

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MINERALIZAÇÃO IN VITRO DE HIDROGÉIS
QUITOSANA:COLÁGENO:GELATINA RETICULADOS COM EXTRATO
DE SEMENTE DE UVA

Pedro Henrique Damada

São Carlos,
2016

PEDRO HENRIQUE DAMADA

***MINERALIZAÇÃO IN VITRO DE HIDROGÉIS
QUITOSANA:COLÁGENO:GELATINA RETICULADOS COM EXTRATO
DE SEMENTE DE UVA***

**Monografia apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo, como um
dos requisitos para obtenção do título de Bacharel
em Química.**

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

**São Carlos,
2016**

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Luciane Damada, por toda dedicação, carinho e amparo e os quais sempre apoiaram os meus estudos.

A minha irmã, Gabrieli Damada, pelos conselhos e apoio.

A Profa. Dra Ana Maria de Guzzi Plepis, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, aprendizagem e amizade.

A Dra Virginia da Conceição Amaro Martins, por todo apoio, dedicação e cooperação durante toda a realização deste trabalho, pelo conhecimento transmitido e pela amizade.

Aos amigos de Grupo de Biomaterias e Bioquímica pelo companheirismo e pelos bons momentos, que contribuíram para criar um ambiente agradável.

Ao pessoal do CAQI pelas análises feitas, em especial ao Aldimar Tadeu Jesuino Constante e ao Dr. Márcio de Paula.

Ao Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro e a Dra. Ana Paula Garcia Ferreira pelas análises de Termogravimetria e a Profa. Dra. Maria Teresa do Prado Gambardella pela análise de Difração de Raio-X.

Ao RUSP/PIBIC pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Hidrogéis podem ser definidos como redes macromoleculares hidrofílicas capazes de absorver grandes quantidades de água e outros fluidos. Diversos polímeros hidrofílicos, como o colágeno e a quitosana, podem ser utilizados para a preparação de hidrogéis, os quais, por sua vez, podem ser aplicados em várias áreas como alimentícia e farmacêutica. Hidrogéis têm sido amplamente estudados no campo de regeneração tecidual, principalmente, para o tecido ósseo, atuando como uma alternativa ao enxerto. Este trabalho visa a preparação de hidrogéis colágeno:quitosana:gelatina com e sem extrato de semente de uva, e subsequentemente a mineralização *in vitro*. A quitosana foi preparada por meio da desacetilação alcalina da quitina, polissacarídeo obtido a partir de gládios de lula (concha interna) e dissolvida em ácido acético. A solução de gelatina foi preparada a partir de gelatina comercial dissolvida em água, a gelificação ocorreu pelo aquecimento da solução. O colágeno aniônico foi obtido a partir do tratamento do tendão bovino com uma solução alcalina contendo sais (Cl^- e SO_4^{2-}) de K^+ , Na^+ e Ca^{++} , por 24 h. O colágeno na forma de gel foi obtido por meio da extração utilizado uma solução de HAc. Os hidrogéis foram preparados pela mistura de colágeno:quitosana:gelatina (C:Q:G) na proporção de 1:1:1, e então divididos em duas porções de massas iguais, em uma das porções foi incorporado o extrato de semente de uva, o que gerou as amostras CQGE e CQG. A mineralização foi realizada pelo método da Imersão Alternada, os hidrogéis foram mineralizados, 1, 2 e 6 vezes e então, congelados e liofilizados. A quitosana foi caracterizada por meio da titulação condutivimétrica, espectroscopia na região do ultravioleta e do infravermelho e viscosimetria capilar, através das duas primeiras técnicas foi possível obter o grau de acetilação e por meio da espectroscopia do infravermelho foram observadas as principais bandas para identificar a quitosana como 1563 cm^{-1} (amida II) e 1263 cm^{-1} (amida III). Foi possível verificar diferentes temperaturas de desnaturação para o colágeno nas amostras (DSC), sendo possível observar a reticulação do colágeno pelo extrato. Os hidrogéis mineralizados foram caracterizados por TG, MEV, EDX e Difração de Raio-X. Por meio do TG, verificou-se uma pequena diferença em relação ao teor de fosfato de cálcio formado nos hidrogéis com e sem extrato de semente de uva, por meio do MEV, a mineralização se deu preferencialmente no interior dos hidrogéis com extrato. Os espectros de EDS e difratogramas de Difração de Raios-X, mostraram que o fosfato de cálcio formado durante o processo de mineralização corresponde à hidroxiapatita deficiente em cálcio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitina.....	11
Figura 2 – Fotografia digital de um gládio de lula.	12
Figura 3 - Estrutura química da quitosana.....	13
Figura 4 – Estrutura de uma cadeia α do colágeno.	14
Figura 5 - Esquema da formação da fibra de colágeno.	15
Figura 6 – Esquema da desnaturação do colágeno.....	16
Figura 7 - Estrutura química do (a) flavan-3-ol e (b) flavan-3,4-diol.	17
Figura 8 - Fluxograma para a obtenção da quitosana.....	21
Figura 9 - Método de Imersão Alternada.	23
Figura 10 - Espectro no infravermelho da quitosana.....	28
Figura 11 - Condutividade da solução de quitosana vs. volume de NaOH.....	29
Figura 12 - η_{red}/C vs. Concentração da solução de quitosana.	31
Figura 13 - Hidrogéis mineralizados (A) CQG6 e (B) CQGE6.....	31
Figura 14 - Curvas DSC para: (—) CQGE e (—) CQG.....	32
Figura 15 – Espectro na região do infravermelho para: (—) CQG e (—) CQGE.....	33
Figura 16 – Espectro na região do infravermelho da gelatina (—) e colágeno (—).	33
Figura 18 - Curvas termogravimétricas para hidrogéis: (—) CQG; (—) CQG1; (—) CQG2; (—) CQG6; (—) CQGE; (—) CQGE1; (—) CQGE2 e (—) CQGE6.....	35
Figura 19 - Massa residual (%) vs. ciclo de mineralizações (M) para: (■) CQGM e (■) CQGE6.....	36
Figura 20 - Fotomicrografias dos hidrogéis não mineralizados das superfícies (A) CQG e (C) CQGE. Aumento de 1.000x. Das secções transversais (B) CQG e (D) CQGE. Aumento de 200x.	37
Figura 21 - Fotomicrografias dos hidrogéis: nas superfícies (A) CQG2 e (C) CQGE2. Aumento de 1000x. Nas secções transversais (B) CQG2 e (D) CQGE2. Aumento de 100x...	38
Figura 22 - Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis: (A) CQG6 e (C) CQGE6. Nas secções transversais (B) CQG6 e (D) CQGE6. Aumento de 1.000x.	39
Figura 23 - Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis: (A) CQG6 e (B) CQGE6. Aumento de 10.000x.	39
Figura 24 - Espectro de difração de Raio-X dos hidrogéis mineralizados: (A) CQG6 e (B) CQGE6.	40
Figura 25 - EDS dos hidrogéis: (A) CQG6 e (B) CQGE6.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação Ca/P para diferentes tipos de fosfato de cálcio.	18
Tabela 2 - Grau de acetilação da solução de quitosana	29
Tabela 3 - Valores da razão η_{red}/C pra soluções de quitosana de diferentes concentrações....	30
Tabela 4 - Números de onda e modos de vibração para os hidrogéis CQG e CQGE.	32
Tabela 5 - Números de onda (cm^{-1}) e modos de vibração para o colágeno e a gelatina.....	34
Tabela 6 - Porcentagens de massa residual obtidos a 750 °C dos hidrogéis.....	35
Tabela 7 - Valores médios da relação Ca/P dos hidrogéis em estudo.	42

ABREVIACÕES

Ca/P: razão cálcio e fósforo

CQG: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina sem mineralizar

CQGE: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina sem mineralizar com extrato de semente de uva

CQG1: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado uma vez

CQGE1: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado uma vez com extrato de semente de uva

CQG2: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado duas vezes

CQGE2: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado duas vezes com extrato de semente de uva

CQG6: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado seis vezes

CQGE6: hidrogel colágeno:quitosana:gelatina mineralizado seis vezes com extrato de semente de uva

DSC: calorimetria diferencial de varredura

EDS: espectroscopia de energia dispersiva

HA: hidroxiapatita

MEV: microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

RESUMO	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
ABREVIACÕES	7
SUMÁRIO.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Quitina	11
1.2. Quitosana	12
1.3. Colágeno e Gelatina.....	14
1.4 Extrato de Semente de Uva.....	17
1.5 Mineralização.....	18
2 OBJETIVOS	20
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1 Quitosana	21
3.1.1 Obtenção	21
3.1.2 Purificação.....	22
3.2 Colágeno	22
3.3. Gelatina.....	22
3.4. Preparação dos Hidrogéis	23
3.5. Ensaio de Mineralização	23
3.6 Caracterização.....	24
3.6.1 Materiais.....	24
3.6.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	24
3.6.1.2 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia na Região do Ultravioleta.....	24

3.6.1.3 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Titulação Condutimétrica	24
3.6.1.4. Determinação da Massa Molar Média da Quitosana por Viscosimetria Capilar	25
3.6.1.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	26
3.6.2 Hidrogéis	26
3.6.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)	26
3.6.2.2 Termogravimetria.....	26
3.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.6.2.4 Difração de Raio-X	27
3.6.2.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Caracterização da Quitosana.....	28
4.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	28
4.1.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV).....	29
4.1.3 Titulação Condutimétrica.....	29
4.1.4 Viscosimentria Capilar.....	30
4.2 Caracterização dos Hidrogéis	31
4.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	31
4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	32
4.2.3 Termogravimetria.....	34
4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
4.2.5 Difração de Raio-X	40
4.2.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	41
5 CONCLUSÃO.....	43
6 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Biomaterial pode ser qualquer tipo de material, de origem natural ou sintética, que pode ser implementado para restaurar ou até mesmo substituir tecidos e órgãos no corpo. Podem ser classificados de acordo com a sua composição como metálicos, cerâmicos e poliméricos (Lavik e Langer, 2004). Para que possam ser aplicados devem apresentar diversos requisitos, entre eles, ser biocompatível, ou seja, não provocar nenhum tipo de reação, seja inflamatória, tóxica ou alérgica. Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* assim se tornam indispensáveis para verificar a biocompatibilidade de um biomaterial e indicar sua aplicação.

Hidrogéis são redes macromoleculares de polímeros e vem sendo bastante estudados para aplicação regenerativa, sua capacidade de absorver e manter grandes quantidades de água e fluídos, permeabilidade seletiva e boa biocompatibilidade explicam o interesse por este material (Baroli, 2007).

Uma grande diversidade de polímeros hidrofílicos estão sendo utilizados na construção de hidrogéis para serem aplicados em diversas áreas como alimentícia, farmacêutica e biomédica. O seu uso mais comum vem sendo em sistemas para liberação de fármacos e procedimentos de cicatrização. Dentre os polímeros mais utilizados para a confecção dos hidrogéis estão a quitosana, obtida a partir da desacetilação da quitina, e o colágeno, obtido a partir do tendão bovino, após um tratamento químico, uma das proteínas mais abundantes na natureza (Horn et al., 2009a).

A quitosana é comumente utilizada em procedimentos para regeneração de pele, uma vez que apresenta efeito antimicrobiano, biocompatibilidade e ainda estimula a proliferação celular (Zargar et al., 2015). O colágeno, assim como a quitosana promove a proliferação celular, é biodegradável e pode atuar como antígeno e assim promover a uma resposta no sistema imunológica para a produção de anticorpos. A gelatina, ao contrário do colágeno, apresenta antigenicidade muito baixa, porém tem alto poder de adesão celular e um alto nível de absorção pelo organismo. A gelatina, além disso, apresenta em sua estrutura grupos carboxílicos livres, os quais podem interagir com a quitosana por meio de ligações de hidrogênio e formar redes macromoleculares (Lien et al., 2009).

A mineralização se dá pela formação e depósito de fosfato de cálcio em diferentes matrizes. Matrizes mineralizadas de forma homogênea, constituindo estruturas resistentes, apresentam bastante interesse de pesquisas relacionadas a regeneração óssea, uma vez que podem ser uma alternativa a certos procedimentos como a enxertia. Dentre os diferentes

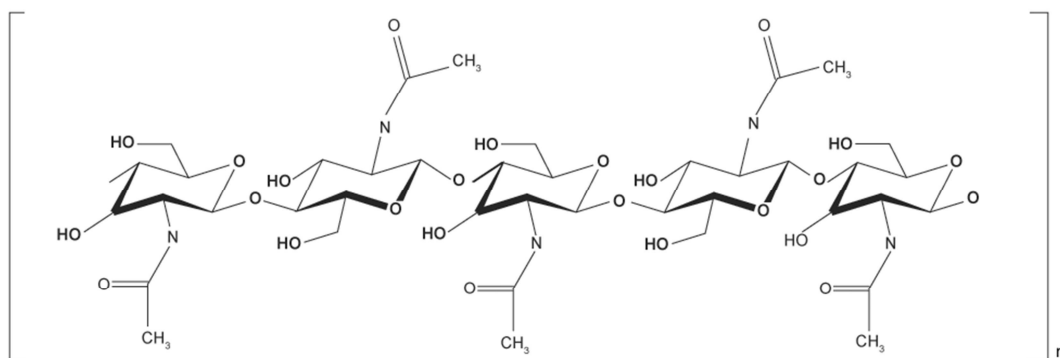
fosfatos de cálcio, se destaca a hidroxiapatita, por conta de sua composição e também ser biocompatível (Guastaldi e Aparecida, 2010).

1.1 Quitina

Trata-se de um polissacarídeo de grade abundância na natureza. É produzido por diferentes tipos de organismos vivos, sendo encontrado nos exoesqueletos de insetos e crustáceos, nas conchas de moluscos, e também na parede celular dos fungos (Mármol, et al., 2013). Este polissacarídeo, foi primeiramente isolado em 1811, pelo farmacêutico francês Henri Braconnot a partir de fungos, recebendo, então, o nome de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, pesquisador responsável por isolar, tal polissacarídeo, a partir da carapaça de insetos. Entretanto, somente depois de 1970 estudos sobre as propriedades e a empregabilidade da quitina iniciaram-se de fato, quando houve um maior interesse, principalmente, por parte da indústria (Dias et al., 2013).

Estruturalmente, a quitina apresenta uma cadeia linear formada por diversas unidades repetidas de N-acetil-2-deoxi-D-glicopirranose são unidas por meio de ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) como mostrado na Figura 1, essas ligações são estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares (Zargar et al., 2015).

Figura 1 - Estrutura química da quitina.

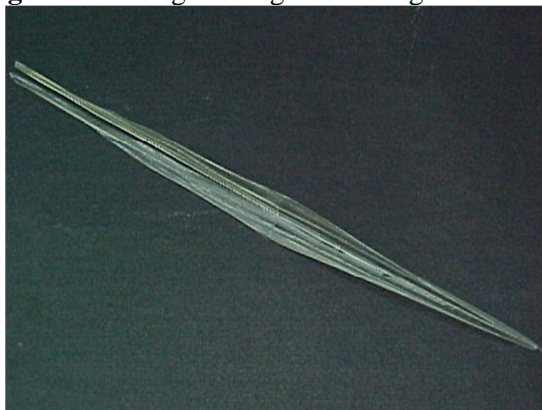


Fonte: Adaptado de Borgognoni et al., 2006.

A quitina apresenta uma estrutura cristalina polimórfica e existem três diferentes formas: α , β e γ -quitina, sendo as duas primeiras as mais conhecidas e α -quitina a mais estável (Antonino, 2007). A α -quitina é encontrada em estruturas que apresentam rigidez e resistência, normalmente, associadas com proteínas e compostos inorgânicos, já as formas β - e γ -quitina aparecem em estruturas flexíveis e também resistentes. Nas lulas do gênero *Loligo*, α e γ -quitina aparecem no estômago e o esôfago, enquanto que a β -quitina é encontrado nos

gládios (parte interna do molusco), mostrados na Figura 2, cerca de 50% dessa estrutura é constituída por esse polissacarídeo (Campana-Filho et al., 2007).

Figura 2 – Fotografia digital de um gládio de lula.



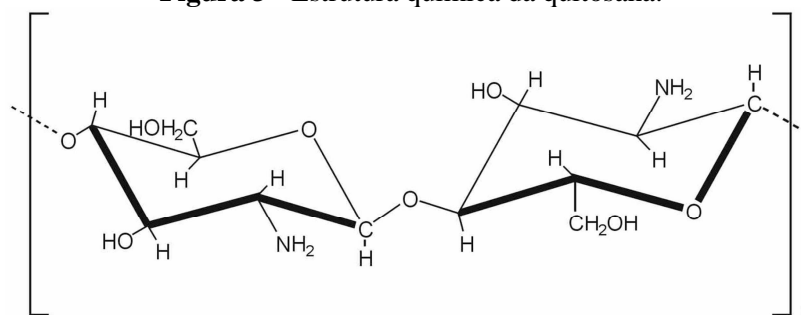
Quanto a solubilidade, o polissacarídeo é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, o que restringe o seu uso em diversos procedimentos (Laranjeira e Fávere, 2009).

Quitina é empregada na indústria alimentícia para imobilização de enzimas. Na indústria farmacêutica, o polissacarídeo é utilizado para procedimentos de cicatrização e liberação de fármacos (Rinaudo, 2006).

1.2. Quitosana

A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. Na reação de desacetilação da quitina, os grupos acetamida são convertidos a grupos amino por meio da hidrólise, resultando em uma estrutura (Figura 3) formada pela repetição das unidades 2-amino-2-deoxi-*D*-glicopirranose e *N*-acetil-2-deoxi-*D*-glicopirranose, as unidades são unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), e estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares (Zargar et al., 2015). O termo quitosana é empregado quando 50% ou valores acima, da cadeia polimérica é formada por unidades 2-amino-2-deoxi-*D*-glicopirranose.

O grau de acetilação médio (GA) indica a quantidade de *N*-acetil-2-deoxi-*D*-glicopirranose na estrutura do polímero, uma importante medida para verificar a eficiência do processo de desacetilação (Kumar, 2000). Existem várias maneiras para realizar o seu cálculo, neste trabalho, o grau de acetilação, por exemplo, foi determinado a partir da espectroscopia na região do ultravioleta e também por titulação condutimétrica.

Figura 3 - Estrutura química da quitosana.

Fonte: Janegitz et al., 2007.

As propriedades físicas e químicas da quitosana são determinadas pelo grau de polimerização, que está relacionado ao tamanho da cadeia, logo a massa molar. A massa molar da quitosana varia entre de $1,5 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^6$ Daltons e pode ser determinada por cromatografia líquida ou por viscosimetria, sendo o segundo método o mais simples (Damian et al., 2005).

Assim como a quitina, a quitosana é insolúvel em água e em solventes orgânicos, todavia, diferentemente da quitina, apresenta solubilidade em soluções ácidas com pH abaixo de 6, sendo os ácidos acético e fórmico os mais utilizados para a dissolução do composto (Damian et al., 2005). A solubilidade é explicada pela protonação do grupos amino que acarreta na formação de um polímero catiônico, além disso a protonação permite a quitosana atuar como um agente quelante (Azevedo et al., 2007).

A quitosana é de grande aplicabilidade em diversas áreas, no tratamento de água, pode atuar como agente floculante para clarificação de água e na eliminação de metais pesados (Alves et al., 2014). Na indústria alimentícia, pode contribuir para a clarificação de bebidas, como cerveja e suco de frutas, e também como um suplemento nutricional, já na agricultura, pode atuar como adubo e fungicida. Além disso, seu uso vem aumentando na indústria de cosméticos, principalmente em produtos direcionados ao cuidado do cabelo e cremes para o rosto (Zargar et al., 2015).

Na indústria farmacêutica e biomédica, a quitosana também é produto bastante atrativo, uma vez que é biodegradável, renovável, biocompatível e atóxico ao ser humano. Tal produto vem sendo empregado em membranas para liberação de fármacos, para promover cicatrização de ferimentos/lesões na pele, por exemplo, e também para regeneração de tecidos, principalmente, o osso, atuando como uma alternativa a enxertia, uma vez que a reação contrária do organismo é mínima e encapsulamento fibroso não é observado (Laranjeira e Fávere, 2009).

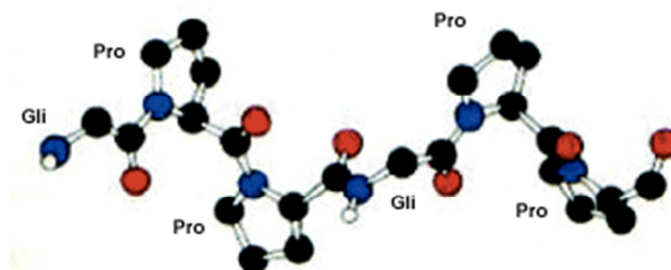
É conhecido também que a quitosana apresenta efeito antimicrobiano, todavia, o mecanismo de atuação é conflitante, existindo diversas teorias que tentam explicar tal efeito. A primeira teoria é que o grupamento amino, carregado positivamente, pode interagir com os componentes de carga negativa presentes na parede celular do microrganismo, e assim promover a lise da célula, outra teoria diz que a quitosana tem a capacidade de interromper o transporte de nutrientes, e provocar a morte da célula (Silva et al., 2006).

1.3. Colágeno e Gelatina

Colágeno é um termo utilizado para designar uma família de 29 proteínas fibrosas produzidas por células denominadas fibroblastos, e encontradas nos tecidos conjuntivos como cartilagens, tendões e pele. Representa 6% em peso do corpo humano e 25% da proteína total e é responsável por manter a integridade estrutural dos tecidos (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010).

Trata-se de uma molécula de 280 nm de comprimento e massa molar de aproximadamente $3,0 \times 10^5$ Daltons (Silva e Penna, 2012). A unidade fundamental do colágeno é o tropocolágeno, estrutura formada por três cadeias polipeptídicas helicoidais e dispostas de forma paralela em torno de um eixo. As cadeias recebem o nome de α e se enrolam entre si para formar uma hélice tripla, interações hidrofóbicas e eletrostáticas ao longo da estrutura são responsáveis por conferirem estabilidade e força tensora à molécula (Prestes, 2013). As cadeias α são formadas por uma sequência de unidades repetidas e constituídas por três aminoácidos, sendo um deles, a glicina (Gly), a estrutura é então descrita da seguinte maneira: $(\text{Gly-X-Y})_n$, na forma mais comum, X é prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp), entretanto X e Y pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos (Silva e Penna, 2012). A Figura 4 apresenta a estrutura molecular de uma cadeia α .

Figura 4 – Estrutura de uma cadeia α do colágeno.



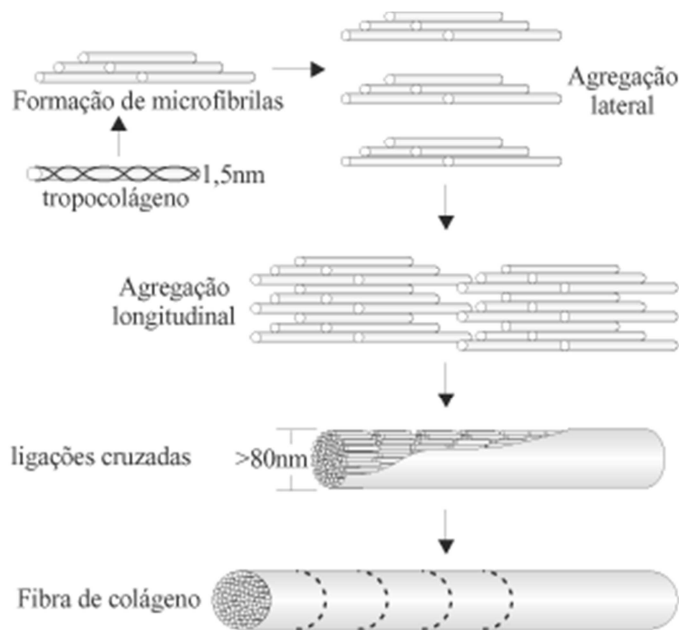
Fonte: Dornelles et al., 2003

Existem 19 diferentes tipos de cadeias α , quando associadas 3 a 3, dão origem a 29 diferentes tipos de colágeno, os mais comuns são: I, II, III e IV. Colágeno do tipo I é o de

maior abundância, e apresenta duas cadeias polipeptídicas iguais, $\alpha 1$ (1.055 resíduos de aminoácidos), e uma outra cadeia diferente, $\alpha 2$ (1.029 de resíduos de aminoácidos) (Silva, 2005).

As moléculas de colágeno podem formar agregados supramoleculares (Figura 5): a interação entre as moléculas do tropocolágeno leva a formação das microfibrilas, as quais podem se unir e formar as fibrilas, estas, por sua vez, se unem e formam as fibras (matriz colôgenica). As interações dependem da temperatura, pH e força iônica (Okuyama, 2008).

Figura 5 - Esquema da formação da fibra de colágeno.



Fonte: Chaudry et al., 1997

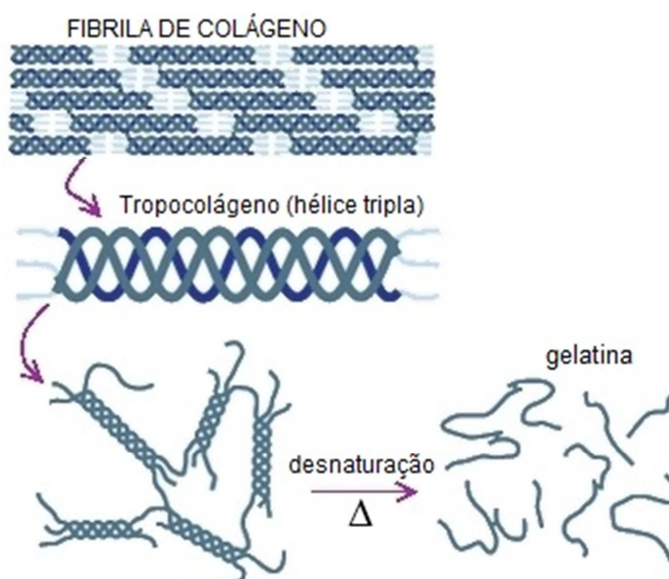
O colágeno é muito utilizado para a produção de biomateriais, podendo ser utilizado na forma nativa ou ainda na forma reconstituída, associado principalmente à reações de reticulação, cuja finalidade é aumentar sua biocompatibilidade assim como suas propriedades mecânicas. O uso na produção de biomateriais é explicada pela não-toxicidade, baixa resposta do sistema imunológico e também por promover o crescimento celular (Nair et al., 2010).

Para o colágeno do tipo I, a formação das fibras ocorre em pH maior que 6,0, o que infere que a resultante das cargas na molécula seja zero, correspondente ao colágeno nativo. Esta resultante pode ser alterada, por meio de processos químicos (Batista et al., 2009), físico-químicos ou enzimáticos, gerando um colágeno carregado positiva ou negativamente. O colágeno aniônico pode ser obtido por meio da hidrólise alcalina dos grupos carboxídeos dos resíduos de aminoácidos asparagina e glutamina presentes na cadeia α do tropocolágeno.

Essa hidrólise seletiva promove um aumento de até 134 cargas negativas por unidade de tropocolágeno, dependendo do tempo de reação (Bet et al., 2001).

A gelatina pode ser obtida a partir da desnaturação do colágeno (Figura 6), sendo bastante utilizada na indústria de alimentos como agente emulsificante. A principal propriedade da gelatina é formar soluções para produzir géis estáveis abaixo de 40 °C (Schrieber e Gareis, 2007).

Figura 6 – Esquema da desnaturação do colágeno.



Fonte: Adaptado de NITTA GELATIN INC., 2010.

As fontes de colágeno utilizadas para obtenção de gelatina são principalmente peles bovinas e suínas, ossos e tecidos conectivos. O processo de obtenção se dá por meio de tratamento químico, com a utilização de ácidos e bases, seguida por um extração com água quente, o resultado é uma solução viscosa (Schrieber e Gareis, 2007).

A gelatina pode ser classificada de acordo com a fonte de colágeno, gelatina do tipo A, é obtida a partir de peles bovinas e suínas e do tipo B, de ossos e tecidos conectivos. O que diferencia uma da outra é a massa molar e o ponto isoelétrico, gelatina do tipo A apresenta polipeptídios de baixa massa molar e ponto isoelétrico entre 7 e 9, enquanto que a do tipo B, polipeptídios de alta massa molar e ponto isoelétrico ente 4,5 e 5,5, soluções produzidas a partir deste tipo apresentam um maior grau de viscosidade (Damodaran et al., 2010).

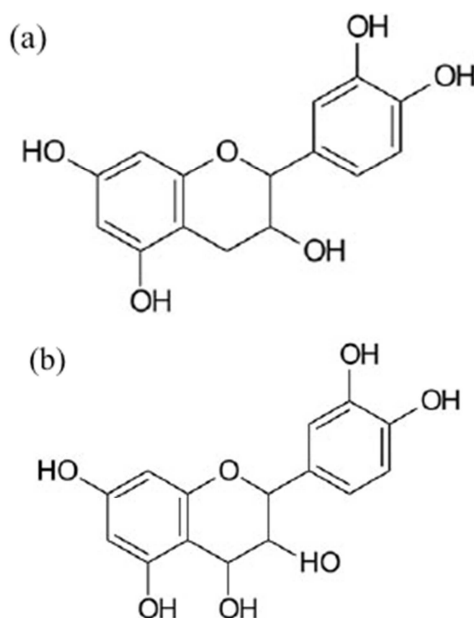
1.4 Extrato de Semente de Uva

O extrato de semente de uva pode ser obtido a partir da produção de vinhos e sucos de uva, como um subproduto, o qual desperta bastante interesse, principalmente, por conta das suas propriedades antioxidantes (Vedana et al., 2008). Os principais componentes do extrato são os taninos (proantocianidinas), os quais são de origem fenólica.

Taninos são muito reativos quimicamente e ainda formam ligações de hidrogênio (intra e intermolecular). São bastante suscetíveis a oxidação via enzimática ou influenciada por metais e podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados, de acordo com a estrutura química (Monteiro et al., 2005).

A proantocianidina, ou tanino condensado, apresenta como unidade monomérica o flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol. As unidades flâvanicas podem sofrer reações de hidrólise (ou substituição) e gerar uma imensa diversidade de estruturas. Isto permite dividir a proantocianidina em diversas classes, como procianidinas, prodelfinidas e propilargonidinas, as duas primeiras são as mais comuns e quando hidrolisadas geram cianidinas, sendo catequina e epicatequina as unidades formadoras e delfinidinas, a qual apresenta galocatequinas e epigalocatequinas como unidades formadoras (Sun e Spranger, 2005)

Figura 7 - Estrutura química do (a) flavan-3-ol e (b) flavan-3,4-diol.



Fonte: Angelo e Jorge, 2007.

Uma característica importante das proantocianidinas é sua capacidade de interagir com o colágeno e atuar como um agente reticulante. A interação acontece de forma estável por meio da formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas presentes nas proantocianidinas e os grupamentos amida do aminoácido prolina, constituinte do colágeno (Rotava et al., 2009)

Compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante, sendo redutores de oxigênio singlete, nas reações de oxidação lipídica e na quelação de metais e ainda apresentam propriedades farmacológicas, como antialergênicas, antiarteriogênicas, antiinflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas e também efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (Rockenbach et al., 2008).

1.5 Mineralização

O fosfato de cálcio é amplamente utilizado como biomaterial, devido a semelhança com a parte mineral dos ossos e dentes, biocompatibilidade, bioatividade, atoxicidade e osteocondutividade.

Dentre os diversos tipos de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é o material mais utilizado para reposição óssea, tratando-se de um material que não apresenta toxicidade local e sistêmica, ausência de respostas inflamatórias e facilidade ao se ligar no tecido hospedeiro. Porém seu uso está diminuindo, por conta do baixo índice de atividade e lenta taxa de degradação. Afim de se obterem melhores resultados, diversos estudos sobre diferentes fosfatos de cálcio estão sendo desenvolvidos (Guastaldi e Aparecida, 2010)

Os fosfatos de cálcio podem ser classificados de acordo com a relação Ca/P, as diferentes formas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação Ca/P para diferentes tipos de fosfato de cálcio.

Tipos de Fosfato de Cálcio	Fórmula	Relação Ca/P
Apatita carbonatada	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3$	1,67
HA deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	$1,50 < x < 1,67$
Monolita	CaHPO_4	1,00
Brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00
Hidroxiapatita	$\text{C}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato β tri cálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Octafosfato de cálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33

Fonte: Habraken et al., 2007

A síntese dos fosfatos de cálcio acontece por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Neste presente trabalho, utilizou-se o Método da Imersão Alternada para a mineralização *in vitro* dos hidrogéis. Métodos simples e baratos, sem uso de equipamentos especiais ou temperaturas elevadas são algumas vantagens da mineralização *in vitro* (Oliveira et al., 2009).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a preparação de hidrogéis colágeno:quitosana:gelatina, com e sem extrato de semente de uva como agente reticulante, visando a utilização futura destes em procedimentos de regeneração óssea. Para isso, materiais com mineralização homogênea, tanto internamente como externamente, são necessários. Essa mineralização visa a formação de hidroxiapatita, por conta das semelhanças com os constituintes dos ossos, e também pela biocompatibilidade e atoxicidade.

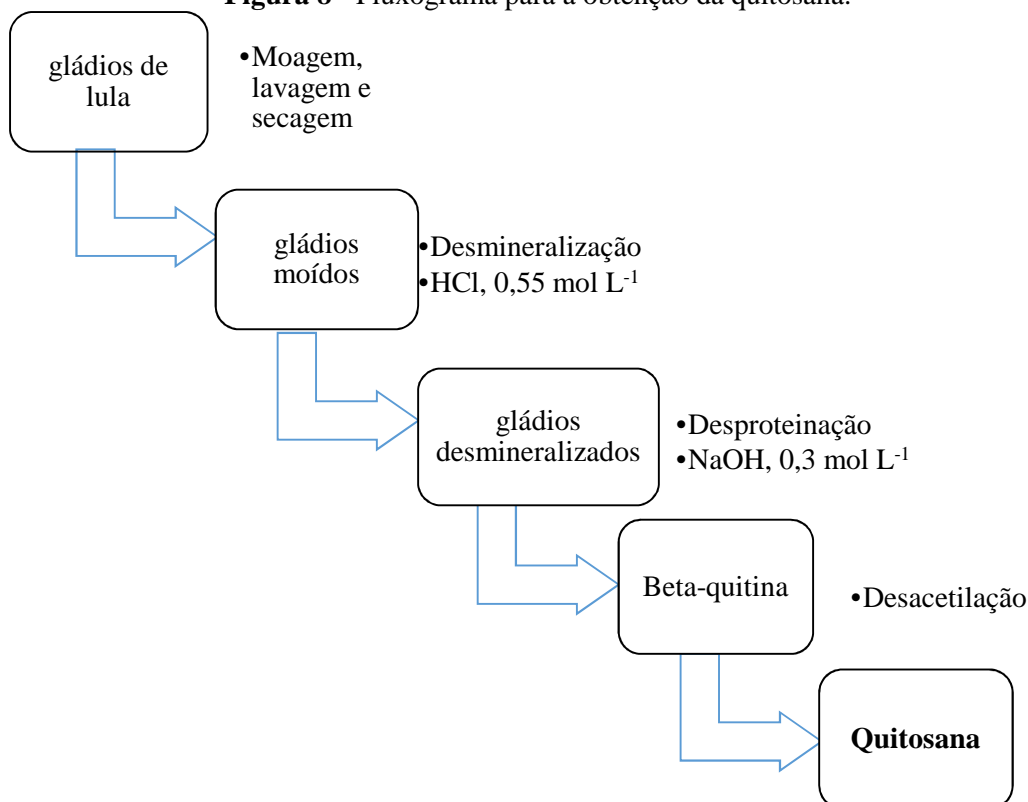
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Quitosana

3.1.1 Obtenção

Para a obtenção da quitosana, a partir dos gládios de lula, foram seguidas as seguintes etapas: desmineralização, desproteinação e desacetilação (Horn et al., 2009b), a Figura 8 destaca cada etapa. As duas primeiras tem como intuito extrair a β -quitina dos gládios de lula. Anteriormente a estas etapas o gládio de lula foi lavado, seco, triturado e então peneirado. Na primeira etapa foi preparada uma solução HCl 0,55 mol L⁻¹. Aproximadamente, 40 g de gládio de lula foram adicionados a esta solução na proporção de 1 g de gládio para 15 mL de HCl, a qual foi mantida sob agitação magnética por 2 h. Este processo foi repetido mais uma vez para garantir maior eficiência. Após este procedimento, a solução foi lavada com água desionizada durante 10 dias, até obter a neutralidade.

Figura 8 - Fluxograma para a obtenção da quitosana.



Antes de iniciar o processo de desproteinação, o material obtido foi colocado em uma estufa durante 1 semana a 40°C. Para realizar a segunda etapa (desproteinação), o sólido, agora seco, foi colocado em um balão de três bocas, juntamente com uma solução de

NaOH 0,3 mol L⁻¹, na proporção de 1 g de gládio para 10 mL da solução de NaOH, sob agitação mecânica e temperatura constante de 80°C durante 1h, sendo o processo repetido mais uma vez. Assim como na etapa anterior, o sólido foi lavado com água desionizada até a neutralidade.

O sólido, agora β -quitina, foi colocado na estufa durante 1 semana a 40°C. Por último, foi realizado a desacetilação. Para esta etapa, em um balão de três bocas foi colocada a massa de β -quitina com uma solução de NaOH 40% (massa/massa). O sistema foi deixado a temperatura de 80°C, sob agitação mecânica constante e em atmosfera de N₂ durante 1,5 h. O processo foi repetido mais uma vez. O material foi lavado até a neutralidade e então seco na estufa a 40°C durante 1 semana.

3.1.2 Purificação

A quitosana foi dissolvida em ácido HAc 0,5 mol L⁻¹ durante 24 h e sob agitação mecânica. A solução resultante foi filtrada sob pressão negativa através de uma membrana de porosidade 5 μ m. Em seguida foi adicionado hidróxido de amônio concentrado ao filtrado até a precipitação. O precipitado foi lavado com água desionizada até pH neutro, e logo após, lavado com metanol a temperatura ambiente e depois seco em estufa à 60°C durante 2 dias.

3.2 Colágeno

O gel de colágeno foi obtido a partir de tendão bovino por imersão em uma solução alcalina (hidrólise) por 24 h. Esta solução continha sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos (pH > 13). Após este período o material foi equilibrado em outra solução contendo sulfatos e cloretos dos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. O excesso de sais foi removido por meio de lavagens em 3% de solução de H₃BO₃, água desionizada, seguida por solução de EDTA 0,3% pH=11, e água desionizada. Após o procedimento de hidrólise, o colágeno foi extraído com solução de HAc pH = 3,5 (Bet et al., 2001), obtendo-se uma concentração final de 1,0% (massa/massa), determinada por liofilização em um equipamento EDWARDS modelo FREEZE DRYER Modulyo.

3.3. Gelatina

Foi preparada uma solução de gelatina 1% (massa/massa), adicionando gelatina comercial (SIGMA®, tipo A, pele suína) em água aquecida a 60°C, sob agitação constante, durante 30 min.

3.4. Preparação dos Hidrogéis

Para os hidrogéis foram preparados soluções de colágeno e quitosana 1% em HAc 1% (massa/massa). Estas duas soluções foram misturadas juntamente com a gelatina na proporção de 1:1:1 em massa. Esta mistura foi dividida em duas porções de massas iguais, em uma delas, foi adicionado, gota a gota, o extrato de semente de uva (10,4 mg) solubilizado em HAc:etanol (9:1), desta forma as amostras CQGE (hidrogel colágeno:quitosana:gelatina com extrato) e CQG (hidrogel colágeno:quitosana:gelatina) foram geradas. Os hidrogéis foram colocados em formas de Teflon® e então congelados e liofilizados.

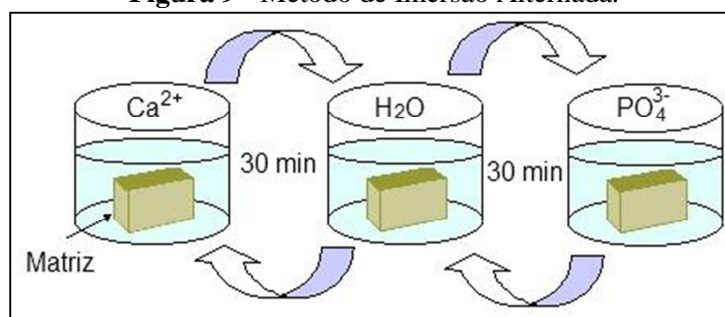
3.5. Ensaio de Mineralização

A mineralização foi realizada pelo método da Imersão Alternada, mostrado na Figura 9 (Batista et al., 2009). Neste método os hidrogéis, primeiramente, foram mergulhados, em uma solução de Na_2HPO_4 $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) em tampão tris $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e deixados nesta por 24h, esta parte foi feita para que o colágeno atingisse o pH da mesma, visto que o biopolímero se encontrava com pH ácido. Após este período, os hidrogéis foram, mergulhados em uma solução de CaCl_2 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,4), também em tampão tris $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, e deixados por 30 min, em seguida eles foram novamente colocados na solução de Na_2HPO_4 , também por 30 min. Este procedimento foi repetido mais 5 vezes a temperatura ambiente, gerando duas amostras (CQG6 e CQGE6).

Foram preparados também hidrogéis com 1 e 2 ciclos de mineralização, gerando as amostras CQG1 e CQGE1 e CQG2 e CQGE2, respectivamente.

Após a mineralização os hidrogéis foram congelados e liofilizados.

Figura 9 - Método de Imersão Alternada.



Fonte: Batista et al., 2009.

3.6 Caracterização

3.6.1 Materiais

3.6.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Amostras de colágeno, quitosana e gelatina foram preparadas na forma de filmes a partir de soluções diluídas dos polímeros secos sob fluxo de ar. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo IRAffinity-1 Shimadzu, software IR solution. Foram feitos 32 *scans* por espectro, com resolução de 4 cm⁻¹ no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.6.1.2 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Espectroscopia na Região do Ultravioleta

Foram preparadas três soluções com, aproximadamente, 6 mg de quitosana dissolvidas em 50 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ cada. As soluções permaneceram sob agitação até a completa dissolução do material. Após a dissolução, a absorbância para cada solução foi medida, o comprimento de onda utilizado foi de 201 nm e a solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ foi usada como branco. O grau de acetilação foi calculado pela equação:

$$GA = \frac{166,1 \times A \times V - 0,0218 \times m}{3,3615 \times m - 42,1 \times A \times V} \quad (1)$$

sendo **GA** o grau de acetilação médio da quitosana, **A** a absorbância, **V** o volume da solução em (L) e **m** a massa da quitosana (mg). Foi utilizado um espectrofotômetro HITACHI U-3000, em um intervalo de 150-220 nm, com cela de 1 cm de largura e fenda de 0,5 nm, com as leituras sendo feitas em triplicata.

3.6.1.3 Determinação do Grau de Acetilação da Quitosana por Titulação Condutimétrica

Foi pesado uma amostra de 0,25 g de quitosana (seca em estufa a 60°C durante 24 h), e em seguida misturada em 50 mL de uma solução de HCl 0,05 mol L⁻¹ sob agitação magnética constante, a agitação foi cessada quando a solução ficou límpida e transparente. A mistura obtida foi diluída para 250 mL com água desionizada. Quatro alíquotas de 50 mL foram tituladas, sob temperatura constante de 25°C, com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, previamente padronizada com solução de ácido oxálico (Raymond et al., 1993). A

condutividade foi medida por meio de um condutivímetro Gehaka CG2000. O procedimento foi realizado em duplicata. O grau de acetilação médio foi determinado pela equação:

$$GA = \left(1 - \frac{161 \times (V2 - V1) \times [NaOH]}{m}\right) \times 100 \quad (2)$$

sendo **GA (%)** o grau de acetilação médio da quitosana, **161** a massa molar média da unidade repetitiva da quitosana (g mol^{-1}), **(V2 - V1)** o volume de hidróxido de sódio necessário para neutralizar a quitosana (mL), **[NaOH]** a concentração de hidróxido de sódio (mol L^{-1}) e **m** a massa de quitosana presente na alíquota (g).

3.6.1.4. Determinação da Massa Molar Média da Quitosana por Viscosimetria Capilar

Uma amostra de 20,0 mg de quitosana foi adicionada em 25 mL de HAc $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética constante por 24 h. Em seguida foi adicionado 25 mL de NaAc $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se a agitação por mais 24 h. Foi preparado um tampão $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de HAc e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaAc em pH igual a 4,5. Soluções 1,0; 1,8; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ foram preparadas. Alíquotas de 10 mL de cada solução e também da amostra de quitosana em HAc e NaAc foram transferidas para um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde e o tempo de escoamento foi medido, por meio de um cronômetro digital, cada medida foi repetida 10 vezes. O experimento foi realizado em temperatura ambiente de, aproximadamente, 25°C (Rinaudo, 2006). Com a média dos valores de tempo obtidos e a concentração das soluções, foi determinada a viscosidade reduzida das soluções de quitosana, por meio da Equação 3.

$$\eta_{\text{red}} = \frac{t_{\text{qui}} - t_{\text{solv}}}{t_{\text{solv}}} \quad (3)$$

sendo η_{red} a viscosidade reduzida das soluções de quitosana, t_{quit} é o tempo médio (s) de escoamento de cada uma das soluções e t_{solv} é o tempo médio (s) de escoamento do solvente e c é a concentração (g mL^{-1}).

A partir dos dados de viscosidade reduzida e a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 4), foi determinada a massa molar média da quitosana.

$$[\eta] = K' \cdot M^\alpha \quad (4)$$

na qual $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}) da quitosana (obtida pela extrapolação da viscosidade reduzida para uma concentração nula de soluto), e **K** (mL g^{-1}) e **α** são constantes.

3.6.1.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Esta técnica permite medir certas propriedades físicas de alguns materiais quando submetidas ao calor podendo-se assim, neste trabalho, avaliar as modificações na temperatura de desnaturação do colágeno a partir do ponto médio da inflexão da curva. Em um cadinho hermético de alumínio foi colocado, aproximadamente, 9 mg das amostras e este foi prensado e colocado em um equipamento da TA – Instruments, modelo DSC 2010. A medida foi feita sob fluxo de N₂ a 80 mL min⁻¹, em uma faixa de temperatura de 25-120°C, com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

3.6.2 Hidrogéis

3.6.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

Para a obtenção dos espectros, as amostras foram dissolvidas em HAc 1% (massa/massa) e colocadas em pastilhas de silício. A análise foi feita em um intervalo entre 4000 - 400 cm⁻¹, utilizando-se um espectrofotômetro de FTIR IRAffinity-1 Shimadzu, software IR solution, sendo feitos 32 *scans* por espectro, com resolução de 4 cm⁻¹.

3.6.2.2 Termogravimetria

Assim como o DSC, a termogravimetria utiliza o calor para verificar os efeitos na amostra. Neste procedimento, 10 mg, de cada material, foram colocados no porta amostra de alumina sob atmosfera de ar sintético, com razão do aquecimento de 10°C min⁻¹, entre 25 e 800°C em um equipamento da TA Instruments modelo Q-50 do Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, do IQSC/USP, pela Dra. Ana Paula Garcia Ferreira, sob supervisão do Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro.

3.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias foram obtidas na superfície e secção transversal dos hidrogéis liofilizados com amostras coladas em *stubs* por fita condutora de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de 2,00x10⁻² mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm s⁻¹, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV.

Como as amostras não são condutoras, para se obter uma melhor visualização os materiais foram cortados transversalmente com a menor espessura possível, com o intuito de fazer com que corrente percorra todo o material.

3.6.2.4 Difração de Raio-X

Os difratogramas das matrizes mineralizadas foram obtidos em um difratômetro automático Rigaku-Rotaflex Ru-200B, com radiação monocromática de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) com potência de 50 kV, 80 mA, velocidade de varredura de 2° min^{-1} e 2θ entre $5 - 80^\circ$. Os difratogramas foram feitas pela Profa. Dra. Maria Teresa do Prado Gambardella no Grupo de Cristalografia do IQSC/USP. Por meio da difração de Raio-X foi calculado o tamanho do grão, através do uso da equação de Scherrer:

$$L_{002} = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (5)$$

sendo **K** uma constante relacionada ao formato do cristal, seu valor é próximo ao unitário, λ , o comprimento de onda da radiação do Raio-X (nm), β , o alargamento do pico de difração 002 medido pela metade de sua máxima intensidade, em radianos e θ o ângulo de difração de Bragg, em graus.

3.6.2.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Para a obtenção do espectro as amostras foram prensadas para assim serem colocadas no equipamento para análise. A análise de Energia Dispersiva (EDS) foi realizada em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um microscópio eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, “dead time” de 30 %, corrente de 2,82 A e I “probe” de 950 pA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gládios de lula, primeiramente, foram preparados e moídos, e um material com aspecto de flocos foi obtido, este foi submetido a alguns procedimentos, com o intuito de promover a desmineralização, desproteínização e desacetilação e assim obter a quitosana. A massa inicial era de 40 g.

Após a desmineralização, o sólido obtido foi seco em estufa e a massa obtida foi de 32,3 g, correspondendo assim a um rendimento de 80,7%. Na etapa seguinte a desmineralização, um sólido branco e fibroso foi obtido (β -quitina), a massa encontrada foi de 14,52 g, e o rendimento, 36,3%.

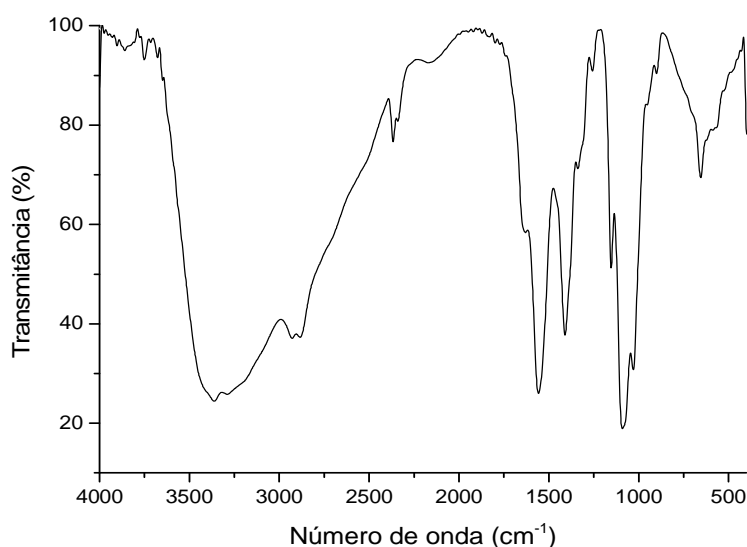
A quitosana foi, então, obtida por meio da última etapa, a desacetilação, e apresentou forma de flocos brancos duros. A massa foi de 10,81 g e o rendimento de 27,02%.

4.1 Caracterização da Quitosana

4.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Por meio da espectroscopia na região do infravermelho foi obtido um espectro (Figura 10), no qual foram observadas as seguintes bandas características para a quitosana: 3250 cm^{-1} (estiramento N-H); 1563 cm^{-1} (amida II - deformação N-H); 1430 cm^{-1} deformação axial -CN na amida; 1263 cm^{-1} (amida III - deformação C-N, CO-NH); 1152 cm^{-1} (C-O; C-O-C estiramento) e 653 cm^{-1} (deformação N-H fora do plano).

Figura 10 - Espectro no infravermelho da quitosana.



4.1.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV)

A quitosana apresenta dois grupos cromóforos, N-acetilglicosamina e glicosamina. Como estes grupos não interagem entre si, isto permite a determinação do \overline{GA} de uma forma simples e rápida.

Três soluções de quitosana em HCl, de mesma concentração, foram preparadas e a absorbância, na região do ultravioleta, medida, sendo que o comprimento de onda utilizado foi de 200 nm. Para o cálculo do \overline{GA} , foi utilizada a Equação 1 e os valores obtidos são apresentados na Tabela 2. O valor de \overline{GA} encontrado foi de $7,65 \pm 0,25\%$.

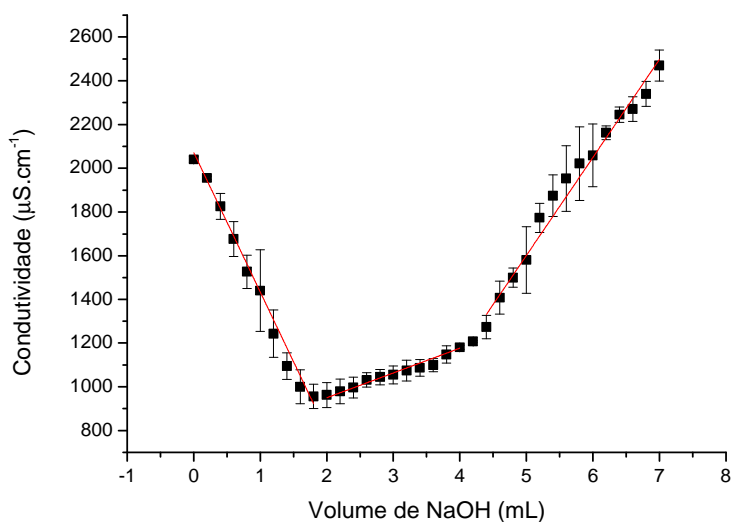
Tabela 2 - Grau de acetilação da solução de quitosana.

Amostra	Absorbância	GA (%)
1	0,2064	7,88
2	0,2059	7,71
3	0,2039	7,37

4.1.3 Titulação Condutimétrica

A condutividade da quitosana em HCl foi medida assim que o pH era alterado pela adição de NaOH. O resultado é apresentado na Figura 11. O procedimento foi feito em temperatura ambiente.

Figura 11 - Condutividade da solução de quitosana vs. volume de NaOH.



A primeira parte da curva, que é descendente, representa a neutralização do HCl (ácido forte) pela adição contínua da base, o que promove uma diminuição na condutividade, na segunda parte, é observada a neutralização da quitosana (ácido fraco) ocasionada pela desprotonação dos grupos amino, o que provoca um pequeno aumento na condutividade, a terceira e última parte da curva, apresenta um significativo aumento de condutividade, devido a adição de base em excesso.

Para o cálculo do \overline{GA} foi utilizado a Equação 2, e o valor encontrado foi de 6,90%. Para encontrar os valores de V1 (volume para neutralização total do ácido forte) e V2 (volume para neutralização total do ácido fraco), foi estabelecido para cada curva uma reta e consequentemente uma equação linear, a equação da primeira reta foi igualada com a da segunda, para obtenção de V1, e a equação da segunda reta, igualada com a da terceira reta, para obtenção de V2. Os volumes encontrados foram V1 = 1,8 mL e V2 = 4,1 mL.

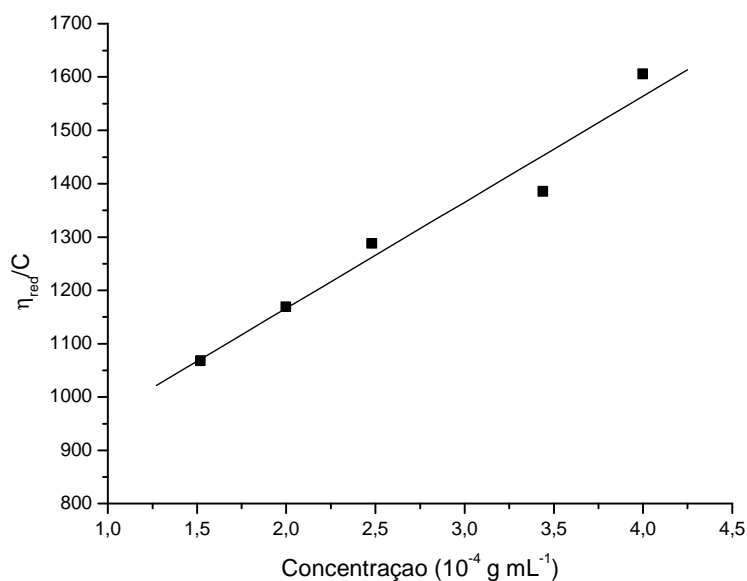
4.1.4 Viscosimetria Capilar

A viscosimetria capilar foi feita por medidas do tempo de escoamento de soluções de quitosana em de diferentes concentrações a temperatura ambiente. Com os valores de tempo medidos, calculou-se o valor de η_{red} para cada amostra por meio da Equação 3, e em seguida obteve-se os valores da razão η_{red}/C , os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores da razão η_{red}/C pra soluções de quitosana de diferentes concentrações.

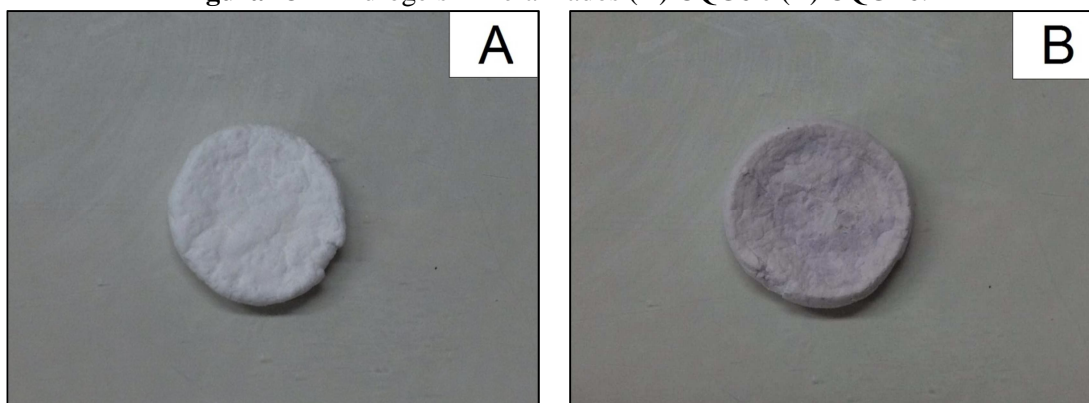
Conc. x 10^{-4} g mL ⁻¹	η_{red}	η_{red}/C
1,5	0,1788	1192,09
2,5	0,3370	1348,01
3,0	0,4483	1494,41
3,5	0,5257	1501,89
4,0	0,6416	1604,17

Para o cálculo da massa molar, primeiramente, foi construído um gráfico η_{red}/C vs. concentração, o qual é mostrado na Figura 12. Pela extrapolação da curva foi possível encontrar o valor da viscosidade intrínseca, $[\eta] = 952,3 \text{ mL g}^{-1}$. Este valor foi substituído na Equação 4 e a massa molar da quitosana foi determinada, sendo $2,55 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Figura 12 - η_{red}/C vs. Concentração da solução de quitosana.

4.2 Caracterização dos Hidrogéis

Na Figura 13 são mostrados os hidrogéis mineralizados seis vezes. O hidrogel sem extrato de semente de uva é de coloração branca e não quebradiço, característica também observada no hidrogel com extrato, o qual apresenta coloração rósea, graças a antocianina, pigmento presente na semente de uva.

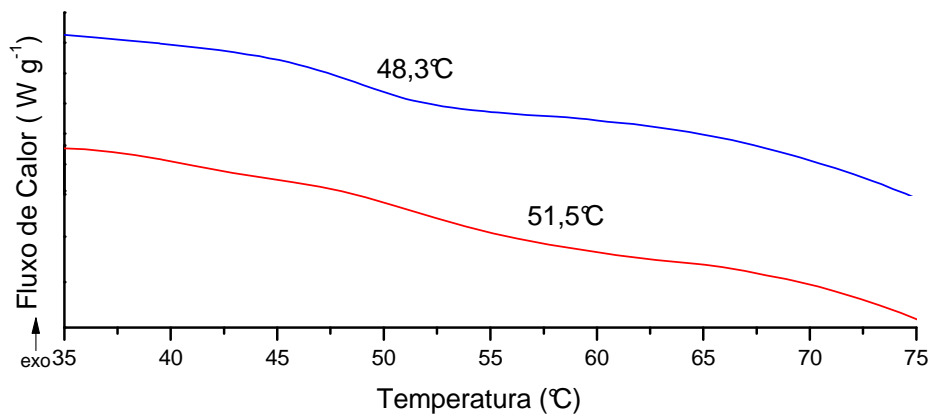
Figura 13 - Hidrogéis mineralizados (A) CQG6 e (B) CQGE6.

4.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Por meio do DSC verificou-se a influência do extrato de semente de uva na temperatura de desnaturação do colágeno, temperatura em que ocorre a transição do colágeno para gelatina. A passagem de uma forma organizada para uma desordenada se dá pela quebra das ligações intramoleculares. No hidrogel CQG a temperatura encontrada foi de 48,3°C,

enquanto que no hidrogel CQGE, foi de 51,5°C. Este aumento na temperatura de desnaturação mostrou que o extrato reticulou o colágeno. As curvas são apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Curvas DSC para: (—) CQGE e (—) CQG.



4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros obtidos por meio FTIR, para os hidrogéis mineralizados, apresentaram bandas em 3000 - 3500 cm^{-1} referente ao estiramento O-H e, além disso, bandas características para amida I, II e III, que são mostradas na Tabela 4.

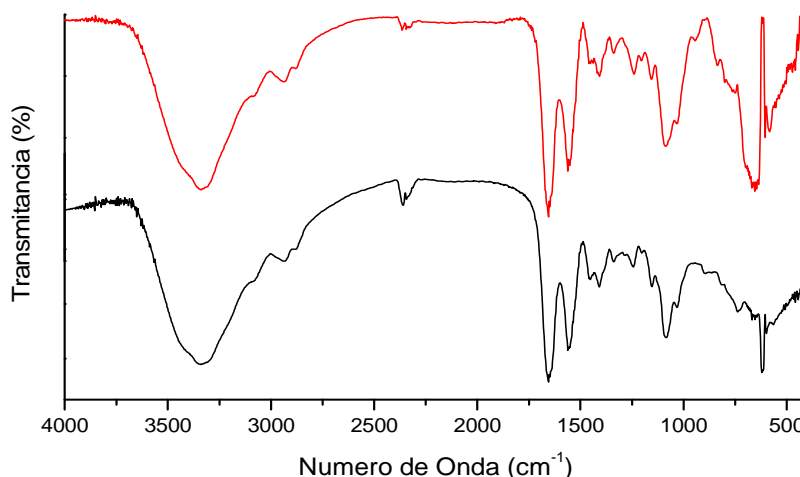
Tabela 4 - Números de onda e modos de vibração para os hidrogéis CQG e CQGE.

Modos de vibração	Número de onda (cm^{-1})	
	Hidrogel CQG	Hidrogel CQGE
amida I (estiramento C=O)	1654	1654
amida II (vibração do plano da ligação N-H e estiramento C-N)	1554	1560
amida III (estiramento C-N e deformação -NH)	1244	1240
estiramento O-H	3348	3334

Hidrogéis mineralizados também apresentam bandas referente ao grupo fosfato, normalmente, uma banda larga e centrada entre 1070 e 1090 cm^{-1} e outra com picos entre 604

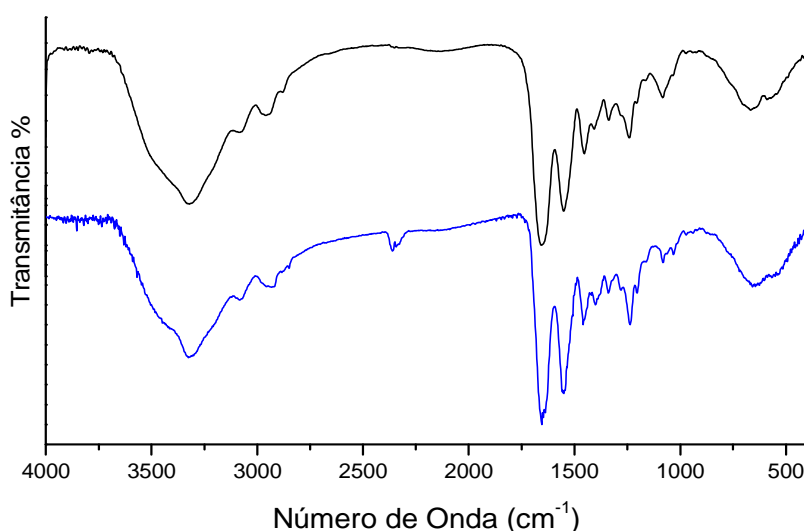
e 563 cm^{-1} . Verificando-se os espectros, Figura 15, não foi possível identificar a segunda banda, uma explicação para isto seria a formação de bandas múltiplas ocasionadas pela interação entre os íons do cálcio (Ca^{2+}) e os grupos $-\text{NH}_2$ presentes na quitosana e no colágeno e o grupo COO^- no colágeno. A primeira banda apareceu em 1082 cm^{-1} (CQG) e em 1083 cm^{-1} (CQGE).

Figura 15 – Espectro na região do infravermelho para: (—) CQG e (—) CQGE.



Nos espectros na região do infravermelho do colágeno aniônico e gelatina (Figura 16), assim como o da quitosana (Figura 10) não são observadas as bandas referentes ao grupo fosfato, sendo assim importantes para identificar a mineralização.

Figura 16 – Espectro na região do infravermelho da gelatina (—) e colágeno (—).



Na Tabela 5 são apresentadas as bandas e os modos de vibração para o colágeno aniônico e gelatina, e como pode se observar na Figura 16, são as mesmas.

Tabela 5 - Números de onda (cm^{-1}) e modos de vibração para o colágeno e a gelatina.

Modos de vibração	Número de onda (cm^{-1})	
	Colágeno	Gelatina
Amida I (estiramento da carbonila)	1652	1649
Amida II (vibração do plano da ligação N-H e estiramento da ligação C-N)	1550	1548
Amida III (vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e deformação -NH)	1238	1241
Estereoquímica dos anéis pirolidínicos	1456	1450
Estiramento O-H	3320	3319

4.2.3 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas foram feitas no intervalo de 25 à 800°C, para a quitosana, colágeno e gelatina e estão mostrados na Figura 17. Para os hidrogéis mineralizados ou não essas curvas estão mostradas na Figura 18.

Figura 17 – Curvas termogravimétricas para os biopolímeros: (—) Gelatina; (—) Colágeno e (—) Quitosana.

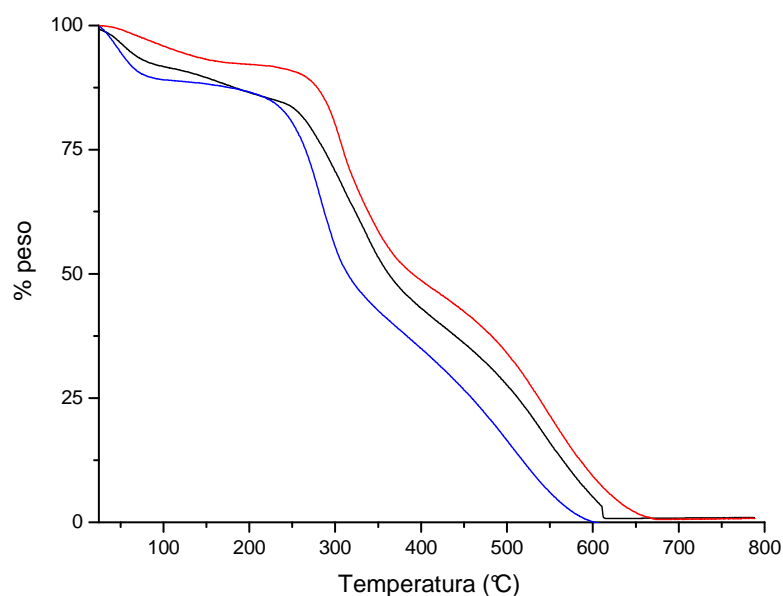
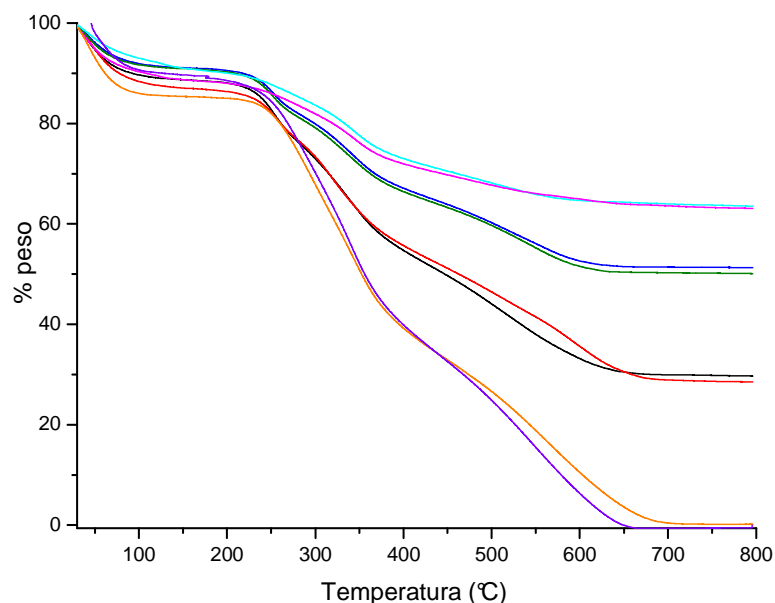


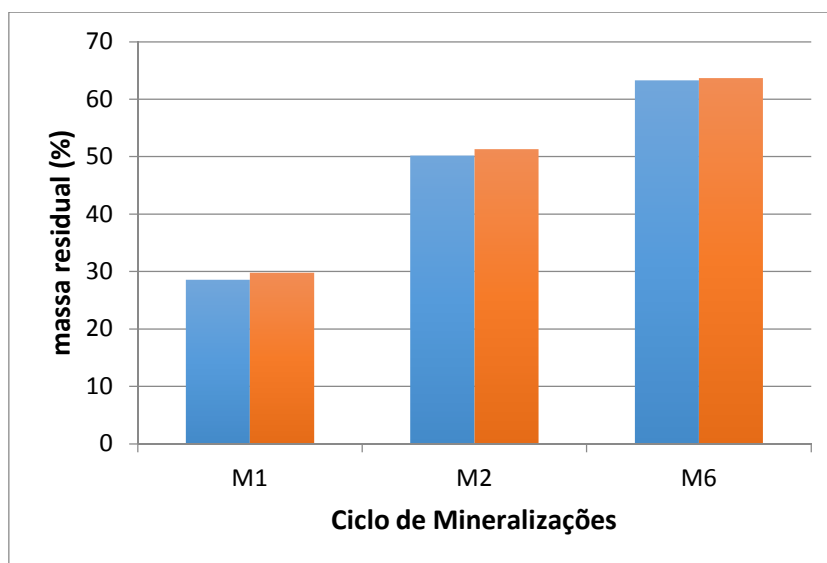
Figura 18 - Curvas termogravimétricas para hidrogéis: (—) CQG; (—) CQG1; (—) CQG2; (—) CQG6; (—) CQGE; (—) CQGE1; (—) CQGE2 e (—) CQGE6.



Todas as curvas apresentaram-se etapas semelhantes de perda de massa referente à água presente no material (25-200°C), aproximadamente, 10% para os hidrogéis mineralizados e entre 10-25% para os biopolímeros e hidrogéis não mineralizados. Em 650°C, ocorreu a completa carbonização do material orgânico dos biopolímeros e hidrogéis não mineralizados, enquanto que para os hidrogéis mineralizados, observou-se a formação de massa residual, a qual corresponde ao sal formado durante a mineralização, que é estável nesse intervalo de temperatura (Markovic et al., 2004). Os valores de % de massa residual obtidos à 750°C são apresentados na Tabela 6, onde é possível ver a influência do número de ciclos de mineralização. Quanto maior o número de ciclos, maior o grau de mineralização do material.

Tabela 6 - Porcentagens de massa residual obtidos a 750 °C dos hidrogéis.

Hidrogel	% de resíduo
CQG1	28,6
CQGE1	29,8
CQG2	50,2
CQGE2	51,3
CQG6	63,3
CQGE6	63,7

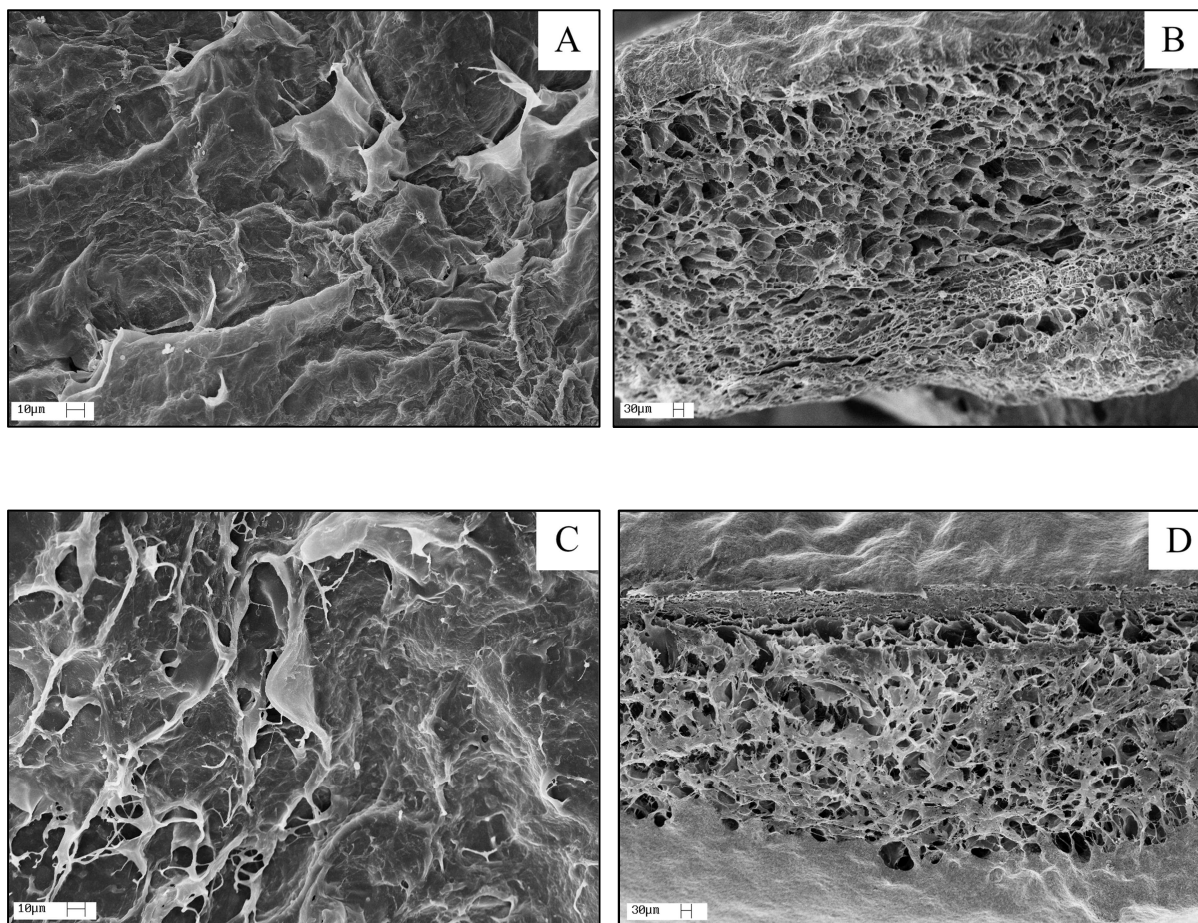
Figura 19 - Massa residual (%) vs. ciclo de mineralizações (M) para: (■) CQGM e (■) CQGEM.

Nos hidrogéis sem extrato de semente de uva o teor de fosfato de cálcio formado é ligeiramente menor em relação aos hidrogéis com extrato. Deve-se observar que o teor de sal formado para os hidrogéis com e sem extrato mineralizados por 6x é praticamente igual, e que quanto menor o número de mineralizações maior a diferença no teor de sal entre os hidrogéis com e sem extrato, como indicado na Figura 19.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 20 observam-se as superfícies e secções transversais dos hidrogéis não mineralizados. Embora os hidrogéis não apresentem em sua superfície uma expressiva quantidade de poros é possível observar, em nos os hidrogéis, em suas secções transversais arranjos em formato de rede, isto é devido à formação de cadeias tridimensionais pelos polímeros presentes.

Figura 20 - Fotomicrografias dos hidrogéis não mineralizados das superfícies (A) CQG e (C) CQGE. Aumento de 1.000x. Das secções transversais (B) CQG e (D) CQGE. Aumento de 200x.



As fotomicrografias da superfície e secção transversais dos hidrogéis mineralizados estão exemplificados pelas mineralizações de 2x e 6x (Figuras 21 e 22). Essas fotomicrografias mostram que os hidrogéis tiveram suas superfícies recobertas de forma homogênea, pelos cristais de fosfato de cálcio. Nas secções transversais observa-se que no interior dos hidrogéis mineralizados com extrato, o preenchimento pelos cristais de fosfato de cálcio foi maior, enquanto que nos hidrogéis sem extrato os cristais se concentraram em determinadas regiões, deixando áreas não preenchidas. Esse fato contradiz a análise termogravimétrica que mostra apenas uma pequena diferença de conteúdo de mineralização nos hidrogéis com e sem extrato, podendo-se sugerir que a mineralização da superfície dos hidrogéis sem extrato ocorreu preferencialmente na superfície.

Figura 21 - Fotomicrografias dos hidrogéis: nas superfícies (A) CQG2 e (C) CQGE2. Aumento de 1000x. Nas secções transversais (B) CQG2 e (D) CQGE2. Aumento de 100x.

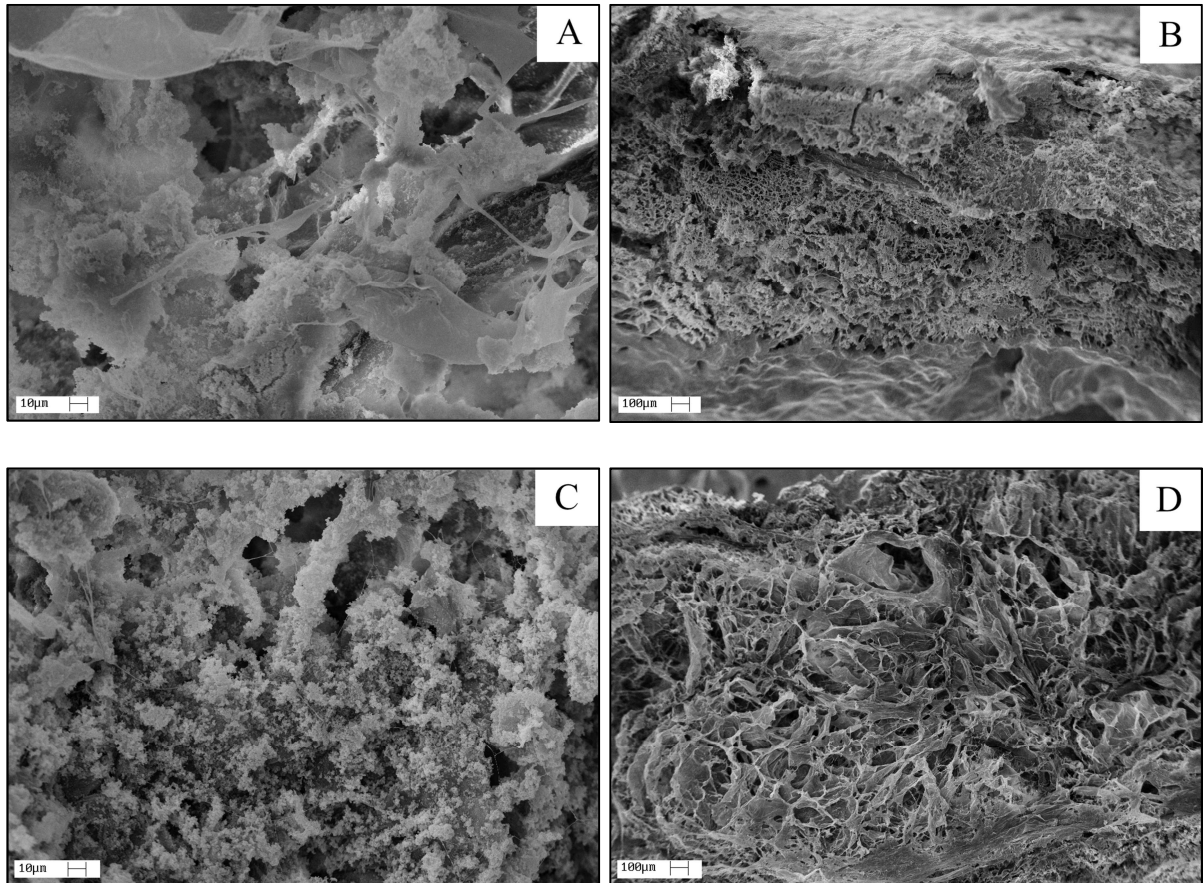
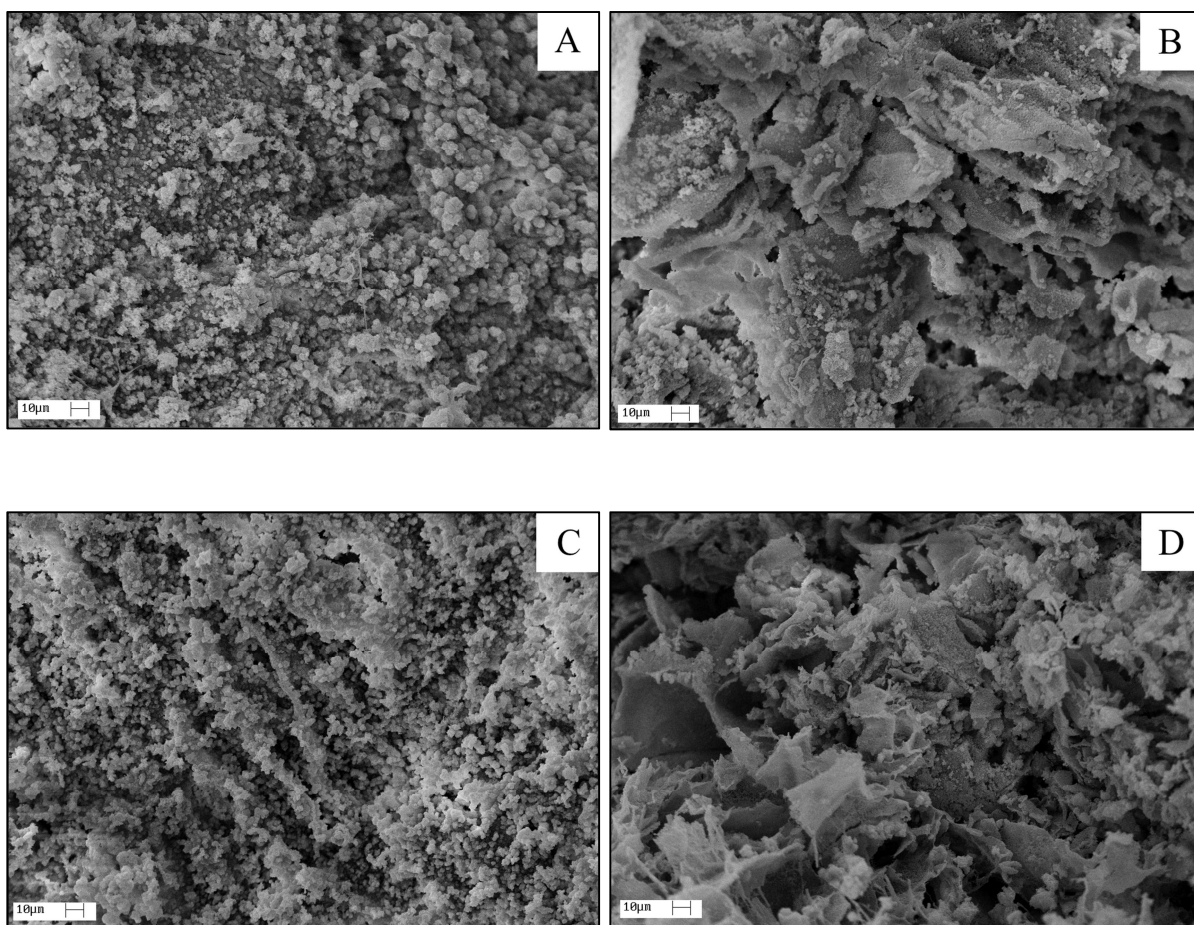
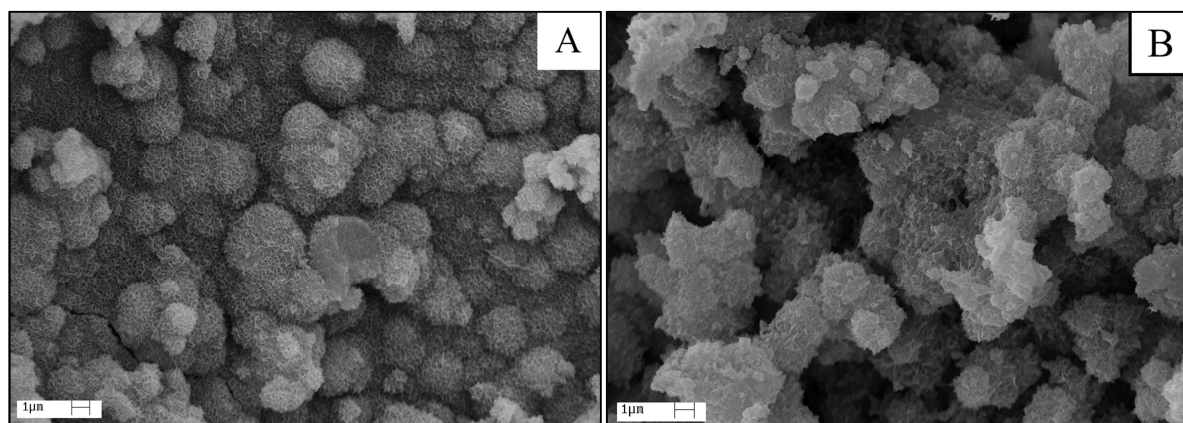


Figura 22 - Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis: (A) CQG6 e (C) CQGE6. Nas secções transversais (B) CQG6 e (D) CQGE6. Aumento de 1.000x.



A aparência dos cristais formados na superfície dos hidrogéis (Figura 23) é diferente. Nos hidrogéis em que o extrato está presente os cristais se agrupam e formam estruturas com formatos não definidos, enquanto que nos hidrogéis sem extrato, os cristais se agrupam em estruturas esféricas, característica da formação de HA. (Mohamed e Mostafa, 2012).

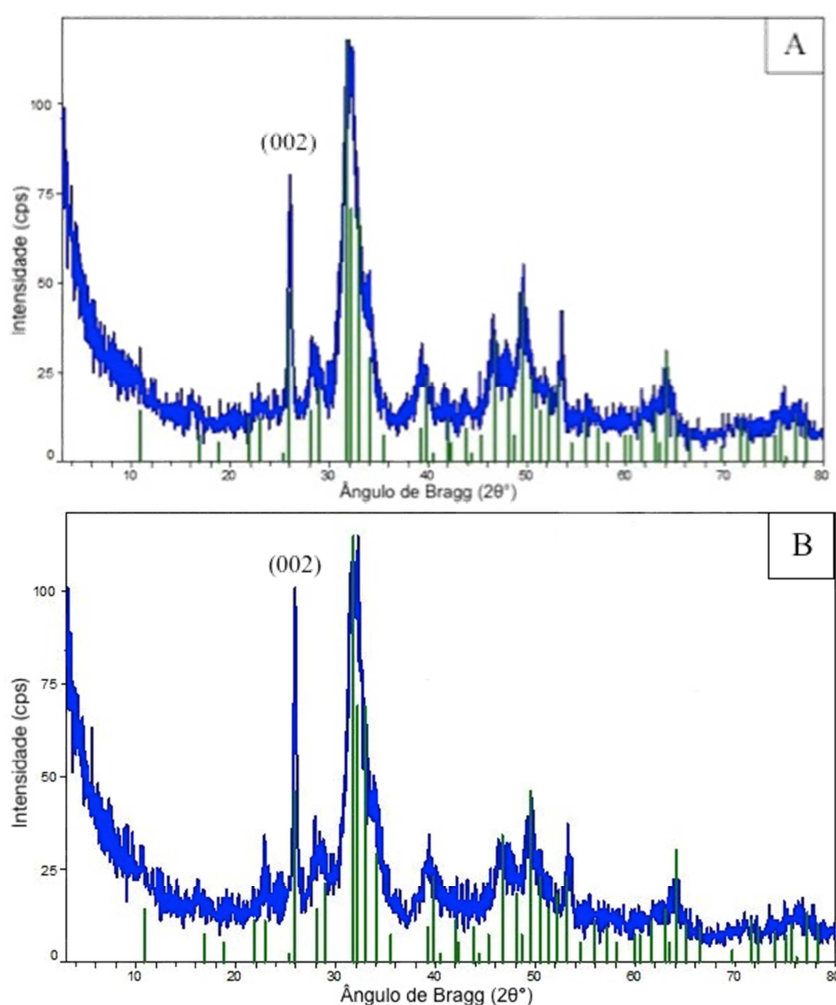
Figura 23 - Fotomicrografias das superfícies dos hidrogéis: (A) CQG6 e (B) CQGE6. Aumento de 10.000x.



4.2.5 Difração de Raio-X

A estrutura cristalográfica do sal de fosfato de cálcio formado nos hidrogéis CQGE6 e CQG6 foram estudadas por difração de raios X, estes hidrogéis foram escolhido para análise por conta de apresentarem um maior número de cristais formados. Os difratogramas são mostrados na Figura 24. Neles o padrão de difração da hidroxiapatita (difratograma padrão da JCPDS (9-0432)), em verde, é comparado com o do fosfato de cálcio, em azul, formado nos hidrogéis. Os picos observados para o fosfato de cálcio coincidiram com a posição e a intensidade dos picos da HA sintética.

Figura 24 - Espectro de difração de Raio-X dos hidrogéis mineralizados: (A) CQG6 e (B) CQGE6.



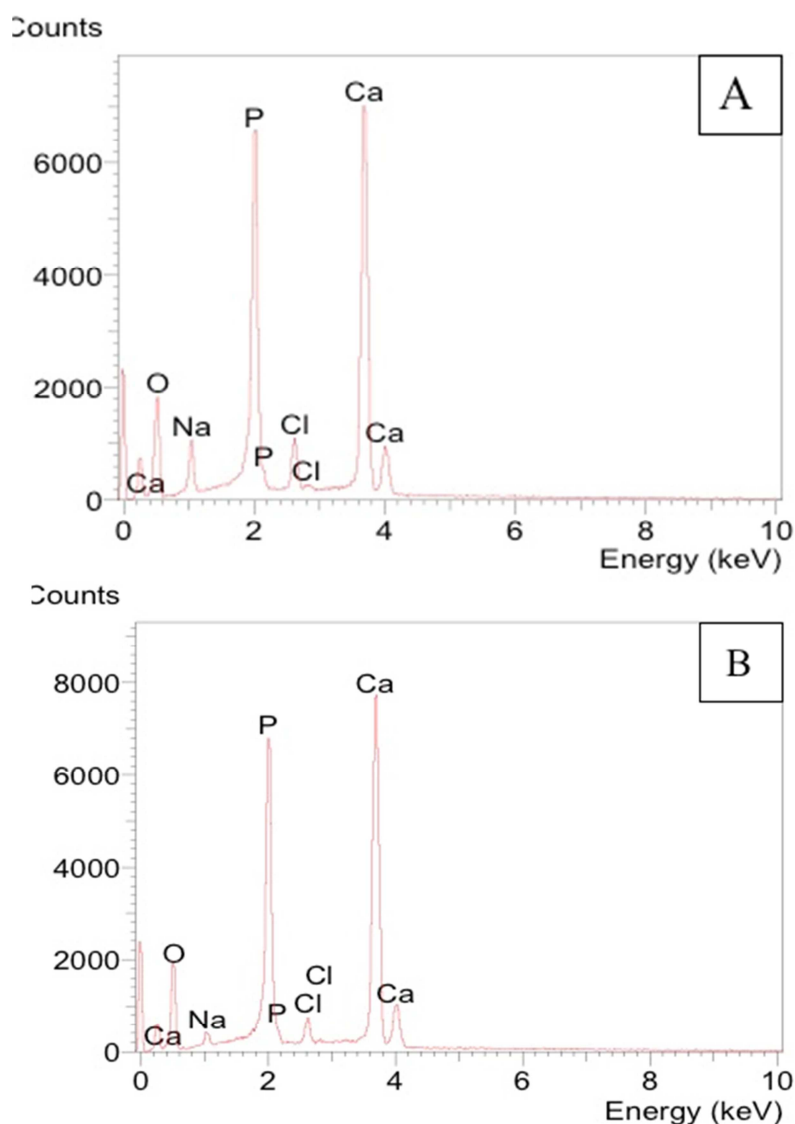
O tamanho do cristal de hidroxiapatita formado nos hidrogéis foi medido por meio do alargamento do pico de difração 002, indicado no difratograma de Raio-X, e também por meio da equação de Scherrer (Equação 5), sendo K igual a 0,94 e o comprimento de onda (λ) do Raio-X igual a 0,154056 nm ($\text{CuK}\alpha$), os valores de β foram $0,389^\circ$ ($0,007$ rad) e $0,330^\circ$

(0,006 rad) para hidrogéis sem e com extrato, respectivamente, enquanto que os ângulos (θ) foram 13,02° e 12,97° para hidrogéis sem e com extrato, respectivamente. O tamanho encontrado para o hidrogel CQG6 foi de 21,9 nm e para o hidrogel CQGE6 de 25,8 nm. Nos hidrogéis sem extrato o tamanho dos cristais encontrado é ligeiramente maior, fato que pode ter propiciado o aglomerados dos cristais com um formato não definido.

4.2.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Os espectros EDS em todos os casos exibiram picos em 2,0 keV referente ao fósforo e 3,7 e 4,0 keV referentes ao cálcio. Além do cálcio e do fósforo, observou-se também a presença de sódio em 1,04 keV e do cloro em 2,6 keV, referente aos sais originais utilizados na mineralização dos hidrogéis. Na Figura 25 são mostrados os espectros para os hidrogéis CQG6 e CQGE6 para exemplificação.

Figura 25 - EDS dos hidrogéis: (A) CQG6 e (B) CQGE6.



Foram feitas análises semi-quantitativas dos hidrogéis a partir destes espectros, pelos quais, obteve-se os valores para a razão Ca/P para cada hidrogel mineralizado em três áreas diferentes, os valores são apresentados na Tabela 7 e o fosfato de cálcio formado classificado como HA deficiente em cálcio. A classificação foi feita utilizando os dados da Tabela 1.

Tabela 7 - Valores médios da relação Ca/P dos hidrogéis em estudo.

Hidrogel	Ca/P
CQG1	1,60±0,05
CQGE1	1,42±0,23
CQG2	1,54±0,03
CQGE2	1,55±0,01
CQG6	1,48±0,12
CQGE6	1,52±0,02

5 CONCLUSÃO

A quitosana preparada para a utilização nos hidrogéis apresentou um \overline{GA} entre 6 e 7%, os valores obtidos pelos dois métodos foram muito próximos, logo são satisfatórios e garantem confiabilidade. A massa molar da quitosana calculada foi da ordem de $2,55 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Foi verificado que o extrato de semente de uva atuou como um agente reticulante do colágeno. Pelo DSC, foi possível observar que o extrato provocou um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno.

Além disso, por meio da TG foi verificado que a diferença entre massa residual (fosfato de cálcio) formada dos hidrogéis com extrato de semente de uva e sem é pequena, indicando que o extrato não influencia na formação de sais. Utilizando a MEV, foi possível observar que o interior dos hidrogéis com extrato de semente de uva apresentou uma maior área preenchida pelos cristais quando comparado aos hidrogéis sem extrato, nestes, é possível que o recobrimento tenha acontecido preferencialmente na superfície.

Os cristais formados puderam ser classificados como hidroxiapatita por meio da Difração de Raio-X, e a partir dos dados obtidos pelo EDS calculou-se a razão Ca/P o resultado permitiu concluir ainda que a hidroxiapatita formada, apresenta deficiência em cálcio. Pela Difração de Raio-X também verificou-se o tamanho dos cristais, nos hidrogéis com extrato, o tamanho foi ligeiramente maior em relação aos cristais dos hidrogéis sem extrato de semente de uva.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, A. M.; OLIVEIRA, R. M. S.; ADRIANO, E. G. Potencial de uso de compostos orgânicos como, coagulantes, floculantes e adsorventes no tratamento de água e efluentes. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, Vol. 10, N. 12, 2014.

ANGELO, P. M. e JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, Vol. 66, N. 1, 2007.

ANTONINO, N.A. Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana do Exoesqueleto de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2007.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Vol. 2.3, p. 27-34, 2007.

BAROLI, B. Hydrogels for tissue Engineering and delivery of tissue-inducing substances. *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 96, p. 2197-2223, 2007.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behaviour of in vitro mineralized anionic collagen matrices. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 95, p. 945-949, 2009.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*, Vol. 2, n. 4, p. 1074-1079, 2001.

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. *Food Science and Technology (Campinas)*, Vol. 26, N.3, p. 502-508, 2006.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. *Polímeros*, Vol. 7, N.2, p. 40-46, 1997.

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

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; SANTO, M. L. P. E.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.*, Araraquara, Vol. 16, N. 2, p. 195-205, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R.; Química de Alimentos de Fennema, 4ªed., Artmed: Porto Alegre, 2010.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 4, N. 3, pp. 184-191, 2013.

DORNELLES, C.; COSTA, S. S.; LAUX, M.; WEBER, R. Estudo comparativo da dissolução de três diferentes marcas de colágeno utilizadas em técnicas cirúrgicas otológicas. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, Vol. 69, N.6, p. 744-751, 2003.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*, Vol. 33, N. 6, p. 1352-1358, 2010.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 59, p. 234-248, 2007.

HORN, M. M., MARTINS, V. C. A., PLEPIS A. M. G. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. *Polímeros*, Vol. 77, p. 239-243, 2009a.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 77, p. 239-243, 2009b.

- JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. *Química Nova*, Vol. 30, N.4, p. 879-884, 2007.
- KUMAR, M.N.V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, Vol. 46, p. 1-27, 2000.
- LARANJEIRA, M. C. M. E FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, Vol. 32, N. 3, p. 672-678, 2009.
- LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 65, p. 1-8, 2004.
- LIEN, S. M.; KO, L. Y.; HUANG, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, p. 670-679, 2009.
- MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. J. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Vol. 109, p. 553-568, 2004.
- MÁRMOL, Z.; PAÉZ, G.; RINCÓN, M.; ARAUJO, K.; AIELLO, C.; CHANDLER, C. GUITIÉRREZ, E. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones / Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. *Revista Tecnocientífica URU*, N. 1, p. 53 - 58, 2013.
- MOHAMED, K. R.; MOSTAFA, A. A. Preparation and bioactivity evaluation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World Journal of Nano Science and Engineering*, Vol. 2, p. 154-160, 2012.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, Vol. 28, N. 5, p. 892-896, 2005.
- NAIR, R.; SEVUKARAJAN, M.; BADIVADDIN, T. M.; KUMAR, C. K. A. Collagen based drug delivery systems: a review, Vol. 1, N. 7, p. 288-304, 2010.

- NITTA GELATIN. Company Profile. Business Activies. Collagen material business, 2010. Disponível em : <<http://www.nitta-gelatin.co.jp/english/company/business.html>>. Acesso em: 28 maio 2016.
- OKUYAMA, K. Revisiting the molecular structure of collagen. *Connective Tissue Research*. Vol. 49, N. 5, p. 299-310, 2008.
- OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 15, N. 3, p. 635-643, 2009.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, Vol. 3, p. 1863-1887, 2010.
- PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. Vol. 15, N. 1, p. 65-74, 2013.
- RAYMOND, L.; MORIN, F.G.; MARCHESSAULT, H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, Vol. 246, p. 331-336, 1993.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, Vol. 31, p. 603–632, 2006.
- ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Vol. 28, p. 238-244, 2008.
- ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L. P.; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; SANTOS, J. P. A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. *Cienc. Rural*, Vol. 39, N. 3, p. 941-944, 2009.
- SCHRIEBER, R., GAREIS, H. Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. Weinheim: Wiley-vch, 2007.

- SILVA, S. V. Mineralização biomimética in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico: modelo de biomineralização. Tese (Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2005.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, Vol. 29, N. 4, p. 776-785, 2006.
- SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, Vol. 71, N. 3:530-539, 2012.
- SUN, B.; SPRANGER, I. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência Téc. Vitiv.*, Vol. 2, p. 59-89, 2005.
- VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. G.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. *Alim. Nutr.* Vol. 19, N.2, p. 159-165, 2008.
- ZARGAR V.; ASGHARI M.; DASHTI A. A review on chitin and chitosan polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, Vol. 2, N. 3, p. 204–226, 2015.