosan dichoroacetic acid salts. **Progress on Chemistry and Application of Chitin**, v. 15, p. 55-62, 2010.
- PRASHANTH, K.V. H.; THARANATHAN, R. N. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.117-131, 2007.
- PULIERI, E.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G.; VOZZI, G.; AHLUWALIA, A.; DOMENICI, C.; VOZZI, F.; GIUSTI, P. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **Journal Biomedical Materials Research A**, v. 86, p. 311-322, 2008.
- RAHMAN, M. M.; PERVEZ, S.; NESSA, B.; KHAN, M. A. Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering. **Polymer International**, v. 62, p. 79-86, 2013.
- RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31 p. 603–632, 2006
- RODRIGUES, J. A. R. Ligações hidrogênio fortes em ácidos dicarboxílico e diaminas aromáticas. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 812-817, 2000.
- ROHR, Tiago Gusmão. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2007.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2009. 888 p.
- SAILAKSHMI, G.; MITRA, T.; CHATTERJEE, S.; GNANAMANI, A. Engineering chitosan using, α - dicarboxylic acids – an approach to improve the mechanical strength and thermal stability. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, p. 151-164, 2013.
- SANTOS, Carla Danielle Silva. **Hidrogel mineralizado de quitosana/gelatina para uso como matriz polimérica para sistema de liberação de fármaco**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SHEPHERD, R.; RREADER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 535-542, 1997.

SLIDEPLAYER. **Viscoelasticidade**. 2015. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/374857/>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

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

STAROSZCZYK, H.; SZTUKA, K.; WOLSKA, J.; PAJA, A.W.; KOŁODZIEJSKA, I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 707-712, 2014.

SUKKUNTA, Suppajit. **Physical and mechanical properties of chitosan-gelatin based film**. 2005. 107 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Salaya, 2005.

TSAO, C. T.; CHANG, C. H.; LI, Y.D.; WU, M. F.; LIN, C. P.; HAN, J. L.; CHEN, S. H.; HSIEH, K. H. Development of chitosan/ dicarboxylic acid hydrogels as wound dressing materials. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, p.519, 2011.

VENUGOPAL, V. **Marine polysaccharides: Food applications**. Boca Raton: CRC, 2011.375 f.

WANG, X. H.; LI, D. P.; WANG, W. J.; FENG, Q. L.; CUI, F. Z.; XU, Y. X.; SONG, X. H.; WERF, M. V. D. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials**, v. 24, p. 3213-3220, 2003.

WANG, Y.; QIU, D.; COSGROVE, T.; DENBOWN, M. L. A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of chitosan and gelatina. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.70, p. 254–258, 2009.

WORK, W. J.; HORIE, K.; HESS, M.; STEPTO, R. F. T. Definitions of terms related to polymer blends, composites and multiphase polymeric materials. **Pure of Applied Chemistry**, v. 76, p. 1985-2007, 2004.

XING, Q; YATES, K.; VOGT, C.; QIAN, Z.; FROST, M.C.; ZHAO, F. Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4706, 2014.

YANG, F. C.; PETERS, R. D.; DIES, H.; RHEINSTADTER, M. C. Hierarchical, self-similar structure in native squid pen. **Soft Matter**, v.10, p. 5541,2014.

YIM, Y.; YE, F.; CUI, J.; ZHANG, F.; LI, X.; YAO, K. Preparation and characterization of macroporous chitosan– gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 67, p. 844-855, 2003.

YUAN, S. X.; WEI, T. T. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19, p. 467- 479, 2004.

ZAGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, p. 204-226, 2015.