



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE
BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

**EFEITOS DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA EM MEMBRANAS DE
QUITOSANA/COLÁGENO PARA POTENCIAL USO COMO
BIOMATERIAL.**

**SUMÉ - PB
2018**

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

**EFEITOS DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA EM MEMBRANAS DE
QUITOSANA/COLÁGENO PARA POTENCIAL USO COMO
BIOMATERIAL.**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega.

Coorientador: Professor Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa.

**SUMÉ - PB
2018**

S729e Souza, Felipe Ravelly Alves de.

Efeitos da reticulação com genipinas em membranas de quitosana/colágeno para potencial uso como biomaterial. / Felipe Ravelly Alves de. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

72 f.

Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Quitosana/colágeno. 2. Genipina. 3. Reticulação. 4. Biomaterial. 5. Biotecnologia I. Título.

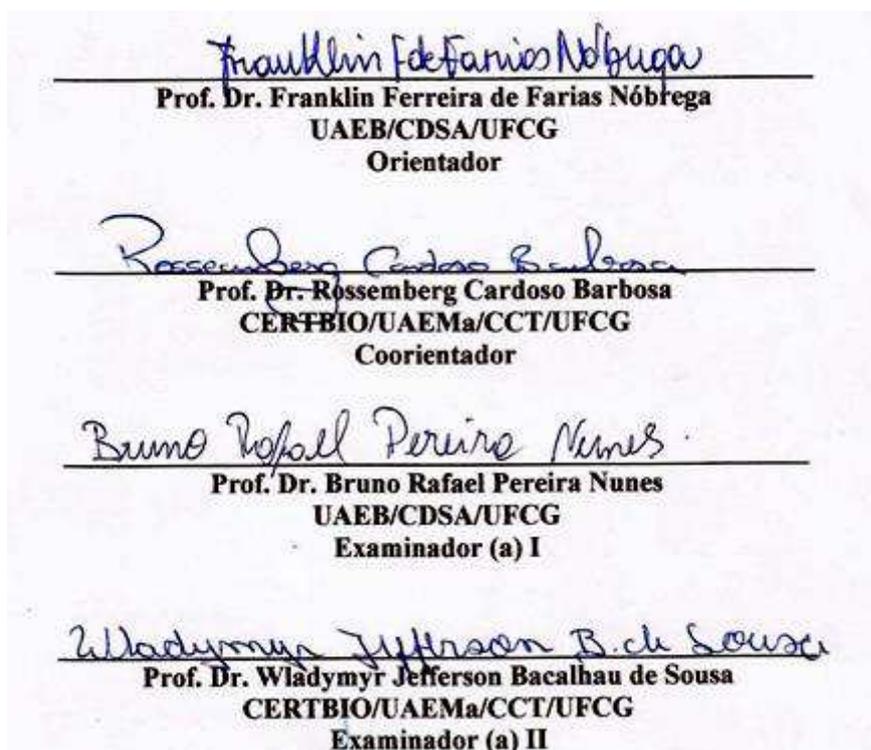
CDU: 60(043.1)

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

EFEITOS DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA EM MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO PARA POTENCIAL USO COMO BIOMATERIAL.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Aprovado em 14 de março de 2018

SUMÉ - PB

A minha Mãe, Maria Eliete Alves Furtado de Souza, por todo o seu amor, carinho e apoio ao longo dessa jornada.

Ao meu Pai, *in memoriam*, José Ronaldo Pereira de Souza e ao seu grande sonho: “ver seu filho formado”.

Dedico-lhes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por sempre me mostrar o caminho certo.

A minha Mãe, Maria Eliete Alves Furtado de Souza, pois sem o seu apoio e carinho nada disso seria realidade.

A minha vó, Maria Pereira de Souza, por todo seu amor e incentivo.

A minha amiga e confidente, Leilane Mariz, que por mais da distância física, sempre se manteve presente em todos os momentos da minha vida.

A todos os amigos e amigas que a Universidade Federal de Campina Grande me possibilitou de conhecer e que muito contribuíram ao longo dessa caminhada acadêmica, em especial à Elder, Darlyson, Canígia, Catarina, Caio, Laura, Jessica D, Jessica L, Mônica, Laedson Mateus e Jefferson.

Ao meu Orientador, Franklin Ferreira de Farias Nóbrega; Coorientador, Rossemberg Cardoso Barbosa; e a Alecsandra Ferreira Tomaz, por todo apoio, paciência e contribuições a este trabalho.

A toda a equipe do CERTBIO, em especial aos membros da sala dos pesquisadores, pela oportunidade e o carinho com que me acolheram.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desse sonho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

O desenvolvimento de biomateriais poliméricos biodegradáveis com enfoque na medicina regenerativa para o tratamento de feridas, lesões da pele ou liberação controlada de fármaco tem demonstrado potencial promissor devido às características específicas desses polímeros. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da reticulação com genipina em membranas de quitosana/colágeno para potencial uso como biomaterial. Para isso, o colágeno foi extraído da membrana da casca do ovo e as membranas densas de quitosana e quitosana/colágeno foram confeccionadas pelo método de evaporação do solvente. Adotou-se duas vias de reticulação por imersão em solução de genipina: a primeira utilizando uma solução alcoólica de genipina à 0,25% (G1) e a segunda com o extrato alcoólico da polpa do Jenipapo (G2). Para neutralização das membranas foi utilizada uma solução de hidróxido de amônio a 1% v/v. Todas as membranas foram submetidas a análises química, física e biológica por meio de técnicas como a Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Óptica (MO), Termogravimetria (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Ensaio mecânicos de tração, Molhabilidade, Intumescimento, Biodegradação e Citotoxicidade. Na extração do colágeno, a metodologia adotada proporcionou um rendimento compatível com o descrito na literatura. As membranas confeccionadas apresentaram uma textura adequada e alteração da coloração após a reticulação. Na análise do FTIR foi possível constatar que ocorreu interação entre os materiais. Na microscopia óptica notou-se diferenças na homogeneidade, transparência e textura entre as membranas de quitosana, quitosana/colágeno e membranas reticuladas, verificando que a reticulação alterou parâmetros como espessura, rugosidade e ondulação. Através da TGA e DSC, pode-se constatar que a reticulação com G2 aumentou a resistência à temperatura das membranas de quitosana/colágeno. No ensaio de tração, verificou-se que a reticulação com genipina, assim como a presença de colágeno nas membranas proporcionaram alterações em parâmetros como resistência à tensão e taxa de deformação. Todas as membranas apresentaram características hidrofílicas, na qual a reticulação com genipina favoreceu o aumento do Grau de Intumescimento. Durante os ensaios de biodegradação foi possível observar que a presença do colágeno reduziu a velocidade de degradação do biomaterial, enquanto a reticulação com genipina acelerou. Por outro lado, o colágeno, assim como a reticulação, aumentaram a biocompatibilidade das membranas. Baseando-se nisso, pode-se concluir que a reticulação com o extrato alcoólico do jenipapo foi mais eficiente que a reticulação com genipina a 0,25%, pois conferiu melhores propriedades às membranas para potencial utilização como biomateriais na medicina regenerativa, além de ser uma alternativa com custo bastante inferior ao da utilização de genipina pura.

Palavras-chave: Quitosana. Colágeno. Genipina. Reticulação. Biomaterial.

ABSTRACT

The development of biodegradable polymeric biomaterials with a focus on regenerative medicine for the treatment of wounds, skin lesions or controlled drug release has shown promising potential due to its specific characteristics. Based on this, the objective of this work is to evaluate the effects of Genipin-crosslinked Chitosan/Collagen membranes and their potential use as biomaterials. To that end, the collagen was extracted from the eggshell membrane and the dense membranes of chitosan and chitosan/collagen were produced by the solvent evaporation method. Two types of crosslinking by immersion in genipin solution were adopted: first in 0.25% Genipin Alcoholic Solution (G1), then Alcoholic Extract of the Jenipapo Pulp (G2). A 1% (v/v) solution of Ammonium Hydroxide was used to neutralize the membranes. All membranes were submitted to chemical, physical and biological analysis by techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Optical Microscopy (OM), Thermogravimetry (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), mechanical tests of traction, wettability, swelling, biodegradation and cytotoxicity tests. During the extraction process of collagen, the methodology adopted yielded a result as recorded in the literature. The membranes presented a suitable texture and color alteration after the crosslinking process. In the FTIR analysis it was possible to identify the interaction occurred between the materials. Optical microscopy pointed differences in homogeneity, transparency and texture between chitosan, chitosan/collagen membranes and reticulated membranes, showing that the crosslinking process was responsible for altering the thickness, roughness and ripple parameters. Through TGA and DSC, it can be affirmed that G2 crosslinking increased the thermal resistance of chitosan/collagen membranes. The tension test revealed that the Genipin-crosslinking presented alterations in some parameters, such as tensile strength and strain rate. All membranes showed hydrophilic characteristics, and the Genipin-crosslinking process helped the swelling degree to increase. During the biodegradation tests it was possible to observe that the presence of collagen reduced the rate of degradation of the biomaterial, while the Genipin-crosslinking accelerated it. On the other hand, both collagen and crosslinking increased the biocompatibility of membranes. Based on this, it can be concluded that the crosslinking in Alcoholic Extract of the Jenipapo Pulp was more efficient, since it conferred better properties to the membranes, as well as a much lower cost alternative to the Genipin-crosslinking membranes production.

Keywords: Chitosan. Collagen. Genipin. Crosslinking. Biomaterial.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento na extração do Colágeno a partir da membrana da casca do ovo.....	35
Tabela 2 - Bandas de absorção nos espectros do FTIR do colágeno extraído da membrana da casca do ovo	36
Tabela 3 - Bandas características no FTIR para o colágeno puro	36
Tabela 4 - Dimensões das Membranas de Quitosana e Quitosana/colágeno	38
Tabela 5 - Grupos característicos da genipina por FTIR.	40
Tabela 6 - Bandas de absorção nos espectros do FTIR das membranas MQ1, MQC1	43
Tabela 7 - Parâmetros Morfológicos das Membranas	49
Tabela 8 - Dados termogravimétricos da MQ1, MQ2 e MQ3.	51
Tabela 9 - Dados termogravimétricos da MQC1, MQC2 e MQC3.....	52
Tabela 10 - Dados referentes ao termograma das Membranas de Quitosana	54
Tabela 11 - Dados referentes ao termograma das Membranas de Quitosana/Colágeno.....	55
Tabela 12 - Valores médios das propriedades mecânicas das membrans de quitosana e quitosana/colágeno para os dois ensaios	56
Tabela 13 - Ângulos de contato das membranas (MQ1, MQ2, MQ3, MQC1, MQC2 e MQC3)	57
Tabela 14 - Valores do Intumescimento para as Membranas de Quitosana	59
Tabela 15 - Valores do Intumescimento para as Membranas de Quitosana/Colágeno.....	60
Tabela 16 - Biodegradação das Membranas de Quitosana e Quitosana/colágeno	61
Tabela 17 - Viabilidade Celular das membrans de quitosna e quitosana/colágeno.....	62

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
UV	Ultravioleta
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
GD	Grau de desacetilação
PM	Peso Molecular
TI	Teor de Impureza
G0	Sem reticulação - Controle
G1	Solução reticulante 1 - genipina [0,25%]
G2	Solução reticulante 2 - extrato alcoólico do Jenipapo
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
MO	Microscopia Óptica
TGA	Termogravimetria
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
MQ	Membranas de Quitosana
MQ1	Membranas de Quitosana submetidas a condição G0
MQ2	Membranas de Quitosana submetidas a condição G1
MQ3	Membranas de Quitosana submetidas a condição G2
MQC	Membranas de Quitosana/Colágeno
MQC1	Membranas de Quitosana/Colágeno submetidas a condição G0
MQC2	Membranas de Quitosana/Colágeno submetidas a condição G1
MQC3	Membranas de Quitosana/Colágeno submetidas a condição G2
PBS	Tampão fosfato-salino
Eq.	Equação
Ra	Rugosidade Média
Rp	Pico da Rugosidade
Wa	Ondulação média
Wy	Ondulação máxima
T	Temperatura (°C)
P.M	Perda de Massa (%)

LISTA DE SIMBOLOS

$C_{11}H_{14}O_5$	Genipina
CH_3CO_2H	Ácido acético
NaOH	Hidróxido de Sódio
$C_3H_6O_3$	Ácido Lático
m/v	Massa/Volume
m/m	Massa/Massa
RC	Rendimento da extração do colágeno
M_c	Massa do colágeno
M_o	Massa da membrana da casca do ovo
GI	Grau de intumescimento
M_t	Peso da amostra no tempo t
M_i	Peso inicial da amostra
M	Peso final
B	Taxa de biodegradação
δ	Modo vibracional de dobramento
v	Modo vibracional de estiramento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 A BIOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO COM BIOMATERIAIS	16
3.2 BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS	17
3.3 OS BIOMATERIAIS E A ENGENHARIA DE TECIDOS.....	19
3.4 QUITOSANA	20
3.5 COLÁGENO	21
3.6 LIGAÇÕES DE ENTRECRUZAMENTO	22
3.6.1 O Potencial uso dos agentes reticulantes	22
3.6.2 A genipina	22
3.6.3 A reticulação	23
4 METODOLOGIA	26
4.1 EXTRAÇÃO DE COLÁGENO	26
4.1.1 Materiais	26
4.1.2 Métodos	26
4.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO	28
4.2.1 Materiais	28
4.2.2 Métodos	28
4.3 RETICULAÇÃO	29
4.3.1 Materiais	29
4.3.2 Métodos	29
4.4 CARACTERIZAÇÕES	31
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	31
4.4.2 Microscopia Óptica (MO)	31
4.4.3 Termogravimetria (TGA)	31
4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	32
4.4.5 Tração	32
4.4.6 Molhabilidade	32

4.4.7 Intumescimento	33
4.4.8 Biodegradação	33
4.4.9 Citotoxicidade	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 COLÁGENO	35
5.2 MEMBRANAS QUITOSANA/COLÁGENO	37
5.3 RETICULAÇÃO	39
5.4 CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS	42
5.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier	42
5.4.2 Microscopia Óptica	45
5.4.3 Termogravimetria	50
5.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial	53
5.4.5 Tração	55
5.4.6 Molhabilidade	56
5.4.7 Intumescimento	58
5.4.8 Biodegradação	60
5.4.9 Citotoxicidade	61
6 CONCLUSÕES	64
7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia é uma área multidisciplinar que visa o desenvolvimento de produtos ou processos biológicos com a ajuda da ciência e da tecnologia, podendo ser definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (CONVENÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 1992). Dessa forma, o estudo dos biomateriais (dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos) surge como uma das inúmeras ramificações dessa ciência, apresentando potencial promissor devido às suas inúmeras contribuições para a evolução da medicina, sendo que os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados devido às suas vantagens no que diz respeito a maleabilidade, custo, propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (PIRES, 2015; LANDUCI, 2016).

Entre as diversas aplicações dos biopolímeros, a medicina regenerativa vem ganhando enfoque especial nas pesquisas, principalmente quanto ao tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos, visando desenvolver materiais alternativos com baixa toxicidade e que apresentem eficiência no reparo de tecidos. Sendo assim, a quitosana e o colágeno surgem como polímeros promissores, pois são capazes de interagir favoravelmente com as células (CESCONETO, 2009; RATNER et al., 2013; MOGOSANU, 2014; BUENO et al., 2015; PIRES, 2015).

Nesse sentido, a quitosana tem sido utilizada para a produção de curativos direcionados ao tratamento de ferimentos da pele, contribuindo com o processo de cicatrização. Entretanto, algumas propriedades desse polímero não são adequadas o suficiente para competir com alguns polímeros já disponíveis no mercado, sugerindo a busca por alternativas que contornem este problema, como a utilização da quitosana juntamente com o colágeno, unidos por meio de ligações de entrecruzamento (reticulação) (LARANJEIRA, 2009; OLIVEIRA, 2012; MACÊDO, 2014).

Quando se aborda a reticulação, estudos demonstraram potencial para utilização da genipina - biomolécula extraída do Jenipapo (*Genipa americana L.*), como agente reticulante, devido a sua biocompatibilidade quando comparada a outros agentes de entrecruzamento, como o glutaraldeído. Além disso, a reticulação com genipina fortalece a estrutura do biomaterial por meio da formação de ligações covalentes intermoleculares permanentes,

adicionando ou adequando propriedades que são de interesse para a engenharia de tecidos (CHIONO, 2008; MANSNUR, 2008; BATISTA, 2015).

Entretanto, do ponto de vista financeiro, a genipina (98%) é comercializada entre valores que variam de 420,00 R\$ por 50mg à 2.984,00 R\$ por 125 mg, devido ao custo demasiadamente elevado para a extração e purificação dessa biomolécula. Sendo assim, a sua utilização como agente reticulante, embora apresente um potencial promissor no que diz respeito a produção de biomateriais com propriedades desejadas para utilização na medicina regenerativa, o valor excessivo para a obtenção dessa biomolécula acarretaria em um custo elevado dos biomateriais cuja rota de reticulação fosse proporcionada pela genipina. Diante do exposto, este trabalho propôs a utilização de uma rota alternativa de reticulação para obtenção de biomateriais de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da reticulação com genipina em membranas de quitosana/colágeno para potencial aplicação como biomaterial

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair colágeno a partir da membrana da casca do ovo;
- Produzir membranas densas a base de quitosana e quitosana/colágeno;
- Promover a reticulação das membranas com genipina nas diferentes soluções;
- Realizar ensaios de caracterização química, física e biológica para constatação dos efeitos da reticulação;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A BIOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO COM BIOMATERIAIS

A palavra "biotecnologia" foi literalmente inventada na esfera financeira, em Wall Street, para expressar um conjunto de técnicas e ferramentas que podem ser usadas para fabricar produtos de ponta e experimentos científicos avançados em áreas ligadas às indústrias farmacêutica, química e do agronegócio (FONSECA et al., 2009 apud FONSECA, 2010). Ademais, em um sentido mais amplo, a biotecnologia pode ser descrita como um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico, possuindo um potencial de aplicação moderna com grande impacto para o futuro, que vai desde a proteômica, genômica, farmacogenômica, biomateriais, bioengenharia, engenharia genética, alimentos geneticamente modificados até a biologia sintética (CONVENÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 1992; KRATTIGER, 2002; SANTANA et al., 2012).

A utilização e o estudo dos biomateriais apresentam ultimamente um forte crescimento, devido a sua contribuição para a evolução da medicina e na melhoria de vida dos que necessitam dessa tecnologia. Com mais de 60 anos de existência, os biomateriais podem ser definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados (PIRES, 2015; LANDUCI, 2016).

Os biomateriais abrangem classes distintas de materiais, na qual podem ser de origem cerâmica, metálica, polimérica ou compósita e são classificados de acordo com a compatibilidade que apresentam com os tecidos adjacentes: I) Biotolerantes, quando há a formação de uma camada de tecido fibroso que os isola dos tecidos adjacentes; II) bioinertes, quando provocam uma resposta biológica sútil, podendo induzir a formação de uma capsula de tecido fibroso; III) bioreabsorvíveis, quando é degradado pelo próprio organismo e substituído pelo tecido; e IV) bioativos, que ligam-se quimicamente ao tecido, possibilitando o crescimento do tecido sobre sua superfície (GOIA, 2008 & RATNER, 1996 apud BOMFIM, 2014).

Bonfim, (2014) acrescenta ainda, que além das classificações supracitadas, os biomateriais devem apresentar características fundamentais como: I) biocompatibilidade, pois não deve provocar reações alérgicas ou inflamatórias muito intensas; II) biofuncionalidade, relacionado a capacidade de um dispositivo desempenhar a função para a qual foi projetado e III) bioatividade, característica que permite a formação de tecidos sobre a superfície do biomaterial.

A indústria responsável pela produção dos biomateriais é segmentada com base em dois critérios, o primeiro referente a composição do material (cerâmico, metálico, polimérico ou composto) e o segundo relacionado a sua aplicação, se de uso ortopédico, cardiovascular, odontológico, oftalmológico, cirurgia plástica, engenharia tecidual, tratamento de lesões, distúrbios neurológicos e do sistema nervoso central, além de incluir também dispositivos com outras aplicações, como gastrointestinais e urinárias, ou como sistemas de liberação de drogas e para cirurgia bariátrica. Apesar de atualmente os biomateriais metálicos dominarem o mercado mundial, espera-se no futuro próximo o crescimento acentuado do mercado de biomateriais poliméricos, em decorrência de características mais apropriadas quanto à flexibilidade, elasticidade, inércia biológica, biocompatibilidade e longevidade (PIRES, 2015).

3.2 BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os materiais cerâmicos ou metálicos incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes ou membranas, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (HEATH, 2013 & WONG, 2007 apud PIRES, 2015).

Os polímeros são macromoléculas compostas por unidades de repetição (monômeros), moléculas com massa molecular baixa, ligadas entre si, predominantemente, por ligações covalentes e podem ser classificados em função da sua fusibilidade, estrutura molecular, aplicação, grupos funcionais constituintes, origem, entre outros (PITT et al., 2011; PIRES, 2015).

Ainda segundo Pitt e colaboradores, (2011), a fusibilidade dos polímeros está relacionado com as características termoplásticas - quando o polímero pode ser moldado em mais de um ciclo térmico, pois são constituídos por macromoléculas lineares ou ramificadas, agrupadas entre si por meio de ligações não permanentes e termorrígidas – que podem ser moldados e, depois da primeira moldagem, são submetidos ao processo de “cura”, responsável pela formação de ligações cruzadas permanentes entre as macromoléculas do polímero. Quanto à estrutura molecular dos polímeros, podem ser classificados lineares, ramificados ou ligações cruzadas (que pode ser promovida pela reticulação).

A classificação baseada na aplicação está relacionada a sua forma de utilização, se como commodities, polímeros engenheirados, alta performance ou especiais, que permitem o seu emprego como próteses faciais, tubos traqueais, partes para os rins e fígado, componentes para o coração, odontologia a articulações do quadril e joelhos, fios de sutura, adesivos médicos, selantes para revestimentos, entre outros. Já com relação à sua origem e grupos funcionais, os polímeros podem ser sintéticos – obtidos a partir de reações de polimerização, destacando-se as poliolefinas, poliéteres, poliésteres, poliamidas, entre outros, ou naturais – obtidos por meio de organismos vivos, sendo denominados de biopolímeros, como a celulose, o amido, quitina, quitosana, colágeno, proteínas, péptidos, DNA e RNA (PITT et al., 2011; LANDUCI, 2016).

Para utilização dos materiais poliméricos, diversos critérios devem ser considerados, como as formas que as cadeias podem assumir a disposição das unidades monoméricas, a presença ou não de átomos funcionais, a rigidez estrutural, a polaridade da cadeia, massa molar do polímero e entre outros, pois essas características podem influenciar no seu comportamento, assim como no seu potencial para diferentes finalidades. Nesse sentido, as aplicações dos biopolímeros na medicina regenerativa, por exemplo, incluem diversas opções, entre elas o tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos, ação que está relacionada diretamente às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a matriz extracelular e por induzir e estimular o processo de cicatrização de feridas (RATNER et al., 2013; MOGOSANU, 2014; BUENO et al., 2015).

De acordo com Cesconeto (2009), inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas visando desenvolver materiais alternativos de baixa toxicidade associado à atividade bactericida e elevada eficiência no reparo de tecidos a partir de materiais alternativos como, por exemplo, o PVA, borracha de silicone, poli (L-ácido láctico) e polímeros naturais tais como quitosana, alginato de sódio, gelatina e o colágeno - proteína que pode oferecer uma vantagem adicional

quando utilizado como matéria-prima de um biomaterial, uma vez que podem ser capazes de interagir favoravelmente com as células através de domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular (PIRES, 2015).

3.3 OS BIOMATERIAIS E A ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que visa desenvolver materiais substitutos para os tecidos vivos, que possam restaurar e manter ou melhorar a função de tecidos danificados, destacando-se por permitir o fornecimento de órgãos e/ou tecidos, oferecendo a possibilidade de reparação, desenvolvimento de procedimentos cirúrgicos mais eficientes, e melhorar significativamente a qualidade de vida (HUTMANCHER, 2000).

Um grande número de biopolímeros tem sido estudado como materiais para a engenharia de tecidos. Entre eles estão alguns polímeros sintéticos e os polímeros naturais como o alginato, a gelatina, o colágeno, o amido, a quitosana, entre outros. Os polímeros naturais são de particular interesse, dado que, sendo componentes naturais de seres vivos, apresentam semelhança química e biológica aos tecidos naturais (KIM et al., 2008 apud FERNANDES 2009).

Feridas na pele resultantes de queimaduras e doenças congênitas ou adquiridas são bastante perigosas para os pacientes, particularmente em casos em que a área atingida é extensa, uma vez que o ferimento está sujeito à invasão de bactérias e à perda de fluidos corpóreos. Nessas condições, o recobrimento rápido e efetivo da ferida é essencial para o tratamento da enfermidade. A terapia convencional para este tipo de problema tem sido o transplante de pele. Contudo, devido à dificuldade ou até mesmo impossibilidade em casos em que a área da ferida é muito grande, inexistência de doadores, à rejeição do material implantado, ao tempo necessário para a total cicatrização e aos riscos envolvidos, tem-se buscado alternativas para a proteção e cicatrização de tais ferimentos com materiais que sejam flexíveis, atóxicos e capazes de aderir adequadamente à área afetada, diminuindo a perda de fluidos e eletrólitos, protegendo contra a proliferação de micróbios e promovendo a cicatrização da ferida (WISE, 1996 apud REZENDE et al., 2005).

Nesse sentido, as membranas de quitosana, por exemplo, elaboradas de forma pura ou misturadas com outros polímeros vêm sendo utilizadas com sucesso na produção de curativos

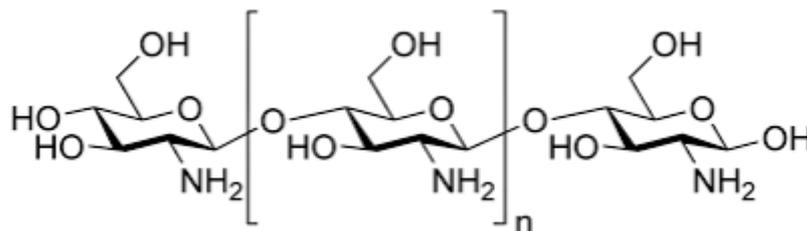
para tratamento de queimadura, como pele artificial, por promover uma cicatrização rápida do tecido (MACÊDO, 2014).

3.4 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero insolúvel em água e meio básico e solúvel em soluções ácidas. Esse polímero é obtido a partir da desacetilação da quitina, principal constituinte dos micélios dos fungos e do exoesqueleto de insetos e crustáceos, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. Apresenta propriedades interessantes para aplicação em engenharia de tecido, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, acelera a recuperação de lesões, reduz o nível do colesterol sanguíneo, estimula os efeitos do sistema imunológico, além de possuir um comportamento bactericida e fungicida, bem como os resultados de sua degradação em organismos vivos que produz as glicosaminas, substâncias não tóxicas (CESCONETO, 2009; OLIVEIRA et al., 2012; BATISTA, 2015).

A quitosana é um polímero composto por cadeias de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por meio de ligações $\beta \rightarrow (1-4)$ dispostas randomicamente (Figura 1). Além disso, a distribuição dos grupos amina ao longo da cadeia determinam muitas de suas propriedades (MUZZARELLI, 1977; KUMAR, et al., 2004 apud BATISTA, 2015).

Figura 1 - Estrutura Química da Quitosana.



(Fonte: BATISTA, 2015).

Segundo Batista (2015), a quitosana se distingue dos outros polissacarídeos em razão da presença do nitrogênio em sua estrutura molecular, que pode se protonado em condições ácidas, portanto, a quitosana é um polímero catiônico ou um polication capaz de formar complexos polieletrólíticos e sais solúveis em água.

Entretanto, algumas das propriedades desse polímero não são adequadas o suficiente para que seja capaz de competir com alguns polímeros sintéticos já disponíveis no mercado, desta forma a utilização da quitosana em conjunto com outros polímeros, como o colágeno, ligados através de ligações de entrecruzamento (reticulação) pode ser uma alternativa para obtenção das propriedades desejadas (LARANJEIRA, 2009; OLIVEIRA, 2012).

3.5 COLÁGENO

O termo colágeno é utilizado para denominar uma família de pelo menos 27 isoformas de proteínas que podem ser encontradas em tecidos conjuntivos ao longo do corpo de várias espécies, como nos ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes e músculos. Esse polímero constitui cerca de 30% de toda a matéria-prima orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais do corpo (PRESTES, 2012).

Sendo constituído por três cadeias polipeptídicas unidas por pontes de hidrogênio e enroladas uma em torno da outra em um arranjo helicoidal na sua porção central e nas extremidades amínica e carboxílica permanecendo na forma globular, o colágeno do tipo I é o mais abundante e o principal componente da matriz extracelular, sendo um substrato natural para as células, orientando e estimulando a formação tecidual. Estas características, juntamente com a biocompatibilidade e estabilidade do colágeno, o tornam atrativo para a confecção de biomateriais de diferentes formas e aplicações, como membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e suporte para o crescimento de células (OLIVEIRA, 2010; PRESTES, 2012; PIRES, 2015).

Nesse sentido, a utilização do colágeno em conjunto com a quitosana, baseando-se em sua boa compatibilidade, pode conferir propriedades desejadas ao biomaterial para utilização na área médica, como aumento da resistência a tração, ação antimicrobiana, adaptação da hidrofiliabilidade do material, promoção da recuperação tecidual através da aceleração do processo de cicatrização, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, propriedades que tornam esses polímeros promissores para a preparação de biomateriais (OLIVEIRA, 2010; SALAZAR, 2015).

3.6 LIGAÇÕES DE ENTRECruzAMENTO

3.6.1 O Potencial uso dos agentes reticulantes

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pela célula vegetal como derivação do metabolismo primário. Não possuem função vital para a planta, mas garantem a sua sobrevivência, reprodução e dispersão por possuírem a capacidade de proteção contra raios UV, atração de polinizadores e dispersores de sementes, ação contra herbívoros, comunicação entre plantas, entre outras (OOTANI et al., 2013; WINK, 2013). Embora os metabólitos secundários encontrem-se presentes em concentrações bem menores nas plantas a maioria deles tais como alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas e ligninas possuem algumas aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, agentes reticulantes, inseticidas etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (COLLIN, 2001; VERPOORTE et al, 2002).

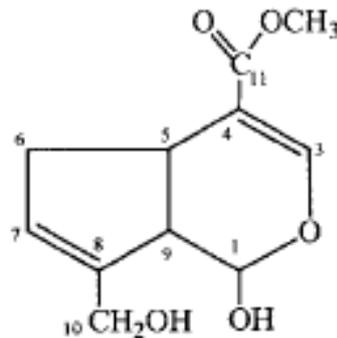
Diversas moléculas já estão sendo estudadas com relação ao seu potencial em agir como agente reticulante, dentre elas podem-se citar o cloreto de cálcio, sulfato de manganês cloreto de alumínio (PACHECO, 2016) e o glutaraldeído (MANSNUR, 2008). No entanto, a reticulação química com o objetivo de obter derivados para aplicações farmacêuticas ou biomédicas tem como limitação o uso de reticulantes químicos que são, em sua grande maioria, tóxicos. Como uma solução para esse problema, há se intensificado os estudos para a descoberta de agentes de entrecruzamento menos citotóxicos e mais biocompatíveis. Surgindo então, como uma biomolécula promissora, a genipina (CHIONO, 2008).

3.6.2 A genipina

A genipina, aglicona do geniposídeo, de fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_5$ (Figura 2), é um composto orgânico, heteropolíclico alifático e monoterpênico, pertencente a classe dos iridóides como um lipídio de prenol (WISHART et al, 2017) e pode ser encontrada tanto nos frutos da *Gardenia jasminoides* (WINOTAPUN et al., 2013), nas folhas e caules da *Tocoyena formosa* (COELHO et al., 2006), nos caules da *Randia spinosa* (HAMERSKI et al., 2003), na *Castilleja tenuiflora* (CARRILLO-OCAMPO et al., 2013), *Bellardia trixago* (VENDITTI et

al., 2013), *Eucommia ulmoides* (LEE et al., 2014), *Lampaya medicinalis* (MORALES et al., 2014), como também no endocarpo (RENHE et al., 2009) e no mesocarpo do jenipapo (*Genipa americana L.*) (RAMOSDE-LA-PEÑA et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura da Genipina.



Fonte: (BUTLER, 2003).

Entre suas funções biológicas, como metabólito secundário, a genipina pode atuar como fonte de nutriente, armazenamento e fonte de energia, além de agir como um estabilizador de membrana. Ademais, há registros de algumas propriedades que interessam a vários setores da indústria como: efeito anti-inflamatório (WISHART et al, 2017), ação analgésica, anti-oxidativa, atividades fibrolíticas (MUZZARELLI, 2009), antidepressivo (CAI et al., 2015), anticarcinogênico (FENG et al., 2011; WANG et al., 2012), surfactante, emulsionante (WISHART et al, 2017), corante natural azul (BENTES et al., 2014), colorímetro de aminoácidos (LEE et al., 2003), constituinte de *stents* cardíacos, veículo para liberação de drogas e reticulante químico, por se tratar de um composto biocompatível, biodegradável e com baixa citotoxicidade (MUZZARELLI, 2009; MUZZARELLI, 2015).

3.6.3 A reticulação

A reticulação das cadeias poliméricas da quitosana, processo também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas. Esse procedimento ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da quitosana (grupos amino e hidroxila) e alguns reagentes reticulantes. Essas reações visam principalmente modificar determinadas propriedades do biopolímero tais

como estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quebração, entre outras (GONSALVES et al., 2011; SAMPAIO et al., 2012; COSTA, 2015; FIAMINGO, 2016).

O processo de reticulação sofre influência tanto de algumas características físico-químicas da quitosana utilizada quanto das condições reacionais adotadas. Dessa forma, GD, massa relativa, temperatura e tempo reacional elevados, em geral, favorecem as reações e conseqüentemente promovem o aumento do grau de reticulação. As reticulações também sofrem influência do tipo e da concentração do agente de entrecruzamento envolvido no processo. Com a elevação do grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (GONSALVES et al., 2011; SAMPAIO et al., 2012; COSTA, 2015; FIAMINGO, 2016).

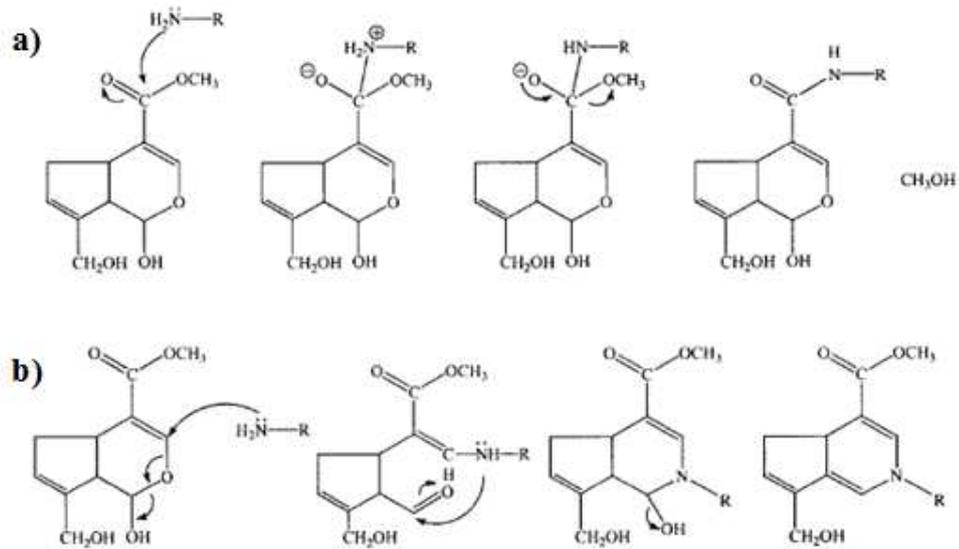
De acordo com Moura (2014), o processo de reticulação pode ocorrer de duas formas: I) Reticulação física, iônica ou reversível, que se dá através de interações de caráter reversível, como ligações iônicas ou interações secundárias; e II) Reticulação química, covalente ou irreversível, quando ocorre a formação de uma rede polimérica, ou seja, quando ocorre reação entre uma unidade estrutural de um polímero e outra unidade estrutural do mesmo, ou de outro polímero. Dessa forma, a Reticulação química se sobressai em relação a reticulação física, uma vez que ao contrário da reticulação reversível, a reticulação irreversível melhora as propriedades mecânicas e reduz a sua dispersão do local, além de outras propriedades como a gelificação, tamanho de poros, velocidade de degradação e dissolução serem mais fáceis de controlar.

A reticulação com genipina é influenciada pelo pH do meio reacional, sendo que, de modo geral, em pHs próximos da neutralidade, a genipina reage com materiais que contém grupos amina, como a quitosana e alguns outros polímeros, acontecendo duas reações principais: na primeira (Figura 3a), acontece um ataque nucleofílico, substituindo o grupo éster da genipina por uma ligação do tipo amida secundária; na segunda (Figura 3b), acontece novamente um ataque nucleofílico, desta vez no átomo de carbono C3, havendo a formação de um grupo aldeído intermediário, seguido da abertura do anel diidropirano, resultando em um novo ataque ao grupo aldeído pela amina formada no primeiro passo da reação (BUTLER, 2003; FIAMINGO, 2016).

Dessa forma, é possível controlar a extensão da reticulação ajustando a concentração do agente reticulante e do tempo reacional, assim como o tipo de reticulação para formação de

segmentos curtos ou longos, a partir do controle do pH das soluções poliméricas durante a reticulação (FIAMINGO, 2016).

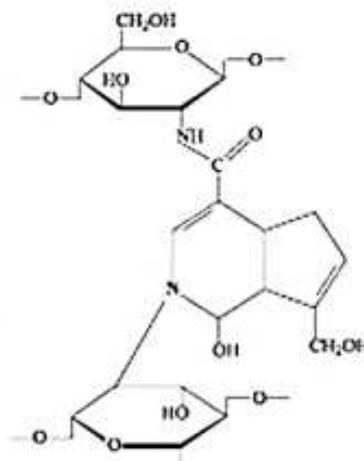
Figura 3 - Ligações de Entrecruzamento envolvendo a Genipina.



Fonte: (BUTLER, 2003).

Em outras palavras, a reticulação da quitosana com genipina (Figura 4) fortalece a estrutura do biomaterial por meio da formação de ligações covalentes intermoleculares permanentes, adicionando ou melhorando propriedades que são de interesse para a área médica, como a estabilidade térmica, taxa de degradação, propriedades mecânicas, hidrofiliabilidade e porosidade, permitindo, por exemplo, a liberação controlada de fármacos (BATISTA, 2015).

Figura 4 - Representação química da quitosana reticulada por genipina.



Fonte: (BATISTA, 2015).

4 METODOLOGIA

Todo o experimento foi conduzido no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), na cidade de Campina Grande – Paraíba.

4.1 EXTRAÇÃO DE COLÁGENO

4.1.1 Materiais

- Membranas da casca do ovo de galinha;
- Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) – Vetec;
- Ácido láctico L –(+)- Lático 85% P.A. (C₃H₆O₃) - NEON;
- Água destilada;

4.1.2 Métodos

Para a obtenção do colágeno realizou-se uma adaptação da metodologia abordada por Carvalho (2017), utilizando o ovo de galinha como matéria prima.

As cascas de ovo, previamente refrigeradas, foram colocadas em água destilada e as membranas foram retiradas manualmente (Figura 5a). Depois de retiradas, foram lavadas com água destilada para remoção dos possíveis resíduos presentes. Posteriormente, as membranas foram adicionadas em uma solução 1,0 mol/L de Hidróxido de Sódio na proporção de 1:50 (m/v) e deixada em repouso, a temperatura ambiente, por 72 horas, obtendo-se então uma solução viscosa (Figura 5b). Essa solução foi neutralizada com ácido láctico, lavada com água destilada, havendo a formação de aglomerados de colágeno (Figura 5c), congelada em um ultra freezer a -86 °C por 24 horas, liofilizada por 48 horas, triturada (Figura 5d) e peneirada em uma peneira de 325 mesh. Por fim, realizou-se um ensaio de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para comprovação da efetividade da extração do colágeno e calculou-se o rendimento através da Equação 1.

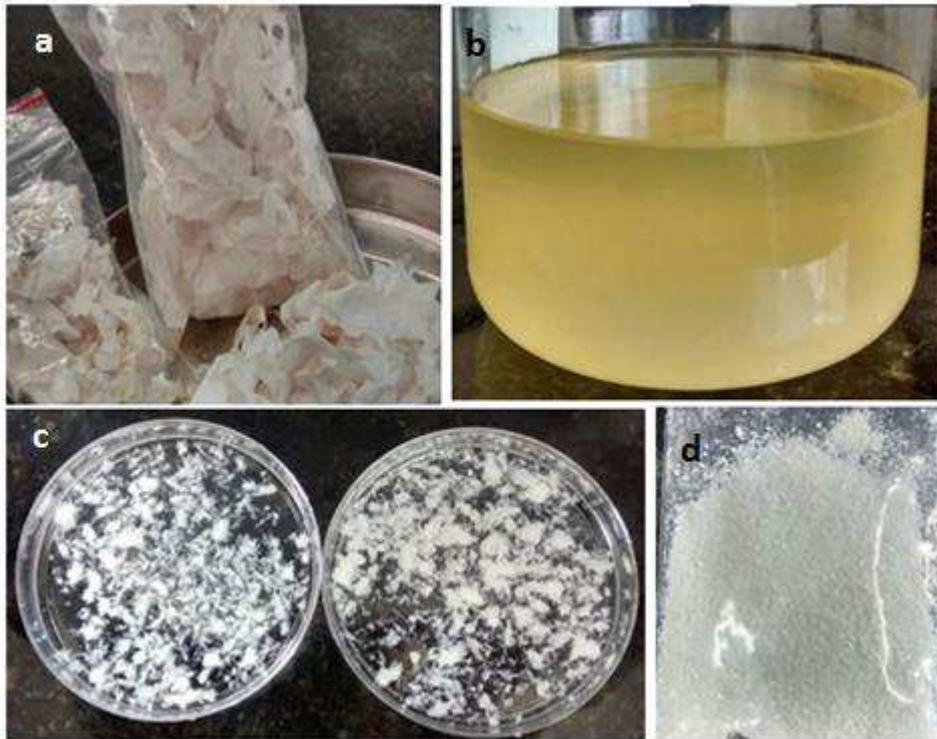
$$RC = \frac{M_c}{M_o} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

M_c = Massa do colágeno

M_o = Massa da membrana da casca do ovo

Figura 5 - a) Membrana extraída da casca do ovo, b) Solução viscosa – Membrana do ovo solubilizada em hidróxido de sódio, c) Aglomerados de colágeno e d) Colágeno em pó



(Fonte: Autor).

4.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO

Foram produzidos dois tipos de membranas: Membranas de Quitosana a 2% (m/v) e Membranas de Quitosana a 2% (m/v) com 5% de Colágeno (m/m), baseando-se na metodologia descrita por TOMAZ (2017), com alguns ajustes e modificações.

4.2.1 Materiais

- Água destilada;
- Ácido Acético Glacial 99,8% P.A. ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) - NEON;
- Quitosana, GD = 83%, PM > 300 kDa, TI < 1% - CERTBIO;
- Hidróxido de Amônio 28 – 30% P.A – NEON;
- Colágeno – Autor;

4.2.2 Métodos

Para a produção das membranas de quitosana (MQ), preparou-se, uma solução com ácido acético a 1%, adicionando 1mL de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ a cada 99mL de água destilada. Em seguida, inseriu-se 2% de quitosana de alto peso molecular na solução (m/v) e deixou sob agitação constante (346 rpm), por 2 horas, a uma temperatura de 40 °C. Posteriormente, retirou-se as bolhas da solução através de um ultrassom da marca Unique (modelo USC – 1400A) e verteu-se 10 mL em placas de petri com diâmetro de 6cm, colocando-as na estufa à 37 °C por um período de 48 horas, para evaporação do solvente. Logo após, as membranas foram neutralizadas com uma solução de hidróxido de amônio a 4% por meio da evaporação da solução neutralizante, a temperatura ambiente, sob a superfície das membranas durante 48 horas. Por fim, foram lavadas com água destilada e colocadas novamente na estufa por 8 horas à 40 °C.

As membranas de quitosana/colágeno (MQC) foram produzidas de maneira semelhante à anterior, acrescentando 5% de colágeno em relação a massa de quitosana (m/m) antes da agitação.

4.3 RETICULAÇÃO

4.3.1 Materiais

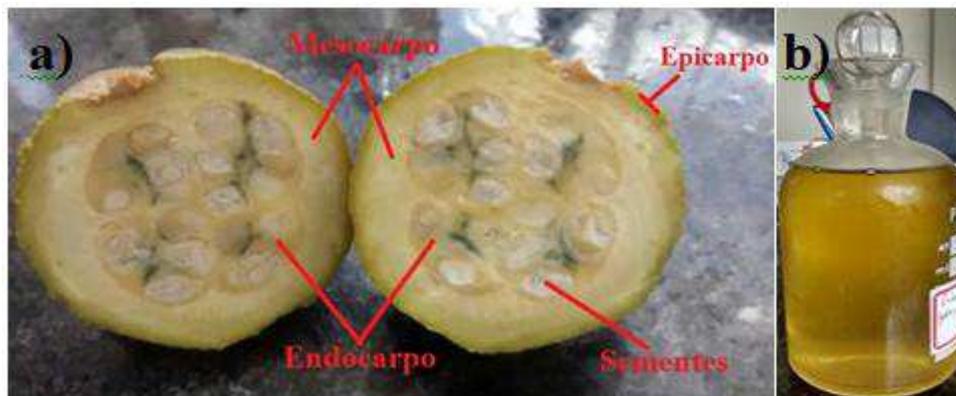
- Genipina 98% - CHALLENGE BIOPRODUCTS CO., LTD.;
- Álcool isopropílico;
- Jenipapo verde, obtido no mercado central da cidade de João Pessoa – PB.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Preparação das soluções reticulantes

Foram preparadas duas soluções reticulantes, na primeira, pesou-se 0,25g de genipina (98%) e diluiu em 100mL de álcool isopropílico, obtendo uma solução alcoólica de genipina na concentração 0,25% (m/v), denominada de G1. A segunda solução (G2), por sua vez, foi obtida armazenando o jenipapo verde em um ultra freezer a -86°C por 7 dias, para formação de cristais de gelo intracelular e proporcionar o rompimento das células. Em seguida, retirou-se a polpa (mesocarpo) do jenipapo (Figura 6a) e triturou. Logo após, acondicionou-se a polpa em álcool isopropílico na proporção de 1:2,5 (m/v) e deixou em repouso por 24 horas à temperatura ambiente. Por fim, filtrou-se a vácuo a solução e armazenou o filtrado (Figura 6b), realizando em seguida uma Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para identificação das ligações presentes na solução.

Figura 6 - a) Camadas do Jenipapo e b) Extrato alcoólico do Jenipapo.



Fonte: Autor.

4.3.2.2 Reações de entrecruzamento

As membranas produzidas foram submetidas a 3 condições: I) sem reticulação ou controle (G0), com o intuito de possuir um controle negativo para validação dos efeitos da reticulação com genipina; II) reticulação com genipina pura 0,25% (G1), na qual as membranas foram submersas na solução por um período de 6 horas (Figura 7a) à temperatura ambiente e com exposição a luz, em seguida, foram lavadas com água destilada e armazenadas em um exaustor para secagem a temperatura ambiente (24 horas); e III) reticulação com extrato alcoólico do jenipapo (G2), cujo procedimento foi semelhante ao anterior, alterando apenas a solução reticulante (Figura 7b).

Figura 7 - Reticulação das membranas. a) Reticulação com genipina pura 0,25% (G1); b) Reticulação com o extrato alcoólico do jenipapo (G2).



Fonte: Autor.

4.4 CARACTERIZAÇÕES

As membranas a base de quitosana (MQ) e quitosana/colágeno (MQC), nas condições G0, G1 e G2, foram caracterizadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR); Microscopia Óptica (MO); Termogravimetria (TGA); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Tração; Molhabilidade; Intumescimento; Biodegradação; e Citotoxicidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado com o intuito de determinar a presença dos grupos funcionais nas amostras, utilizando o equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR Spectrometer à temperatura ambiente, com faixa de varredura que foi de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.4.2 Microscopia Óptica (MO)

A microscopia óptica foi realizada para analisar a superfície da amostra em relação a sua topografia e morfologia, utilizando o Microscópio Hirox KH-1300 com aumento de 120x, através do método de iluminação por transmissão de luz visível. Para análise dos parâmetros, utilizou-se o software Gwyddion.

4.4.3 Termogravimetria (TGA)

A TGA foi efetuada para avaliar o percentual de perda de massa das amostras e, consequentemente, a estabilidade térmica das membranas. Para isso, utilizou o PYRIS 1 TGA da Perkin Elmer à uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, aumentando a temperatura de 30 à 600 $^{\circ}\text{C}$ em meio atmosférico (71% de nitrogênio e 29% de oxigênio) com fluxo de 20 mL/min.

4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial foi realizada em um DSCQ20 da TA Instruments com uma temperatura que variou de 30 à 400 °C, sob taxa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, com o objetivo de avaliar as transições de fases e observar se houveram mudanças nas propriedades das membranas proporcionadas pela reticulação.

4.4.5 Tração

Este ensaio teve como objetivo avaliar a resistência ao alongamento e ao rompimento quando submetidos à tração das membranas (MQ e MQC) nas diferentes condições de reticulação (G0, G1 e G2). O ensaio foi realizado em uma INSTRON, modelo 3366 com célula de carga de 500N e uso de extensômetro mecânico a temperatura ambiente e velocidade de deslocamento do travessão de 5 mm/min, seguindo a norma ASTM D882-91 (ASTM,1991).

4.4.6 Molhabilidade

Essa caracterização foi realizada com o intuito de analisar o grau de hidrofobicidade das amostras através do gotejamento com água destilada nas membranas. Para isso, observou-se a tensão superficial entre a membrana e a gota através de um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e verificou o ângulo de contato no programa Angle Calculator 1.0, para determinar se o material é hidrofílico ou hidrofóbico.

4.4.7 Intumescimento

O grau de intumescimento (GI) foi determinado com o objetivo de verificar o comportamento das amostras em meio líquido semelhante ao do organismo. Dessa forma, as membranas foram secas em estufa a 40 °C por 24 horas e pesadas em balança analítica. Posteriormente, foram imersas em 5mL de solução tampão fosfato (PBS) e armazenadas em estufa bacteriológica a 37 °C, sendo retiradas, reduzindo o excesso de solução com o auxílio de papel filtro, e pesadas em balança analítica nos tempos de 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas. Por fim, o GI foi calculado de acordo com a Equação 2 para cada amostra no tempo t.

$$GI = \frac{M_t - M_i}{M_i} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde,

M_t = Peso da amostra no tempo t

M_i = Peso inicial da amostra

4.4.8 Biodegradação

A biodegradação foi realizada com o objetivo de verificar a degradação das membranas em meios biológicos e foi baseada nas normas ASTM F1635-04 Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2009) e a ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications (2007).

As amostras foram armazenadas em estufa à 40 °C por 24 horas, pesadas em balança analítica e divididas em dois grupos: no primeiro, as membranas foram imersas em uma solução tampão fosfato (PBS); no segundo, as membranas foram imersas em uma solução de lisozima/PBS com concentração de 1mg/mL. Ambos os grupos foram incubados em estufa microbiológica à uma temperatura de 37 °C por 7 dias. Ao fim da incubação, lavou-se várias vezes as membranas com água destilada, secou-as por 24 horas em estufa à 40 °C e pesou em balança analítica. Para obtenção dos resultados, utilizou-se a Equação 3.

$$B = \frac{M_i - M}{M_i} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde,

M = Peso final

M_i = Peso inicial

4.4.9 Citotoxicidade

A avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos (Citotoxicidade) *in vitro* foi realizada com o intuito de observar os efeitos biológicos adversos agudos provenientes do biomaterial e foi realizado pelo teste de avaliação da viabilidade celular de fibroblastos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009 através do método direto de contato entre o substrato do material e as células (L929).

A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas da PerkinElmer, modelo Victor3, a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. Calculou-se a viabilidade celular em porcentagem por meio do Teste de Grubbs para *Outliers*, seguido do cálculo da média e desvio padrão corrigido pelo Graph Pad Prism 6.

De acordo com a classificação de materiais da norma ISO 10993-5:2009, a viabilidade celular determina a citotoxicidade do material, conforme demonstrado na Equação 4.

$$\begin{cases} \%VIAB - U(VIAB.) \geq 70\% , \text{Não citotóxica} \\ \%VIAB - U(VIAB.) < 70\% , \text{Citotóxica} \end{cases} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde,

$\%VIAB$ = Viabilidade Celular (%)

$U(VIAB.)$ = Cálculo da Incerteza ou Desvio padrão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLÁGENO

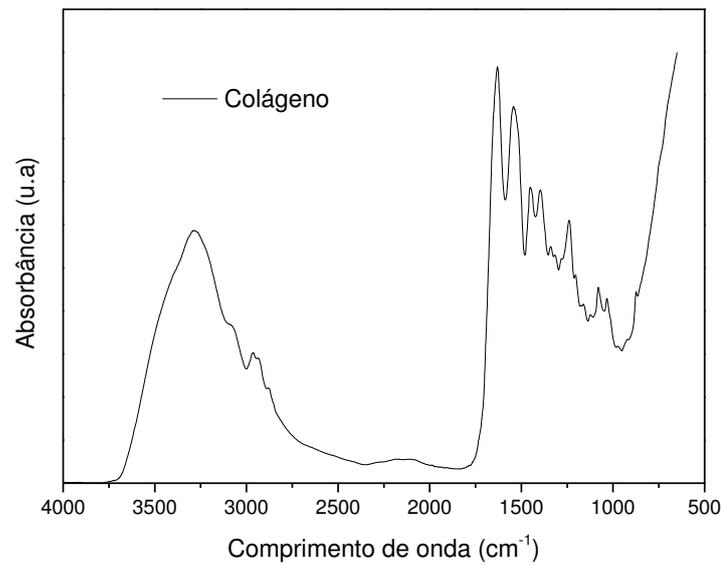
A metodologia adotada para extração do colágeno proporcionou um rendimento de 4,21% em relação a matéria prima utilizada, conforme observa-se na Tabela 1, um valor satisfatório e intermediário quando comparada às afirmativas de Ornellas (2001, apud ALCANTARA, 2012) e Leach (1982, apud OLIVEIRA, et al. 2009), em que às concentrações de colágeno na membrana da casca do ovo foram de 3% e 10%, respectivamente. O que sugere que há uma variabilidade na concentração de colágeno na membrana da casca do ovo que está diretamente relacionando à sua proveniência. Por outro lado, o resultado também se manteve satisfatório quando comparado às metodologias e rendimentos na extração do colágeno de peixes descritos por Oliveira et al (2017).

Tabela 1 - Rendimento na extração do Colágeno a partir da membrana da casca do ovo.

Membrana da casca do Ovo (g)	9,5
Colágeno Extraído (g)	0,4
Rendimento (%)	4,21

Fonte: Autor

A técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), confirmou que a molécula extraída, realmente, se tratava do colágeno como pode-se observar no Gráfico 1, comparando os comprimentos de onda obtidos (Tabela 2) com os já disponíveis na literatura (Tabela 3).

Gráfico 1 - FTIR do colágeno puro extraído da membrana da casca do ovo

Fonte: Autor.

Tabela 2 - Bandas de absorção nos espectros do FTIR do colágeno extraído da membrana da casca do ovo

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Molécula associada
1239	Amida III: ν C-N
1450	ν (C-H) do anel pirrolídico
1539	(amida II: δ N-H + ν C-N + ν C-C)
1626	(amida I: ν (C=O))
2963	ν (C-H)
3291	O-H / ν (N-H)

(Fonte: Autor)

Tabela 3: Bandas características no FTIR para o colágeno puro

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Molécula associada
1226 - 1292	Amida III: ν C-N
1450	ν (C-H) do anel pirrolídico
1540	(amida II: δ N-H + ν C-N + ν C-C)
1600-1760	(amida I: ν (C=O))
2800-3000	ν (C-H)

3400-3200/3600-3150	O-H / v(N-H)
---------------------	--------------

(Fonte: GIL, 2013)

5.2 MEMBRANAS QUITOSANA/COLÁGENO

As MQ (Figura 9) apresentaram uma maior homogeneidade na sua estrutura, quando comparadas às MQC (Figura 10). Entretanto, as membranas diminuíram, em média, 11,79 mm após a neutralização em atmosfera de hidróxido de amônia a 4% (Figura 11), retornando ao seu tamanho original quando absorvem umidade. Essa diminuição está associada diretamente a insolubilidade da quitosana em meio alcalino, pois, ao entrarem em contato com este meio, as moléculas tendem a se contraírem. Contudo, não foram observadas alterações na espessura das membranas, conforme observado na Tabela 4.

Figura 8 - Membranas de Quitosana (MQ) após evaporação do solvente e antes da neutralização com hidróxido de amônia



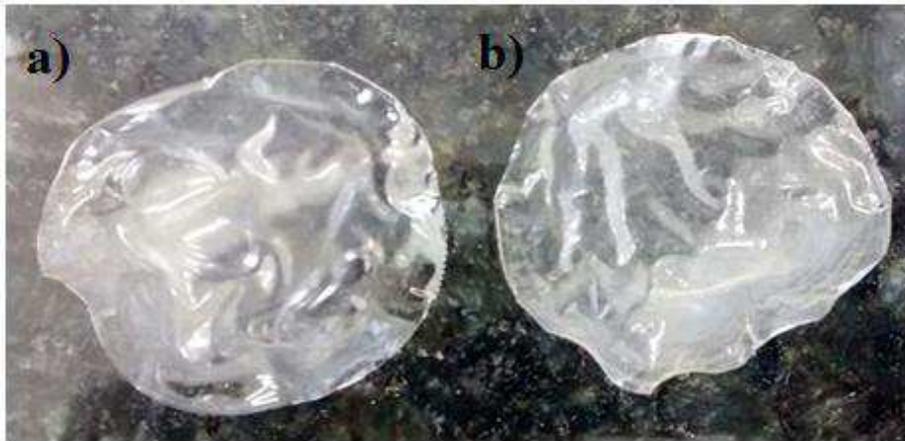
Fonte: Autor.

Figura 9 - Membranas de Quitosana/Colágeno (MQC) após evaporação do solvente e antes da neutralização com hidróxido de amônia



Fonte: Autor.

Figura10 - (a) Membranas de Quitosana e (b) Quitosana/Colágeno após a neutralização com hidróxido de amônia



Fonte: Autor.

Tabela 4 - Dimensões das Membranas de Quitosana e Quitosana/colágeno

	Diâmetro das membranas após evaporação do solvente (mm)	Diâmetro das membranas após neutralização com hidróxido de amônia (mm)	Espessura (mm)
MQ	60	48,21 +/- 0,5	0,067 ± 0,0094
MQC	60	48,21 +/- 0,5	0,099 ± 0,019

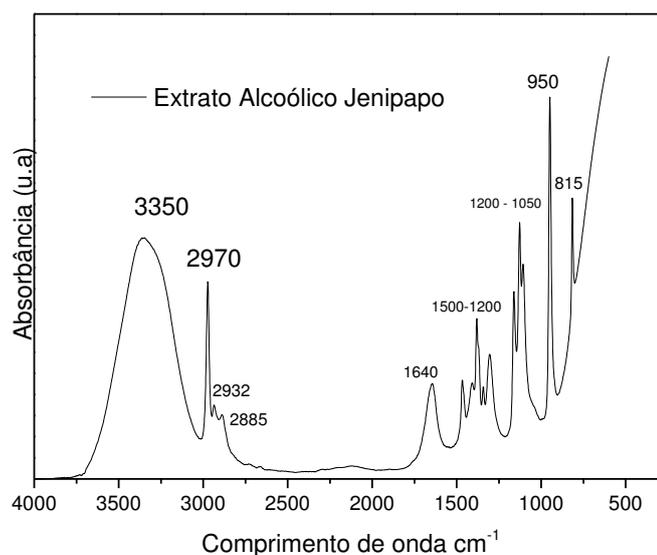
(Fonte: Autor)

5.3 RETICULAÇÃO

O Extrato alcoólico do jenipapo (G2) foi submetido a um FTIR (Figura 12), cujas ligações correspondentes as bandas foram identificadas e comparadas as bandas características da genipina pura (Tabela 5). No espectro da solução G2 identificou-se grupamento hidroxila (O-H) por volta de 3350 cm^{-1} ; entre 2750 e 3000 e em 1640 cm^{-1} uma conformação vibracional de estiramento do grupo C=C; nas bandas entre 1200 e 1500 cm^{-1} observou-se vibrações que podem ser atribuídas a ligações como CH_2 , CH_3 , NH e a presença de um anel heterocíclico; em meio as bandas que compreendem de 1050 a 1200 cm^{-1} , notou-se a presença de vibrações que correspondem ao CO, característico de álcoois e fenóis; por fim, nas bandas em torno de 815 e 950 cm^{-1} , um dobramento e uma deformação angular fora do plano relacionado a um anel aromático e $\text{RCH}=\text{CH}_2$ (alqueno), respectivamente (PAIVA et al., 2010)

Dessa forma, observa-se que no FTIR da solução G2 encontram-se bandas características da genipina, embora estejam em menor intensidade quando comparado a genipina comercial. Essa menor intensidade ocorreu devido à realização do ensaio no extrato não desidratado, como também a presença de outras substâncias que também são solúveis em álcool. Contudo, pode-se afirmar que a genipina encontra-se diluída e misturada a outras substâncias presentes no fruto do jenipapo.

Gráfico 2 - FTIR do Extrato Alcoólico do Jenipapo (G2).



Fonte: Autor.

Tabela 5 - Grupos característicos da genipina por FTIR.

Material	Bandas (cm ⁻¹)	Função	Grupos Associados
Ge	1000 – 1060	Álcool primário -C-OH	-OH: δ
Ge	1050 – 1150	Éter cíclico	C-O: ν
Ge	1200 – 1270	Éster C-O-C	C-O: ν
Ge	1170 – 1300	Éter C-O-C	C-O: ν
Ge	1300 – 1530	Anel Heterocíclico Alcoóis e Alcanos	δ OH/ δ CH ₂ :(ν) /N-H: δ
Ge	1400 – 1450	Ésteres (íons carboxilatos)	C-H/ OH/C=O: ν
Ge	1406	Alceno	C=C ν
Ge	1600 – 1700	Alceno	C=C ν
Ge	1750 – 1700	Éster	C=O ν
Ge	2750 – 3000	Alceno	C=C ν

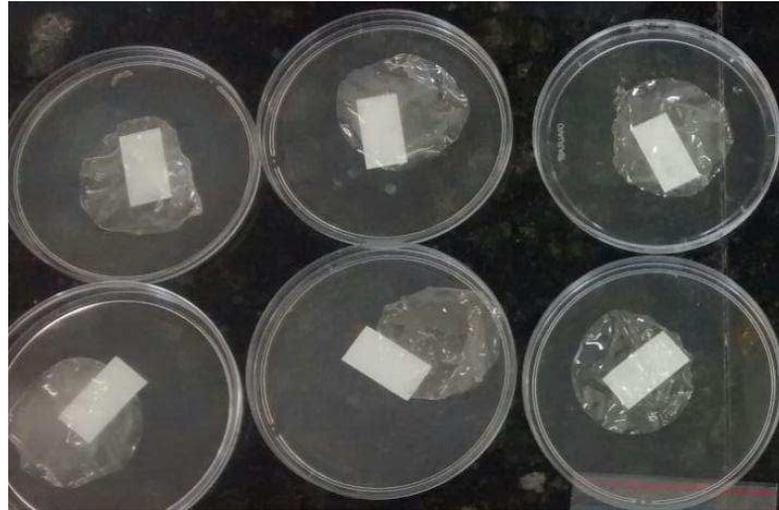
(Fonte: BISPO, 2009)

As membranas (MQ e MQC) utilizadas como controle negativo na condição G0 foram denominadas de MQ1 e MQC1 e não apresentaram nenhuma modificação aparente (Figura 13). MQ2 e MQC2, por sua vez, foram as membranas submetidas as condições G1 e demonstraram uma leve alteração na sua coloração para um tom mais amarelado (Figura 14). Já as MQ3 e MQC3 foram reticuladas na condição G2, apresentando, ao fim da reticulação, uma coloração esverdeada (Figura 15). Essas alterações nas membranas aconteceram por que a genipina reage com algumas proteínas na presença de luz e oxigênio, mudando a sua coloração.

Figura 11 - Membranas submetidas a condição G0.

(Fonte: Autor).

Figura 12 - Membranas submetidas a condição G1.



(Fonte: Autor).

Figura 13 - Membranas submetidas a condição G2.



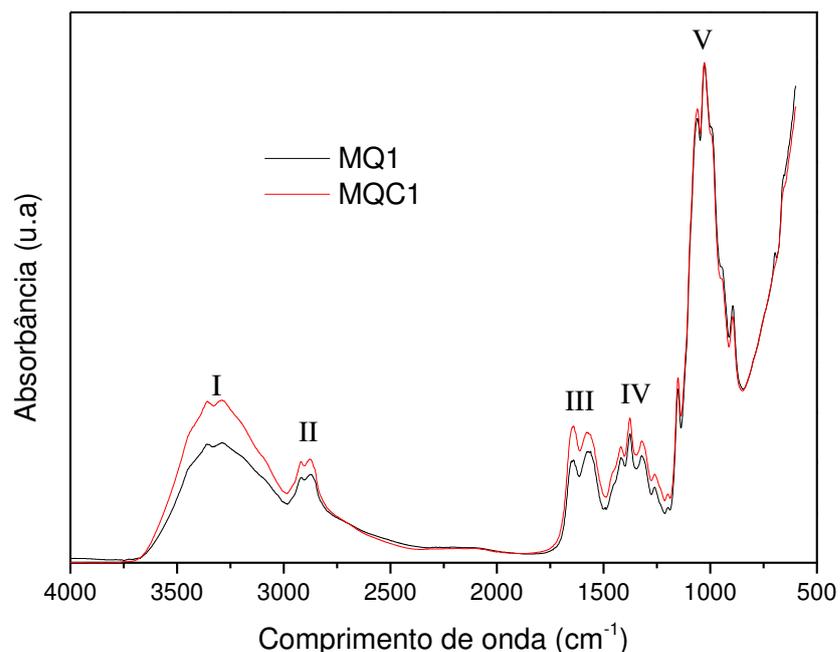
(Fonte: Autor).

5.4 CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS

5.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

As membranas de quitosana (MQ1) e quitosana/colágeno (MQC1) sem reticulação apresentaram vibrações características na região do infravermelho a membranas de quitosana (Gráfico 3), conforme descrito por Tomaz (2017) e Cardoso et al., (2012), sendo que na MQC1 houve um aumento na intensidade das vibrações de ligações que estão presentes tanto na quitosana quanto no colágeno, indicando que houve a incorporação do colágeno à estrutura da quitosana. De acordo com Tabela 6, a banda I, com comprimento de onda entre 3361 a 3280 cm^{-1} , corresponde às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH; a banda II, 2876 cm^{-1} , é atribuída à vibração de estiramento do grupo CH; a III, 1649 cm^{-1} , corresponde ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O ou à deformação axial C=O da amida primária, já no comprimento de onda equivalente à 1580 cm^{-1} , é atribuída a deformação da ligação -NH da amina; na região IV, 1378 cm^{-1} , está relacionada a deformação angular simétrica do grupo -CH₃; na banda V, 1150 cm^{-1} , 890 cm^{-1} e 1064 cm^{-1} estão atribuídas à vibrações de estiramento do grupo C-O-C, característica da estrutura sacarídica da quitosana (DI MARTINO et al., 2017).

Gráfico 3 - FTIR das Membranas MQ1 e MQC1



(Fonte: Autor).

Tabela 6 - Bandas de absorção nos espectros do FTIR das membranas MQ1, MQC1

Número indicado no Espectro do infravermelho	Comprimento de onda (cm⁻¹)	Atribuição
I	3361 – 3280	OH / NH : ν
II	2876	CH : ν
III	1649	C=O : ν
	1580	NH
IV	1378	CH ₃
V	1150, 890 e 1064	C-O-C : ν

(Fonte: Autor)

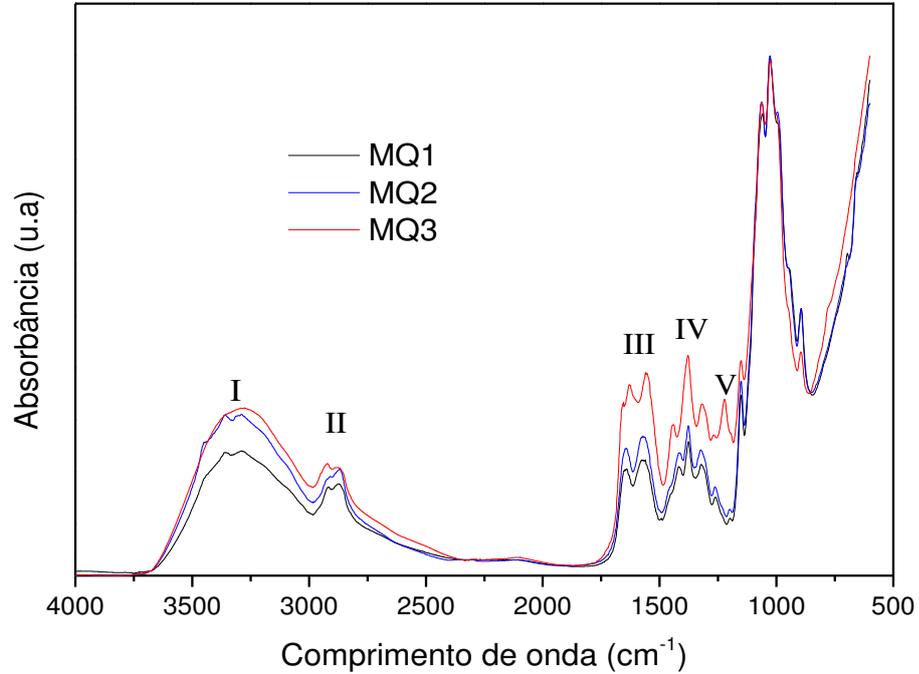
Ainda de acordo com Tomaz (2017), a presença das bandas C=O e N-H, bem como a banda de absorção em 1378 cm⁻¹ que é característica da deformação angular simétrica do grupo –CH₃, em conjunto, indica a presença de grupos acetamidos, pois a quitosana não está 100% desacetilada, conforme descrito no tópico 4.2.1 deste trabalho.

Ao observar-se a Figura 17, pode-se afirmar que a solução G1 e G2 proporcionaram a reticulação das membranas de quitosana, sendo que a reticulação com G2 foi mais perceptível, provavelmente devido a diferença de concentração do agente reticulante (genipina) na solução, uma vez que houve um aumento na intensidade de absorção na banda III e IV, associado ao ataque nucleofílico, havendo a substituição do grupo éster da genipina por uma ligação do tipo amida secundária da quitosana, em seguida, no aparecimento da banda V, indicando a introdução de um grupamento amina no anel diidropirano da genipina, conforme descrito no tópico 3.6.3 deste trabalho (BUTLER, 2003; PAIVA et al., 2010; WADE JR., 2011;).

No FTIR das Membranas de Quitosana/colágeno (MQC1, MQC2 e MQC3), conforme apresentado na Gráfico 4, também indica que houve a reticulação na MQC3, uma vez que foram observados os mesmos eventos descritos anteriormente nas bandas III, IV e V, entretanto, na MQC2, a reticulação não foi perceptível através da análise da Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier, pois houve uma diminuição na intensidade de algumas vibrações, resultado que está associado à baixa concentração de

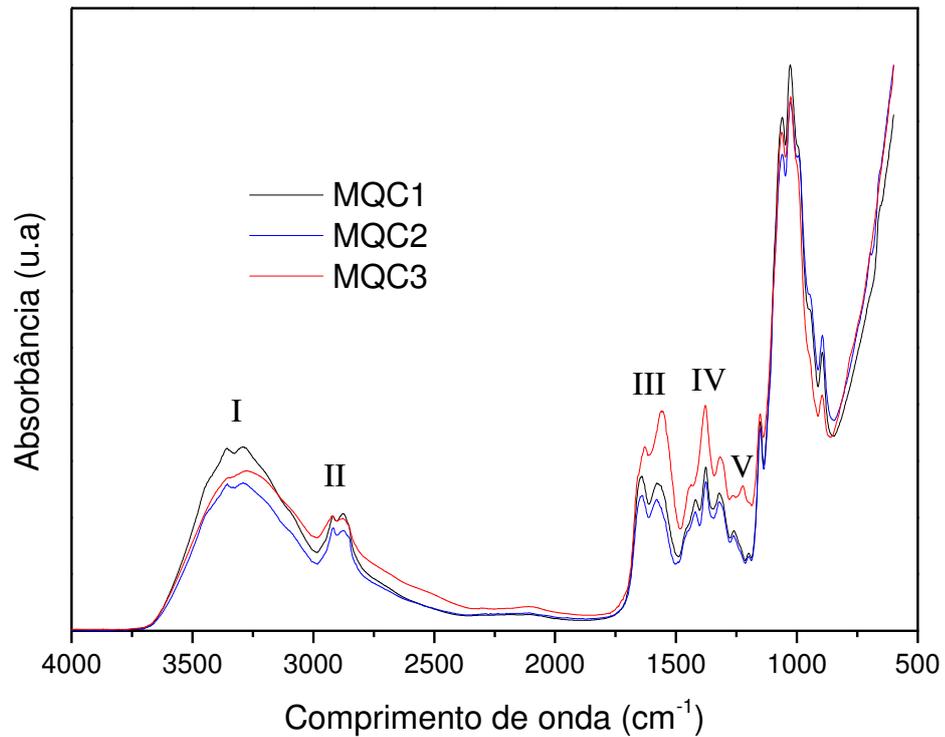
genipina na solução G1, contudo, a reticulação pode ser comprovada através da análise dos demais resultados.

Gráfico 4 - FTIR das Membranas MQ1, MQ2 e MQ3.



(Fonte: Autor).

Gráfico 5 - FTIR das Membranas MQC1, MQC2 e MQC3.



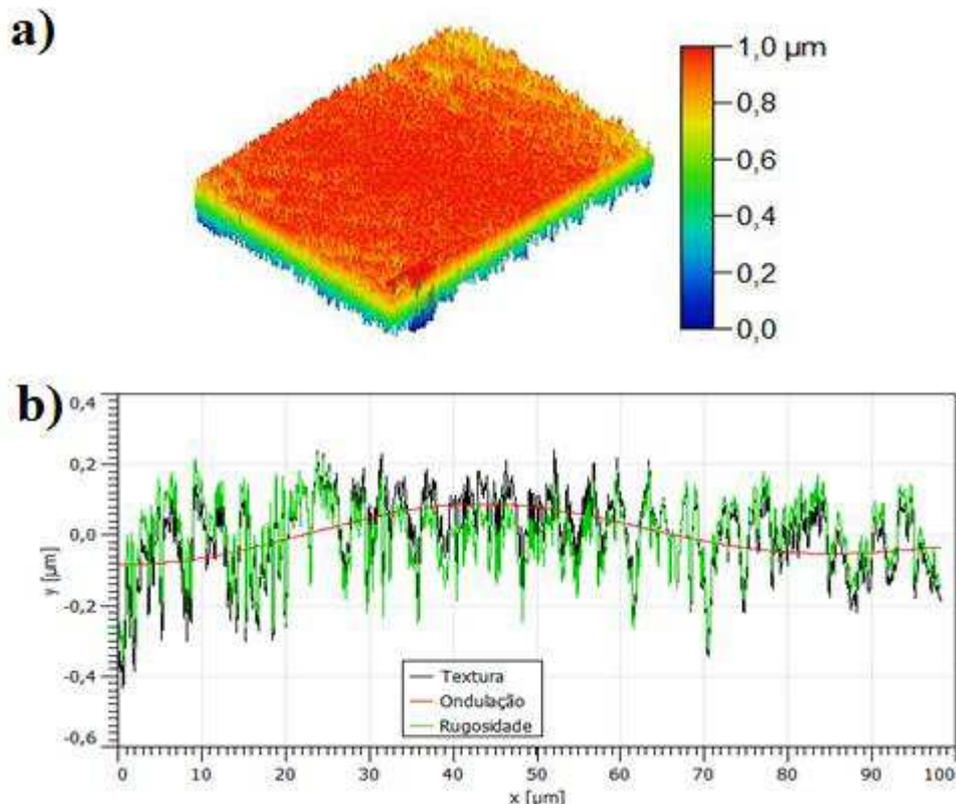
(Fonte: Autor).

5.4.2 Microscopia Óptica

Através da microscopia óptica pode-se observar que as membranas MQ1, MQ2 e MQ3, apresentaram uma textura homogênea, lisa e com transparência adequada, conforme exposto por Frango (2014) e Macêdo (et al., 2014). MQC1, MQC2 e MQC3, por sua vez, apresentaram textura semelhante, porém, houve a formação de pequenos aglomerados de colágeno ao longo da membrana, associados a baixa solubilização do colágeno no meio, tornando as membranas heterogêneas e rugosa.

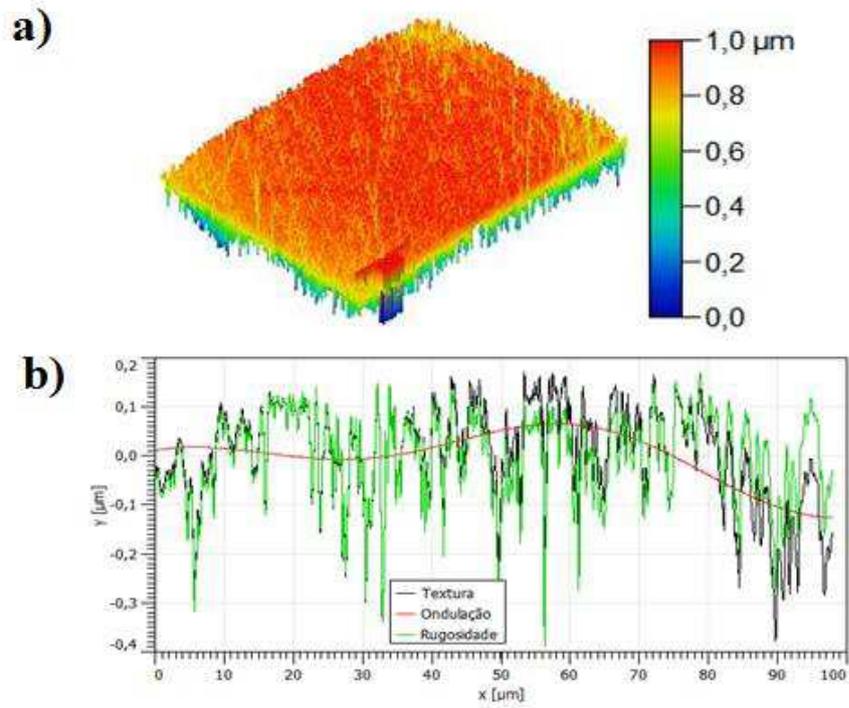
Nas membranas de quitosana, a análise microscópica revelou uma maior homogeneidade na superfície da MQ1 (Gráfico 6a), quando comparada à MQ2 e MQ3 (Gráficos 7a e 8a), além disso, é possível evidenciar que a condição de reticulação G2 proporcionou maior eficiência na compactação das membranas, resultado que pode ser observado através da análise de variação da Rugosidade (Ra) e Ondulação (Wa) (Gráficos 6b, 7b e 8b) (Tabela 8).

Gráfico 6 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQ1



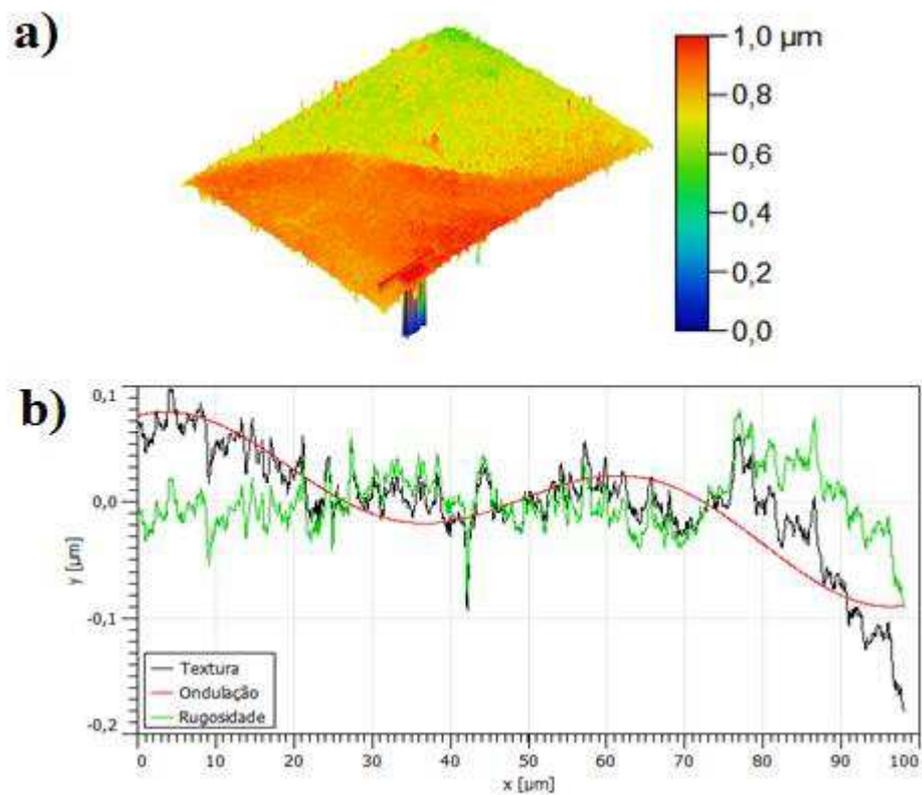
(Fonte: Autor).

Gráfico 7 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQ2



(Fonte: Autor).

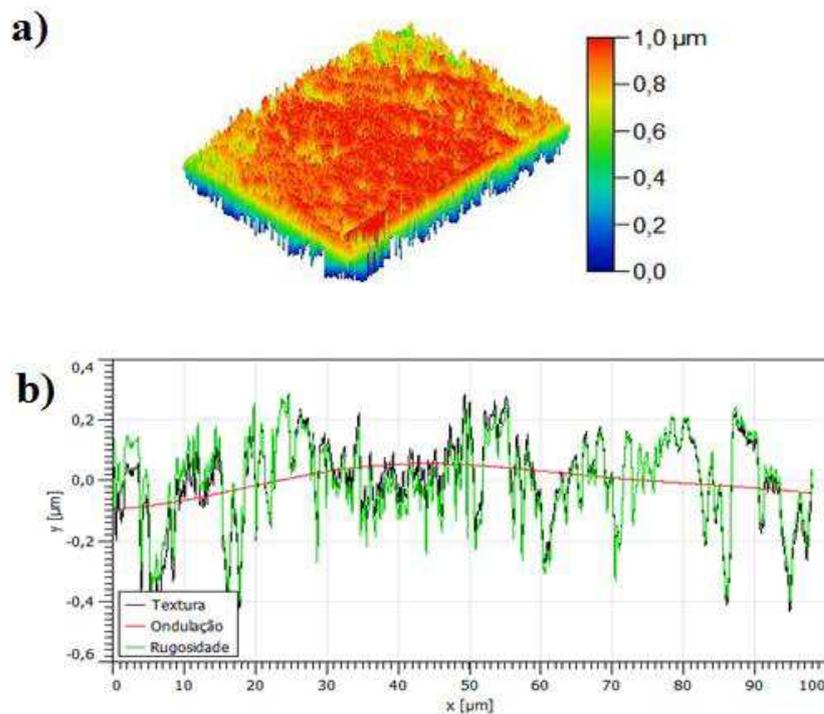
Gráfico 8 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQ3



(Fonte: Autor).

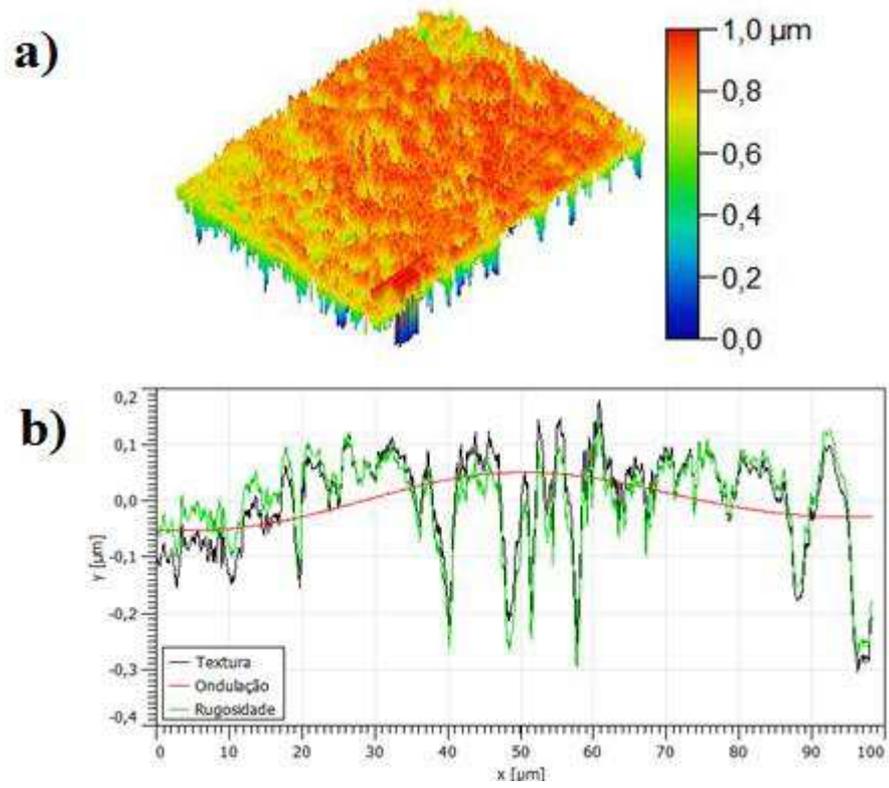
As membranas de quitosana/colágeno apresentaram resultados semelhantes às membranas de quitosana, pois MQC1 (Gráfico 9a) também apresentou maior homogeneidade quando comparada a MQC2 e MQC3 (Figuras 23a e 24a, respectivamente) e a condição de reticulação G2 foi mais eficiente na compactação das mesmas (Figura 9b, 10b e 11b) (Tabela 8). Entretanto, é possível observar que a MQC3 foi a mais suscetível à essa modificação na espessura quando comparada as outras membranas (MQ2, MQ3 e MQC2), indicando que a presença do colágeno na estrutura influenciou diretamente no processo de reticulação.

Gráfico 9 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQC1



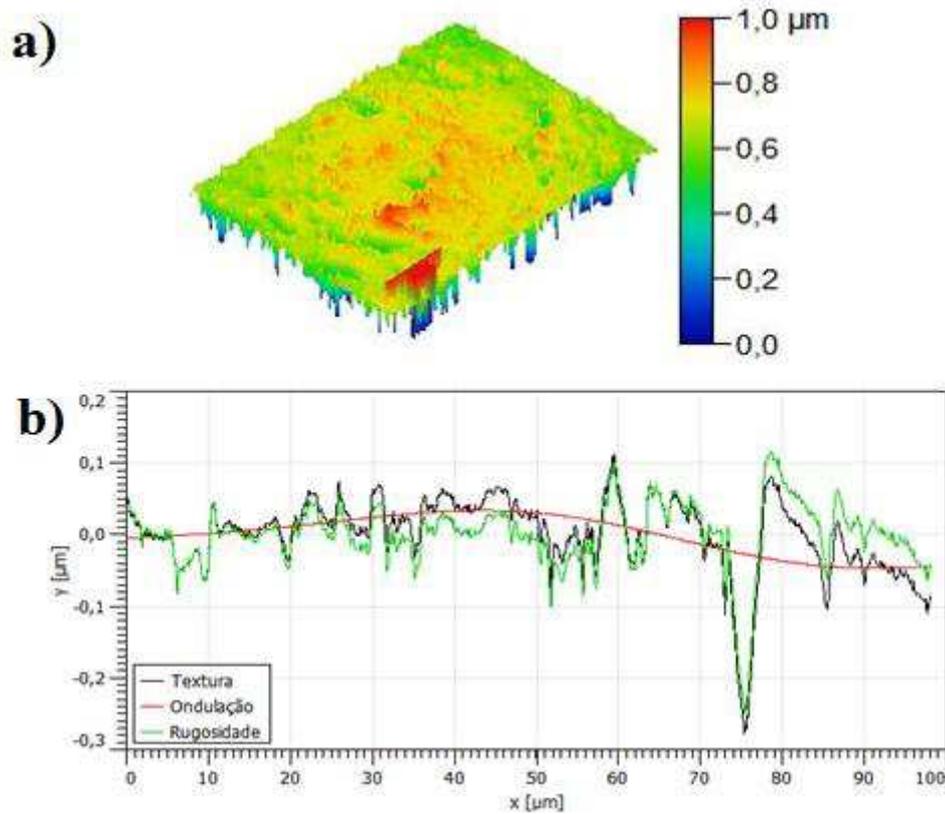
(Fonte: Autor).

Gráfico 10 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQC2.



(Fonte: Autor).

Gráfico 11 - (a) Topografia e (b) Morfologia da MQC3.



(Fonte: Autor).

Conforme observado na Tabela 8, ocorreu modificação na estrutura das membranas (diminuição nanométrica da espessura), modificação essa que está relacionada ao processo de reticulação, pois quanto maior a concentração do agente reticulante menor foi a expansão do polímero reticulado (HARRIS, 2009; BISPO, 2009).

Tabela 7 - Parâmetros Morfológicos das Membranas.

Membranas	Rugosidade média - Ra (nm)	Pico da Rugosidade - Rp (nm)	Ondulação média - Wa (nm)	Ondulação máxima- Wy (nm)
MQ1	80,16	227,09	49,97	171,68
MQ2	71,31	168,51	37,72	191,54
MQ3	19,29	78,71	34,56	167,90
MQC1	110,24	274,69	35,32	151,61
MQC2	63,20	140,89	30,63	104,17
MQC3	30,97	115,86	22,82	80,90

(Fonte: Autor)

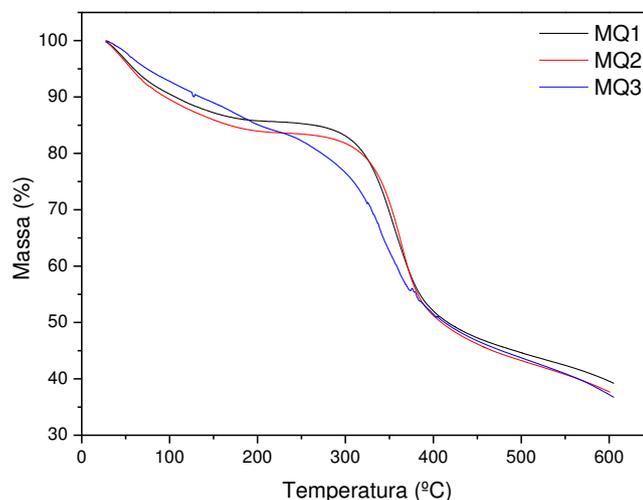
5.4.3 Termogravimetria

Com base nas curvas termogravimétricas das membranas de quitosana (Gráfico 12), observa-se que a MQ1 apresentou 2 etapas de perda de massa (P.M), enquanto as membranas reticuladas (MQ2 e MQ3) apresentaram 3 etapas. A primeira etapa está relacionada a volatilização do solvente e desidratação das membranas. Na segunda etapa ocorre a desacetilação e despolimerização dos compostos, em outras palavras, ocorre a degradação do material. A terceira etapa, por sua vez, está relacionada a perda de cinzas resultante da degradação dos compostos (TOMAZ, 2017; CARVALHO, 2017)

A etapa I teve início aos 30 °C e encerrou em 231,36, 229,14 e 222,07 °C com perdas de massa de 14,10, 15,95 e 15,97% para MQ1, MQ2 e MQ3, respectivamente. A etapa II em MQ1, MQ2 e MQ3 iniciou-se em 250, 260 e 230 °C e terminou em 600, 518,79 e 509,65 com perdas de massa de 45,95, 41,34 e 40,70, na devida ordem. A etapa III começou em 519 e 510 °C e encerrou em 600 °C com perda de massa de 4,6 e 6,02 para MQ2 e MQ3, respectivamente. Ao fim dessas etapas observou-se uma massa residual de 39,57, 37,65 e 37,12% em MQ1, MQ2 e MQ3, simultaneamente (Tabela 9).

A partir dessas observações é possível perceber que a reticulação (G1 e G2) proporcionou uma redução na temperatura de transição da Etapa I para a II e a introdução de uma terceira etapa no processo de degradação das membranas de quitosana, indicando que a reticulação influenciou na estabilidade térmica do material, diminuindo a sua resistência a temperatura, resultado que poderá ser confirmado através da Calorimetria Exploratória Diferencial.

Gráfico 12 - Curva termogravimétrica da MQ1, MQ2 e MQ3



(Fonte: Autor).

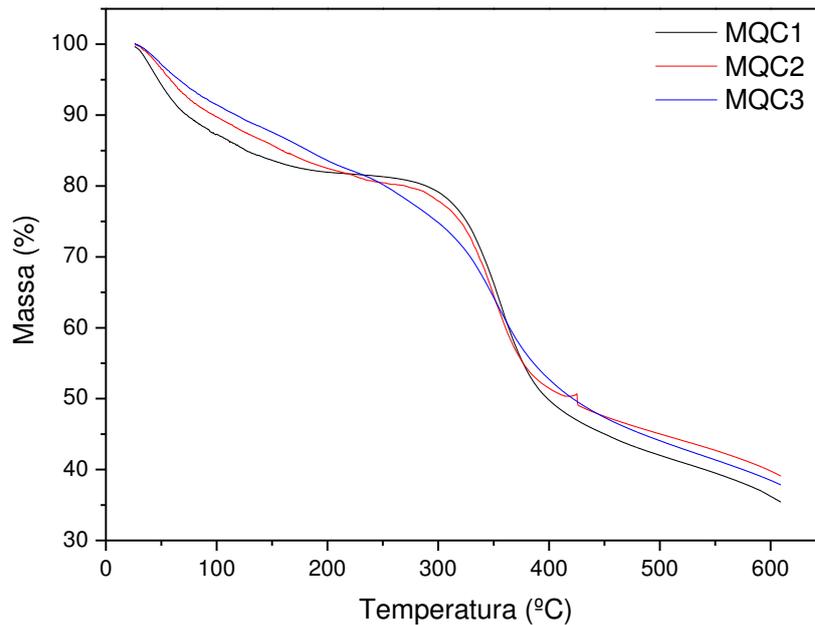
Tabela 8 - Dados termogravimétricos da MQ1, MQ2 e MQ3.

		MQ1	MQ2	MQ3
Etapa I	T (°C)	30 – 231,36	30 – 229,14	30 – 222,07
	P.M (%)	14,1	15,95	15,97
Etapa II	T (°C)	250 – 600	260 – 518,79	230 – 509,65
	P.M (%)	45,95	41,34	40,79
Etapa III	T (°C)	-	519 – 600	510 – 600
	P.M (%)	-	4,6	6,02
Massa Residual (%)		39,57	37,65	37,12

(Fonte: Autor)

As curvas termogravimétricas das membranas de quitosana/colágeno (Gráfico 13), por sua vez, apresentaram 3 etapas na perda de massa em MQC1 e apenas duas etapas em MQC2 e MQC3. De modo que a etapa I teve início em 30 °C e fim 215,33, 256,24 e 224,66 °C com perdas de massa de 17,45, 19,35 17,79% em MQC1, MQC2 e MQC3, na devida ordem. A etapa II com ponto de partida em 220, 260 e 225 °C e término em 523,69 °C para MQC1, com perda de massa na faixa de 40,92%, e 600 °C para MQC2 e MQC3, com perda de massa de 40,44 e 43,47%, simultaneamente. A etapa III iniciou-se em 524 °C e encerrou-se em 600 °C com perda de massa de 4,61%, na MQC1. Apresentando, ao fim das etapas, massa residual de 36,22, 39,80 e 38,62% (Tabela 9).

Dessa forma, ao contrário das membranas de quitosana, a reticulação nas membranas de quitosana/Colágeno proporcionou um aumento na temperatura de transição da Etapa I para a Etapa II e a remoção da etapa 3 do range de temperatura utilizado, indicando que a reticulação também influenciou na estabilidade térmica desse material, aumentando a sua resistência à temperatura, resultado a ser confirmado através da Calorimetria Exploratória Diferencial.

Gráfico 13 - Curva termogravimétrica da MQC1, MQC2 e MQC3.

(Fonte: Autor).

Tabela 9 - Dados termogravimétricos da MQC1, MQC2 e MQC3.

		MQC1	MQC2	MQC3
Etapa I	T (°C)	30 – 215,33	30 – 256,24	30 – 224,66
	P.M (%)	17,45	19,35	17,79
Etapa II	T (°C)	220 – 523,69	260 – 600	225 – 600
	P.M (%)	40,92	40,44	43,47
Etapa III	T (°C)	524 – 600	-	-
	P.M (%)	4,61	-	-
Massa Residual (%)		36,22	39,8	38,62

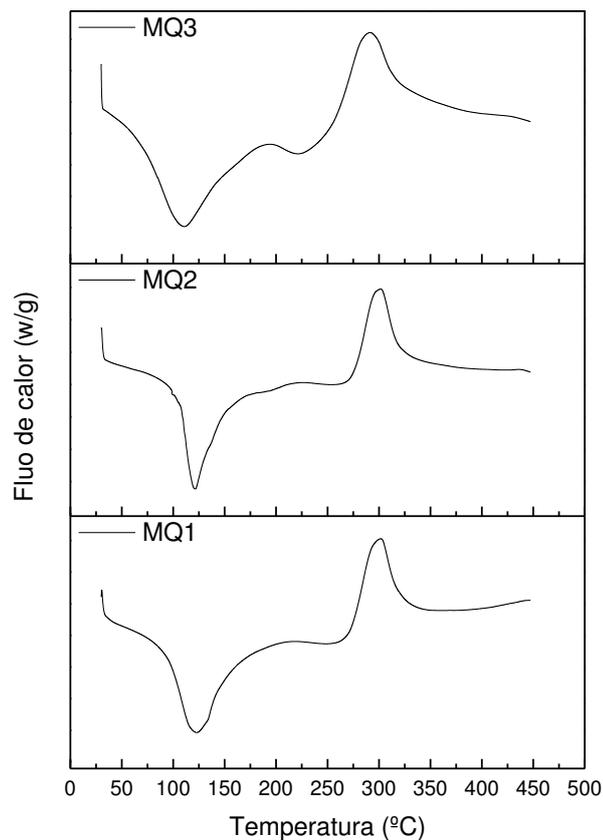
(Fonte: Autor)

Os resultados obtidos neste ensaio condizem com os descritos na literatura, pois o processo de reticulação é diretamente proporcional à estabilidade térmica da amostra, ou seja, quando a reticulação é baixa, a tendência é diminuir a estabilidade térmica, porém, quando a reticulação é aumentada até certo ponto, essa estabilidade também tende a aumentar, influenciando na temperatura de decomposição do material, pois a reticulação gera ligações de entrecruzamento entre as moléculas (FIDÉLIS et al., 2013; TOMAZ, 2017).

5.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas do DSC para as membranas de quitosana (MQ1, MQ2 e MQ3) apresentaram dois picos, um endotérmico e outro exotérmico, como observa-se no Gráfico 14. O primeiro pico, endotérmico, ocorreu na temperatura de 122,78 °C para MQ1, 119,57 °C para MQ2 e 109,94 °C para MQ3 (Tabela 10), mostrando-se compatível com o resultado obtido pela termogravimetria, comprovando que a reticulação com G1 e G2 diminuiu a estabilidade térmica da membrana de quitosana, sendo que a solução G2 proporcionou uma redução mais considerável quando comparada a G1. Os picos exotérmicos foram observados nas temperaturas de 300,63, 299,26 e 289 °C para MQ1, MQ2 e MQ3 (Tabela 10), respectivamente, reafirmando a diminuição na resistência térmica das membranas de quitosana ocasionada pela reticulação.

Gráfico 14 - Curva de DSC das Membranas de Quitosana



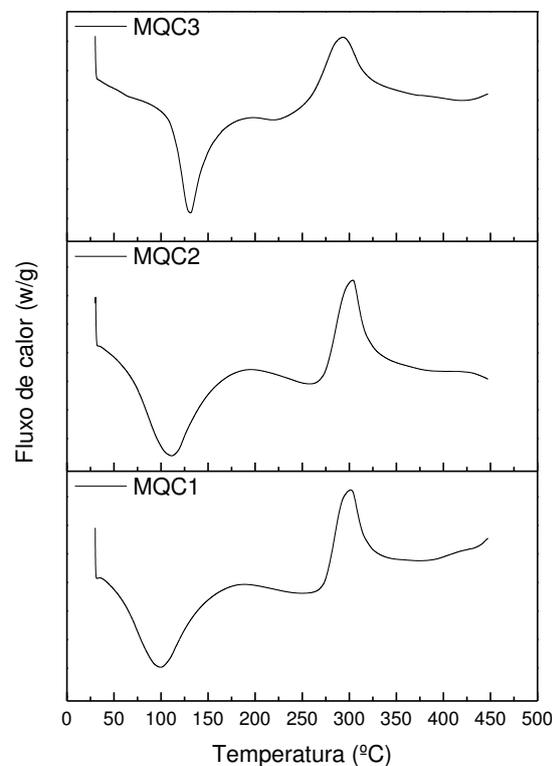
(Fonte: Autor).

Tabela 10 - Dados referentes ao termograma das Membranas de Quitosana

Membranas	Pico Endotérmico (°C)	Pico Exotérmico (°C)
MQ1	122,78	300,63
MQ2	119,57	299,26
MQ3	109,94	289,53

(Fonte: Autor)

Nas membranas de quitosana/colágeno (MQC1, MQC2 e MQC3) as curvas do DSC também apresentaram dois picos, um endotérmico e outro exotérmico (Gráfico 15). Os picos endotérmicos e exotérmicos foram observados nas temperaturas de 99,37 e 300,56 para MQC1, 109,27 e 301,98 para MQC2 e, 131,13 e 292,57 para MQC3 (Tabela 11). Resultado que também se mostra compatível com o obtido pela termogravimetria, indicando que a reticulação nas membranas de quitosana/colágeno, ao contrário das membranas de quitosana, aumentou a estabilidade térmica do material e, conseqüentemente, a sua resistência a temperatura, sendo que, mais uma vez, a solução G2 supera o resultado obtido por G1.

Gráfico 15 - Curva de DSC das Membranas de Quitosana/Colágeno.

(Fonte: Autor).

Tabela 11 - Dados referentes ao termograma das Membranas de Quitosana/Colágeno

Membranas	Pico Endotérmico (°C)	Pico Exotérmico (°C)
MQC1	99,37	300,56
MQC2	109,27	301,98
MQC3	131,13	292,57

(Fonte: Autor)

De acordo com Silva (2016), a seleção de métodos de esterilização para materiais destinados à área médica deve levar em consideração aspectos físicos e químicos do material, uma vez que os dispositivos médicos costumam ser sensíveis à altas temperaturas apresentadas pela esterilização por vapor de autoclave, tornando a técnica raramente empregada para esterilização de filmes poliméricos utilizados na produção de bandagens adesivas. No entanto, A MQC3, como já foi mencionado, apresentou um pico endotérmico de 131,13 °C, característica que aumenta as possibilidades de esterilização desse material para meios que utilizam alta temperatura, como a autoclavagem, sem que haja o comprometimento da sua estrutura polimérica.

5.4.5 Tração

De acordo com as propriedades mecânicas das membranas, obtidas no ensaio mecânico de tração (Tabela 12), as membranas de quitosana/colágeno sem reticulação (MQC1) apresentam resistência à tensão inferior às membranas de quitosana sem reticulação (MQ1), entretanto, uma taxa de deformação superior. Isso acontece pois o colágeno perde resistência mecânica após sua extração, contudo, essa propriedade pode ser melhorada através da reticulação (ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2009).

Após submeter as membranas de quitosana às condições G1 e G2, observou-se que a reticulação com genipina aumentou a resistência à tensão das membranas (MQ2 e MQ3), diminuindo a sua taxa de deformação. Por outro lado, a reticulação das membranas de quitosana/colágeno com G1 não apresentou resultado expressivo quanto ao parâmetro de resistência a tensão, embora também tenha diminuído a taxa de deformação do biomaterial. G2, por sua vez, aumentou a resistência a tensão das membranas de quitosana/colágeno (MQC3), assim como diminuiu a taxa de deformação das mesmas.

Tabela 12 - Valores médios das propriedades mecânicas das membranas de quitosana e quitosana/colágeno para os dois ensaios

Membranas	Resistência a Tensão (Mpa)	Deformação (%)
MQ1	65,71 ± 3,49	7,94 ± 1,57
MQ2	69,92 ± 6,53	6,92 ± 0,77
MQ3	70,39 ± 9,98	5,07 ± 0,85
MQC1	49,12 ± 5,14	9,82 ± 3,04
MQC2	47,61 ± 7,49	5,23 ± 0,74
MQC3	59,34 ± 11,85	4,98 ± 1,44

(Fonte: Autor)

Levando em consideração a utilização do biomaterial para aplicações médicas, tem-se que as membranas com menor deformação e valores razoáveis de resistência à tração possuem um elevado potencial, tendo em vista que a produção do bioadesivo deve basear-se na sua finalidade de utilização, para qual tipo de ferimento ele será utilizado, a área do corpo, a fase de cicatrização, entre outros parâmetros, pois o biomaterial desenvolvido deve ser utilizado em superfícies onde a sua tensão de ruptura seja compatível com a do tecido (EVANS et al., 2013; KOUCHAK, 2015).

Dessa forma, nota-se que os resultados obtidos neste ensaio foram mais expressivos para as membranas de quitosana/colágeno submetidas à condição de reticulação G2, uma vez que a concentração do agente reticulante, assim como a concentração de colágeno no biomaterial influencia diretamente na alteração das propriedades mecânicas do material (REZENDE NETO, 2011; FIAMINGO, 2016).

5.4.6 Molhabilidade

Quando as membranas foram analisadas separadamente, observou-se que a solução G1 diminuiu a hidrofiliabilidade das membranas de quitosana, ao mesmo tempo em que aumentou a hidrofiliabilidade nas membranas de quitosana/colágeno. A solução G2, por sua vez, aumentou a hidrofobicidade das membranas de quitosana/colágeno, diminuindo esse parâmetro nas membranas de quitosana, pois quanto maior o ângulo obtido, menor é a hidrofiliabilidade da

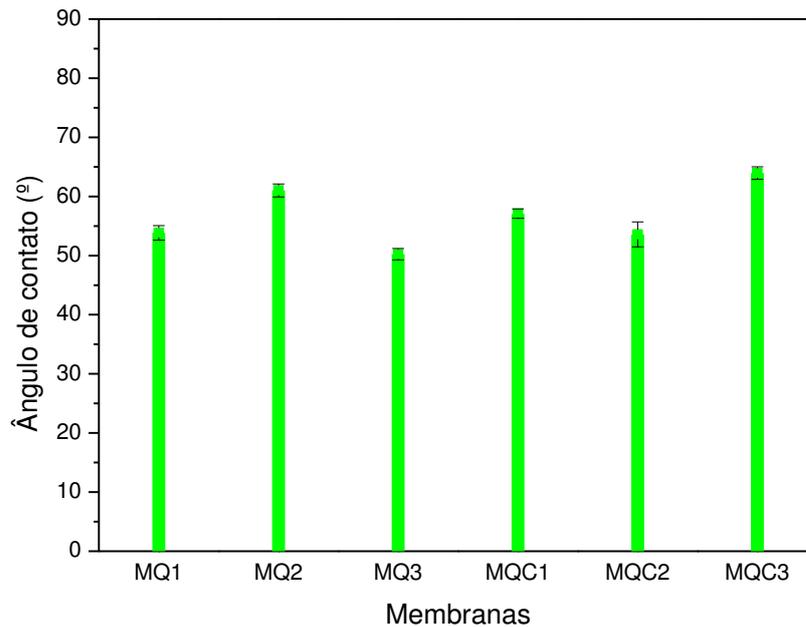
superfície. Entretanto, como observa-se na Tabela 13 e no Gráfico 16, ambas as membranas apresentaram uma característica hidrofílica, com alta molhabilidade, pois os ângulos de contato foram inferiores a 90° (YUAN, 2013; SOUZA, 2014; RAABE, 2016).

Tabela 13 - Ângulos de contato das membranas (MQ1, MQ2, MQ3, MQC1, MQC2 e MQC3)

AMOSTRA	MEDIÇÕES (°)			MÉDIA (°)	DESVIO (°)
	1	2	3		
MQ1	55,04	53,91	52,59	53,85	1,23
MQ2	62,28	60,52	60,25	61,02	1,10
MQ3	49,55	51,34	49,84	50,24	0,96
MQC1	57,91	56,3	57,09	57,10	0,81
MQC2	55,24	51,21	54,29	53,58	2,11
MQC3	62,85	64,05	64,98	63,96	1,07

(Fonte: Autor)

Gráfico 16 - Molhabilidade por ângulo de contato das membranas (MQ1, MQ2, MQ3, MQC1, MQC2 e MQC3)



(Fonte: Autor).

A hidrofiliabilidade da quitosana está relacionada aos grupamentos amina presentes ao longo de sua estrutura (SOUZA, 2014). Com a adição do colágeno à estrutura da quitosana, há uma interação eletrostática entre os grupos carboxílicos do colágeno com os grupos amino protonados presentes na quitosana, ocasionando uma redução na densidade da carga positiva

e, conseqüentemente, aumento do ângulo de contato (FERNANDES, 2009; TRINDADE et al., 2011; SALAZAR, 2015).

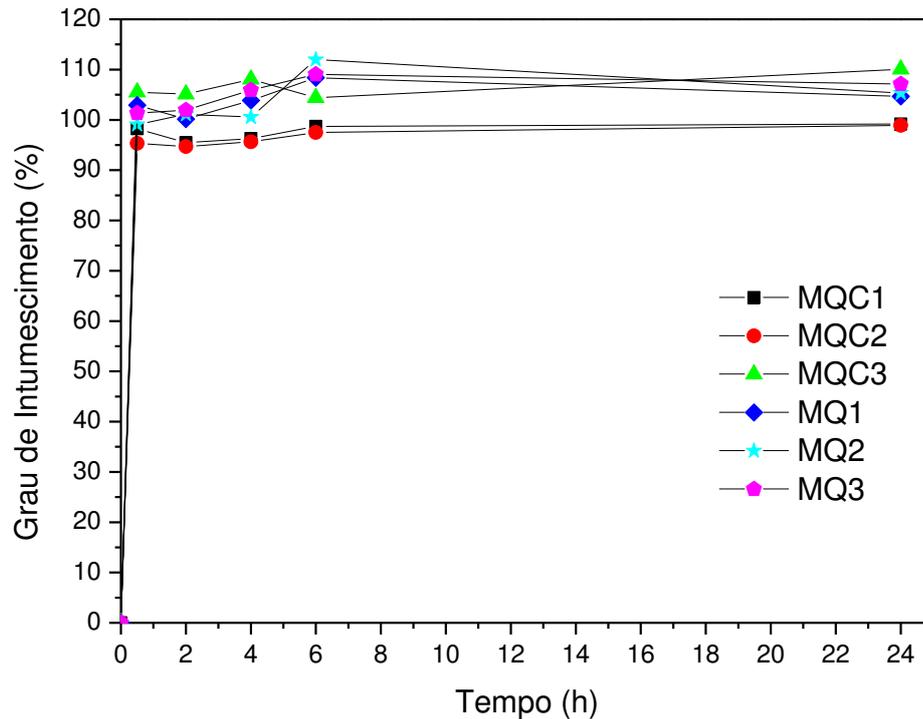
Durante a reticulação das membranas, há a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal em alta ou baixa proporção, a depender da concentração do agente reticulante, havendo um bloqueio dos grupos amino livres presentes na estrutura da membrana, ocasionando um aumento ou diminuição do ângulo de contato baseado no grau de reticulação sofrido pelo material (FERNANDES, 2009; SOUZA, 2014).

5.4.7 Intumescimento

Como apresentado no Gráfico 17 e nas Tabela 14 e 15, as membranas MQ1, MQ2 e MQ3 apresentaram um intumescimento máximo no tempo de 6 horas, enquanto as membranas MQC1, MQC2 e MQC3 apresentaram resultado semelhante no tempo de 24 horas.

As membranas reticuladas MQ2, MQ3 e MQC3 intumesceram mais que as membranas não reticuladas MQ1 e MQC1, resultado que diverge do exposto por Carange, (2014) e Smaniotto, (2014), quando afirmam que a reticulação por imersão diminui consideravelmente a capacidade de intumescimento da membrana. No entanto, MQC2 apresentou resultado compatível com o mencionado, pois intumescceu menos que MQC1. Por outro lado, resultados semelhantes foram obtidos por Rigo (2016). Mostrando que ainda existe divergência sobre a influência da reticulação na análise de intumescimento, levando em consideração a concentração dos constituintes na formação da membrana, como também o agente promotor da reticulação.

Além disso, a absorção máxima observada nas membranas foi de 111,97 % (MQ2), resultado que também diverge do valor reportado por Carange (2014) e Smaniotto (2014), cuja absorções variaram de 100 até 600%.

Gráfico 17 - Grau de Intumescimento das Membranas de Quitosana e Quitosana/Colágeno.

(Fonte: Autor).

Tabela 14 - Valores do Intumescimento para as Membranas de Quitosana

Tempo (h)		MQ1	MQ2	MQ3
0	Massa(g)	0,0207 ± 3,4E-03	0,0181 ± 1,7E-04	0,0225 ± 3,2E-03
	G.I (%)	0	0	0
0,5	Massa(g)	0,042 ± 7,7E-03	0,0360 ± 4,2E-04	0,0452 ± 5,0E-03
	G.I (%)	102,9	99,08	101,34
2	Massa(g)	0,0414 ± 7,6E-03	0,0364 ± 6,9E-04	0,0454 ± 5,6E-03
	G.I (%)	100,16	101,10	101,93
4	Massa(g)	0,0422 ± 8,3E-03	0,0363 ± 1,7E-04	0,0463 ± 5,9E-03
	G.I (%)	103,86	100,55	105,93
6	Massa(g)	0,0431 ± 6,7E-03	0,0384 ± 1,1E-03	0,0470 ± 4,6E-03
	G.I (%)	108,37	111,97	109,05
24	Massa(g)	0,0424 ± 8,8E-03	0,0372 ± 7,6E-04	0,0465 ± 5,9E-03
	G.I (%)	104,67	105,34	107,12

(Fonte: Autor)

Tabela 15 - Valores do Intumescimento para as Membranas de Quitosana/Colágeno

Tempo (h)		MQC1	MQC2	MQC3
0	Massa(g)	0,0206 ± 3,1E-04	0,0214 ± 1,4E-03	0,0235 ± 2,1E-03
	G.I (%)	0	0	0
0,5	Massa(g)	0,0409 ± 1,7E-04	0,0417 ± 3,2E-03	0,0484 ± 5,4E-03
	G.I (%)	98,22	95,32	105,52
2	Massa(g)	0,0403 ± 1,2E-03	0,0416 ± 3,4E-03	0,0483 ± 5,2E-03
	G.I (%)	95,48	94,70	105,10
4	Massa(g)	0,0405 ± 7,8E-04	0,0418 ± 3,0E-03	0,0490 ± 5,8E-03
	G.I (%)	96,28	95,63	108,07
6	Massa(g)	0,0410 ± 8,7E-04	0,0422 ± 3,1E-03	0,0481 ± 6,5E-03
	G.I (%)	98,71	97,50	104,39
24	Massa(g)	0,0411 ± 1,5E-03	0,0425 ± 3,4E-03	0,0494 ± 6,4E-03
	G.I (%)	99,19	98,91	110,06

(Fonte: Autor)

5.4.8 Biodegradação

Como é possível observar na Tabela 16, as membranas de quitosana/colágeno degradaram menos que as membranas de quitosana tanto na solução de PBS, quanto na de PBS+Lisozima, resultado que indica que a inserção do colágeno influenciou na velocidade de degradação do material. Por outro lado, nota-se que a reticulação com genipina acelerou o processo de degradação das membranas nos dois meios utilizados, resultado que corrobora com a afirmativa de Tomaz (2017), quando nos diz que o grau de reticulação das membranas possui importância no processo de degradação, isso porque os pontos de reticulação restringem a passagem das moléculas de PBS e de lisozima para dentro de sua estrutura, dificultando ou favorecendo a degradação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandes, (2009) e Camargo, (2017) nos seus ensaios de biodegradação para membranas de quitosana, quitosana com sulfato de condroitina e quitosana com alginato. Entretanto, os valores da degradação das membranas de quitosana/colágeno reticuladas com genipina obtidas neste trabalho foram bastante inferiores quanto aos valores reportados pelos trabalhos citados, confirmando que a interação

quitosana/colágeno – genipina demonstra ser promissora para utilização com fins médicos, uma vez que a velocidade de degradação provocada pela reticulação é um fator relevante para sua aplicabilidade na área médica, pois é possível controlar a duração de um sistema de liberação de fármaco no organismo através da variação deste parâmetro (CRUZ et al., 2016).

Tabela 16 - Biodegradação das Membranas de Quitosana e Quitosana/colágeno

Membranas	Perda de massa das membranas em 7 dias (%)	
	PBS	PBS + Lisozima
MQ1	4,2	2,21
MQ2	5,3	2,66
MQ3	15,16	19,37
MQC1	2,58	1,09
MQC2	3,68	1,8
MQC3	14,39	17,36

(Fonte: Autor)

5.4.9 Citotoxicidade

A avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade) das membranas de quitosana (MQ1, MQ2 e MQ3) e quitosana/colágeno (MQC1, MQC2 e MQC3) está apresentado na Tabela 17 e Figura 31, conforme sugerido por Fernandes (2009) e Macêdo e colaboradores (2010).

A biocompatibilidade da quitosana e do colágeno, como também de materiais constituídos por esses polímeros já são comprovados cientificamente, conforme apresentado anteriormente e baseando-se nos estudos de Medeiros (et al., 2016), Rigo (2016) e Ernesto (et al., 2016), contudo, as membranas confeccionadas neste trabalho apresentaram efeitos citotóxicos, com exceção da MQC2, de acordo com a Equação 4, descrita no tópico 4.4.9.

As membranas de quitosana sem reticulação (MQ1) apresentaram uma Viabilidade celular média de $54 \pm 27\%$, demonstrando um efeito citotóxico para a L929, de acordo com a norma adotada para esse ensaio. A análise do FTIR não identificou a formação do acetato de quitosana, resultado comprovado por a ausência de bandas intensas em 1550 e 1414 cm^{-1} , o

que sugere que a neutralização com o hidróxido de amônio foi efetiva, conforme observado por Fidélis (et al., 2013) e Furtado (2014).

Dessa forma, a citotoxicidade identificada nas membranas de quitosana confeccionadas neste trabalho está atribuída ao processo de neutralização com hidróxido de amônio, pois de acordo com Harada (2009) e Takamiya (2013) a presença de amônia e íons de amônio na estrutura do biomaterial é responsável por uma grande porção da toxicidade aguda do material testado, uma vez que a quitosana possui um grande potencial para a adsorção de amônia (BERNARDI, 2016).

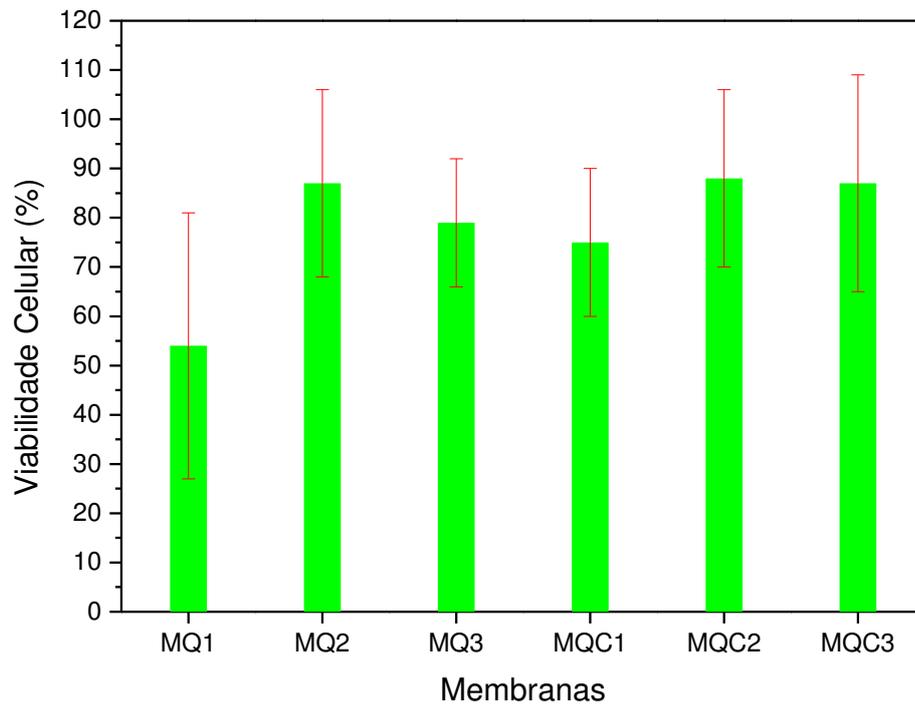
Entretanto, nota-se que a adição do colágeno à estrutura da membrana diminuiu a citotoxicidade identificada na MQ1, pois MQC1 apresentou viabilidade celular média de $75 \pm 15\%$. A reticulação com genipina, por sua vez, também aumentou a biocompatibilidade da MQ1, uma vez que MQ2 e MQ3 apresentaram viabilidade celular próximas as exigidas pela ISO 10993-5:2009, com valores de $87 \pm 19\%$ e $79 \pm 13\%$, respectivamente. Nas membranas de quitosana colágeno (MQC2 e MQC3), a reticulação nas condições G1 e G2 também proporcionou um aumento da biocompatibilidade do material, porém, de maneira mais expressiva, pois MQC2 apresentou viabilidade celular de $88 \pm 18\%$, se encaixando nas exigências da ISO 10993-5:2009, enquanto MQC3 apresentou uma viabilidade celular de $87 \pm 22\%$. A cerca disso, Granato (et al., 2009) nos diz que 50% é o mínimo da viabilidade celular que o biomaterial deve apresentar para ser biocompatível.

Tabela 17 - Viabilidade Celular das membrans de quitosna e quitosana/colágeno

Membranas	Viabilidade Celular (%)	U(VIAB.)
MQ1	54	27
MQ2	87	19
MQ3	79	13
MQC1	75	15
MQC2	88	18
MQC3	87	22

(Fonte: Autor)

Gráfico 18 - Viabilidade de fibroblastos L929 nas membranas de quitosana e quitosana/colágeno.



(Fonte: Autor).

De acordo com Bellini (2012), a averiguação da biocompatibilidade de materiais com potencial aplicação médica tem início nos ensaios de citotoxicidade, na qual o resultado negativo de citotoxicidade sinaliza ausência ou quantidades insuficientes de componentes prejudiciais no material avaliado, ou seja, sem potencial de estímulo de efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Um resultado positivo, ao contrário, indica a presença de uma ou mais substâncias que são extraídas e que podem ter importância clínica, sendo necessárias outras investigações para a determinação da utilidade do material.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia adotada neste trabalho para extração do colágeno mostrou-se eficiente quando comparada à resultados já disponíveis na literatura, comprovando que há variabilidade na concentração de colágeno na membrana da casca do ovo que está relacionada à sua proveniência, assim como na metodologia abordada para sua extração.
- A neutralização por evaporação de hidróxido de amônio provocou um encolhimento considerável nos diâmetros de todas as membranas.
- Contatou-se a presença de genipina no extrato alcoólico da polpa do jenipapo (G2), embora diluído junto à outras substâncias. E que a solução G1, proporcionou uma mudança na coloração das membranas para um tom amarelado, enquanto G2 para um tom esverdeado;
- Com as análises de Termogravimetria e Calorimetria Exploratória Diferencial pode-se verificar que a reticulação com G2 aumentou a resistência a temperatura das membranas de quitosana/colágeno, aumentando as possibilidades de esterilização dessas membranas para métodos que usam altas temperaturas, como a autoclavagem;
- A presença do colágeno na estrutura das membranas de quitosana reduziu a velocidade de degradação do biomaterial, enquanto a reticulação com G1 e G2 acelerou esse parâmetro;
- De acordo com a norma ISO 10993-5:2009, adotada para realização dos ensaios de citotoxicidade, as membranas de quitosana sem reticulação apresentaram efeitos citotóxicos para a L929, devido a presença de íons de amônio na estrutura das membranas. Contudo, a presença do colágeno no biomaterial, bem como a reticulação com genipina diminuíram a toxicidade das membranas, tornando o material biocompatível para as finalidades propostas neste trabalho.
- No mais, conclui-se que a reticulação com o Extrato Alcoólico do Jenipapo (G2) foi mais eficiente que a reticulação com genipina a 0,25% (G1) tanto nas membranas de quitosana, quanto nas membranas de quitosana/colágeno. Indicando um potencial promissor na reticulação com G2 de biomateriais destinados a engenharia de tecidos, como forma de tratamento e cicatrização para ferimentos da pele, baseando-se nos efeitos benéficos proporcionados pela reticulação, assim como no custo operacional relativamente baixo para obtenção do extrato.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a concentração de colágeno presente na membrana da casca do ovo baseando-se na origem da matéria prima (ovo de granja, ovo caipira), assim como o estudo de metodologias na extração do colágeno para o estabelecimento de uma técnica com maior eficiência;
- Verificar a influência de diferentes formas de neutralização no comportamento físico, químico e biológico do biomaterial;
- Realizar a caracterização do extrato alcoólico da polpa do jenipapo, a fim de identificar os compostos presentes na solução;
- Analisar minuciosamente a influência do colágeno e do grau de reticulação na alteração das propriedades mecânicas nas membranas à base de quitosana;
- Avaliar a influência do tipo de reticulação (Química ou Física), como também da concentração e composição do agente reticulante no intumescimento de biomateriais à base de quitosana e colágeno.
- Verificar o efeito da reticulação com o extrato alcoólico do Jenipapo em diferentes diluições.
- Realizar ensaios de citotoxicidade *in vivo*, assim como verificar a eficiência na cicatrização de ferimentos da pele proporcionada pelas membranas de quitosana/colágeno reticuladas.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, J. B. **Qualidade Físico-Química de ovos comerciais: Avaliação e manutenção da qualidade.** UFG: Goiânia, 2012.
- ASTM International: **D882-91.** Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Disponível em: < https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D882>. Acesso em: 02/02/2018.
- ASTM International: **F1635-04** Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants, 2009.
- ASTM International: **F2103-01** Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications, 2007.
- BATISTA, J. G. S. **Desenvolvimento de Matrizes Poliméricas Biodegradáveis à Base de Quitosana e Possíveis Blendas Como Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.** Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BENTES, A. S.; SOUZA, H. A. L.; AMAYA-FARFAN, J.; LOPES, A. S.; FARIA, L. J. G. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. **J Food Sci Technol**, v. 52, p. 3919-3924, 2014.
- BELLINI, M. Z. **Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- BERNARDINI, F. **Eficiência de quitinas e quitosanas na remoção de amônia total de efluentes aquícolas.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.
- BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA.** Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2009.
- BOMFIM, P. K. S. **Desenvolvimento de Implantes Dentários por Técnicas de Metalurgia do Pó.** Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BUENO, C. Z. et al.. Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. In: SOUZA, H. C.; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. (Ed.) **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados.** Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015. p. 67 – 110.
- BUTLER, M. F.; YIU-FAI, N. G.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**. v. 41, p. 3941 – 3953, 2003.

CARVALHO, S. M. S. **Carboximetilquitosana/Colágeno para utilização como preenchedor cutâneo.** Tese (Doutorado em ciência e engenharia de materiais) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.

CARDOSO, M. J. B. et al. Ensaio Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 1, p. 1 - 6, 2012.

CARANGE, R. F.; RIGO, E. C. S. **Estudo do efeito do método de reticulação com glutaraldeído em membranas de gelatina/quitosana para fins de RTG.** In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 22. 2014.

CAMARGO, L. G. **Desenvolvimento de Membranas Mucoadesivas Compostas por Diferentes Proporções de Quitosana e Alginato para a Liberação Controlada do Fármaco Antineoplásico Imiquimode.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CARRILLO-OCAMPO, D.; BAZALDÚA-GÓMEZ, S.; BONILLA-BARBOSA, J. R.; ABURTO-AMAR, R.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. **Molecules**. v. 18, p. 12109–12118, 2013.

CAI, L.; LI, R.; TANG, W.; MENG, G.; HU, X.; WU, T. Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus – pituitary – adrenal axis. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, p. 1332–1341, 2015.

CESCONETO, F. R. **Preparação de Membranas de Quitosana/Poli (vinil álcool) / Poli (β-hidroxibutirato) e Aditivos para Aplicação na Engenharia de Tecidos.** Florianópolis, 2009.

CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med**. v. 19, n. 2, p. 889-898, 2008.

CONVENÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento -Rio-92. **Revista Estudos Avançados**, v. 6, n. 15, p. 193-223, 1992.

COELHO, V. P. D. M.; AGRA, M. D. F.; BARBOSA, M. R. D. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Rev. bras. Farmacogn**. v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

COSTA, D. B. **Estudo da utilização de filmes de quitosana como conservante de sumos.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2015.

CRUZ, J. B. et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. **Revista Matéria**. v.21, n.1, p. 129 – 140, 2016.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para aplicação na regeneração de pele.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Campinas – SP, 2005.

DI MARTINO et al., Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burstreduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p. 613–624, 2017.

EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. v. 28, p. 397-409, 2013.

ERNESTO, J. et al.. **Curativos de Quitosana Nanoestruturados com Epicloridrina: Avaliação Biológica, Física e Físico-Química**. In: Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 9, Foz do Iguaçu, 2016.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FENG, Q.; CAO, H.; XU, W.; LI, X.; REN, Y.; DU, L. Apoptosis induced by genipin in human leukemia K562 cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase in G /M arrest. **Acta Pharmacol Sin**, v. 32, p. 519–527, 2011.

FIAMINGO, A. **Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas de Membranas porosas de Carboximetilquitosana e Hidrogéis de Quitosana para aplicação em Engenharia de Tecidos**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

FIDÉLES, T. B. et al.. Evaluation of Ionic Crosslinked Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. **Journal of Chitin Chitosan Science**. v. 1, n. 3, 2013.

FONSECA, M. G. D.; BIANCHI, C. STALLIVIERI, F. **Biotecnologia no Brasil: Uma Avaliação do seu Potencial Empresarial e Industrial**. n. 13. SENAI: Brasília, 2010.

FRANGO, P. B. **Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Quitosana e Casca de Banana verde para Cicatrização de Feridas Cutâneas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

FURTADO, G. T. F. S. **Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

GIL, C. S. B. **Materiais a base de colágeno com capacidade de autorreparo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, de Materiais e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, 2013.

GONSALVES, A. A. et al.. Diferentes Estratégias para a Reticulação de Quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215 – 1223, 2011.

GRANATO, A. E. C. et al.. **Avaliação da Citotoxicidade de Membranas de Quitosana em Cultura de Células**. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, IX Encontro Latino Americano de Pós Graduação e III Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Junior; São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2009.

HARRIS, M. I. **Pele, Estrutura, Propriedades e Envelhecimento**. Editora SENAC. São Paulo, 2009.

HAMERSKI, L.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M. et al. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). **Phytochemistry**. v. 63, p. 397-400, 2003.

HARADA, T. N. **Correlação entre os Ensaios de Citotoxicidade em *Artemia Salina* Leach e Atividade Antineoplásica Sobre Linhagens de Células Tumorais Para Algumas Classes de Produtos Naturais**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

HUTMANCHER, D. W.; Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529 – 2543, 2000.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, 2009.

KOUCHAK, M.; HANDALI, S.; BOROUJENI, B. N. Evaluation of the Mechanical Properties and Drug Permeability of Chitosan/Eudragit RL Composite Film. **Osong Public Health and Research Perspectives**. v. 6, n. 1, p. 14-19, 2015.

KRATTIGER, A. F. Public-private Partnerships for Efficient Proprietary Biotech o Management and Transfer, and Increase Private Sector Investments". **IP Strategy Today**, n. 4, p. 42, 2002.

LANDUCI, M. C. **Caracterização das Propriedades Mecânicas de Biomateriais Metálicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Bauru, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.

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

LEE, G-H.; LEE, M-R. LEE, H-Y.; KIM, S. H.; KIM, H-K.; KIM, H-R. et al. Eucommia ulmoides Cortex, Geniposide and Aucubin Regulate Lipotoxicity through the Inhibition of Lysosomal BAX. **PLoS One**. v. 9, e. 2, p. e88017, 2014.

LEE, S-W.; LIM, J-M.; BHOO, S-H.; PAIK, Y-S.; HAHN, T-R. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. **Anal Chim Acta**, v. 480, p. 267-274, 2003.

MANSNUR, H. S.; JUNIOR, E. S. C. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

MACÊDO, M. O. C. et al.. Avaliação da Modificação de Membranas de Quitosana Tratadas por plasma de Hidrogênio para Aplicações Biomédicas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 29, n. 1-2, p. 31-36, 2010.

MACÊDO, M. O. C. et al.. Caracterização de Membranas de Quitosana Tratadas Por Plasma de Diferentes Gases. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 21. **Anais...** Cuiabá, 2014.

MEDEIROS, L. A. D. M. et al.. Esferas de quitosana/D. ambrosioides (mastruz) para aplicação como biomaterial. **Revista Brasileira de Odontologia**. v. 73, n. 2, 2016.

MOGOŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Int. J. Pharm.** v. 463, n.2, p. 127 - 136, 2014.

MORALES, G.; PAREDES, A. Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2014.

MOURA, M. J. C. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis de Quitosano para Administração por Via Injetável**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 1-9, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A.; MEHTEDI, M. E.; BOTTEGONI, C.; AQUILI, A.; GIGANTE, A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. **Mar Drugs**, v. 13, p. 7314-7338, 2015.

OLIVEIRA, V. M. et al. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 2, p. 70 - 82, 2017.

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. Valorização de Resíduos Sólidos: Casca de Ovos como Matéria-Prima no Desenvolvimento de Novos Produtos. In: international workshop advances in cleaner production, 2. **Anais...** São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, R. A. et al.. **Síntese e caracterização de compósito quitosana com carbonato de cálcio extraído de casca de ovo para possíveis aplicações como curativo**. In: Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia da UEPB, 1. Campina Grande, 2012.

OLIVEIRA, S. H. S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Rev Esc Enferm USP**, v. 44, n. 2, p. 346-351, 2010.

PAIVA, D. L. et al. **Introdução a espectroscopia**. Tradução de Paulo Sérgio Santos. 4ª ed. CENGAGE Learning, 2010. 708 p.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PITT, F. D.; BOING, D.; BARROS, A. A. C. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis. **Revista da UNIFEPE**, v. 1, n. 09, 2011.

PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 1, p. 65-74, 2013.

RAABE, J.; MENEZZI, C. D.; GONÇALVEZ, J. Avaliação da Superfície de Lâminas Decorativas de Curupixá (*Micropholis venulosa* Mart. Eichler). **Floresta e Ambiente**. vol. 24, 2016.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press: Oxford, 2013.

RAMOS-DE-LA-PEÑA, A. M.; RENARD, C. M. G. C.; WICKER, L.; MONTAÑEZ, J. C.; GARCÍA-CERDA, L. A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Ultrasonics Sonochemistry Environmental friendly coldmechanical/ sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). **Ultrason Sonochem.** V. 21, ed. 1, p. 43-49, 2014.

REZENDE, C. A. et al. Membranas de Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) como Curativos para Pele: Degradação In Vitro e In Vivo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.

RENHE I. R. T.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, F. F.; OLIVEIRA, T. V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 649-652, 2009.

REZENDE NETO, J. M. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de Genipa americana L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

RIGO, E. C. S.; HABITZREUTER, F. **Avaliação das Características Físico-Químicas e Citotóxicas de Membranas de Gelatina/Quitossana com Hidroxiapatita Obtidas por Precipitação In Situ.** In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 60, Águas de Lindóia, 2016.

SANTANA, M. F. E. et al. Gestão do Conhecimento Científico e Tendências Científicas em Biotecnologia na Venezuela. **Revista CTS.** v. 7, n. 21, p. 45-62, 2012.

SAMPAIO, G. Y. H. et al. **Arcabouços Biodegradáveis de Quitossana: Efeito da Reticulação com Genipina.** In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 7, 2012.

SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitossana-gelatina e quitossana-colágeno visando a liberação de fármacos.** Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SILVA, M.C. et al. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitossana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. **Revista Matéria**, v. 21, n. 03, p. 560-568, 2016.

SMANIOTTO, T.; RIGO, E. C. S. **Caracterização Físico-Química de Membranas de Gelatina/Quitossana Reticuladas e Neutralizadas.** In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 22. 2014.

SOUZA, R. F. B. **Membranas de Quitossana Complexada com Alginato e Xantana: Comportamento na Presença de Diferentes Proporções de Água e Incorporação de Eritromicina.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Campinas – SP, 2014.

TAKAMIYA, A. S. **Avaliação da resposta tecidual e da citotoxicidade de soluções coloidais de nanopartículas de prata.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

TOMAZ, A. F. **Desenvolvimento de membrana de quitossana/1,4 naftoquinona para liberação controlada: curativo para feridas oncológicas.** Tese (Doutorado em engenharia

de processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.

TRINDADE, L. C. et al.. Biofilme Gelatina/Quitossana: Preparação e Caracterização. In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 11. **Anais...** Campos do Jordão, 2011. p. 4877 – 4882.

VELÁSQUEZ, C. L.; RIVAS, A.; OCANTO, I. S. Obtención de genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano. **Avances en Química**. v. 9, n. 2, p. 75-86, 2014.

VENDITTI, A.; SERRILLI, A. M.; BIANCO, A. Iridoids from *Bellardia trixago* (L.) All. **Nat Prod Res**. v. 27, p. 1413-1416, 2013.

WADE JR., L. G. **Química Orgânica**. v. 1, ed. 7. Pearson Educación: México, 2011.

WANG, X. S.; WU, Y. F.; DAI, S. L.; CHEN, R.; SHAO, Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. **Ultrason Sonochem**, v. 19, p. 1155-1159, 2012.

WISHART, D. S. et al. HMDB0035830. **HMDB 4.0: The Human Metabolome Database for 2018**. *Nucleic Acids Res*. 2017.

WINOTAPUN, W.; OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 53, e. 2, p. 92–96, 2013.

YUAN, Y.; LEE, T. R. **Contact angle and wetting properties**. In: Bracco G, Holst B, editors. *Surface sciences techniques*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.