



UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

CFM - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

Departamento de Química

QUITECH - Grupo de Pesquisas em Quitinas e Aplicações Tecnológicas

Preparação de Membranas de Quitosana/Poli (vinil álcool) / Poli (β -hidroxibutirato) e Aditivos para Aplicação na Engenharia de Tecidos

Aluna: Francielly Roussenq Cesconeto

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

Florianópolis, junho de 2009.

FRANCIELLY ROUSSENQ CESCNETO

**Preparação de Membranas de QT/PVA/PHB e Aditivos para Aplicação na
Engenharia de Tecidos**

Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para a obtenção da aprovação na disciplina QMC5512– Estágio Supervisionado sob orientação do Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira.

Florianópolis, 2009

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre esteve ao meu lado e a minha irmã pelo apoio.

Agradecimentos

- Ao Professor Mauro, pela orientação.
- Ao departamento de Química e a todos os professores que contribuíram com meu aprendizado.
- À Central de Análises e aos técnicos que colaboraram para obtenção dos resultados.
- À Universidade Federal de Santa Catarina.
- Ao PIBIC pela bolsa de iniciação científica.
- À minha mãe por tudo.
- Aos amigos e colegas do QUITECH, especialmente a Denice.
- Aos amigos que fiz durante o curso.

Índice

Resumo.....	9
1.0. Introdução.....	10
2.0. Revisão Bibliográfica.....	11
2.1. <i>Engenharia de tecidos</i>	11
2.2. <i>Reconstituição tecidual</i>	12
2.3. <i>Blendas poliméricas</i>	13
2.4. <i>Quitosana (QT)</i>	13
2.5. <i>Poli (β-hidroxibutirato) (PHB)</i>	14
2.6. <i>Poli (álcool vinílico) (PVA)</i>	15
2.7. <i>Aditivos</i>	16
2.7.1. <i>Aditivo Plastificantes</i>	16
2.7.2. <i>Aditivo inorgânico</i>	16
3. Objetivos.....	18
3.1. <i>Objetivo geral</i>	18
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
4.0. Materiais e métodos.....	19
4.1. <i>Materiais</i>	19
4.2. <i>Metodologia</i>	19
4.2.1 <i>Preparação das partículas de ZnO - Método de Pechini</i>	19
4.2.2. <i>Preparação das membranas de /PVA/PHB</i>	19
4.2.3. <i>Caracterização membranas QT/PVA/PHB e QT/PVA/PHB</i>	20
4.2.4. <i>Espectroscopia de infravermelho (FTIR)</i>	20
4.2.5. <i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	20
4.2.6. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	20
4.2.7. <i>Determinação do grau de intumescimento (GI%)</i>	21
4.2.8. <i>Testes de degradação na Solução de Hank</i>	21
5.0. Resultados e discussões.....	22
5.1. <i>Espectroscopia de infravermelho (FTIR)</i>	22
5.2 <i>Análises Termogravimétrica (TG)</i>	25
5.3. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	27
5.4. <i>Determinação do grau de intumescimento (GI) em água</i>	29
5.5. <i>Teste de degradação das membranas</i>	30
6.0. Conclusões.....	32
7.0. Referências Bibliográficas.....	33

Índice de Figuras

Figura 1: Técnica da engenharia de tecidos.....	11
Figura 2 Estrutura da quitosana.....	14
Figura 3 Estrutura do PHB.....	14
Figura 4 Estrutura polimérica do PVA.....	15
Figura 5. Espectro de infravermelho das membranas A-QT/PVA/PHB.....	23
Figura 6 Termogramas da QT, PHB e da blenda QT/PVA.....	25
Figura 7 Termogramas das membranas (a) A-QT/PVA/PHB e (b) (a) B-QT/PVA/PHB com a adição dos diferentes plastificantes.....	26
Figura 8 Micrografias das membranas (a) A-Gli e (b) B-Gli/ZnO.....	27
Figura 9 Micrografias das membranas (a) A-T80 e (b) B-T80/ZnO.....	28
Figura 10 Micrografias das membranas (a) A-T80/Gli e (b) A-T80/Gli/ZnO.....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 Composição das membranas A-QT/PHB A (3:1) e B-QT/PHB (3:2)....	20
Tabela 2 Relação das bandas de FTIR e os respectivos grupos químicos dos polímeros de QT, PVA, PHB e dos aditivos T80 e Gli.....	22
Tabela 3. Efeito no FTIR da adição do T80 e Gli nas membranas QT/PVA/PHB do tipo A e B.....	24
Tabela 4. Efeito no FTIR da adição do ZnO nas membranas QT/PVA/PHB do tipo A e B.....	24
Tabela 5 Grau de intumescimento (GI%) das membranas A e B.....	29
Tabela 6 Taxa de degradação-Solução de Hank.....	30

Lista de abreviaturas

GI- Grau de intumescimento (%)

Gli-Glicerina

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

PHB-*Poli (β -hidroxibutirato)*

PVA- Poli(vinil álcool)

QT-Quitosana

TG- Análise termogravimétrica

Resumo

Uma alternativa viável para reparar a estrutura biológica de um de órgão ou tecido é a reposição deste com um implante preparado a partir de biomateriais. Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de preparar, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes as dos materiais biológicos. A técnica de preparação de suporte polimérico, usada na engenharia de tecidos para reparar ou regenerar órgãos e tecidos, estuda materiais que permitam a passagem de nutrientes e oxigênio bem como, a fixação, diferenciação, migração e crescimento das células, além da não toxicidade dos resíduos metabólicos.

Neste estudo foram preparadas e caracterizadas membranas de blendas á base de quitosana (QT), poli (β -hidroxibutirato) (PHB) e poli (álcool vinílico) (PVA) com os plastificantes glicerol e Tween 80 (T80) para utilização como suporte polimérico na reconstituição tecidual. Estes materiais foram caracterizados pelas técnicas de análises térmicas, espectroscopia de infravermelho, morfologia, além do teste de degradação na solução de Hank e grau de intumescimento.

Foram desenvolvidas membranas com estrutura composta por uma rede de poros para fixação e crescimento das células, para o transporte de oxigênio, nutriente e com propriedades mecânicas semelhantes às dos tecidos no sítio de implantação.

Os resultados obtidos foram: membranas com T80 como plastificante apresentam maior taxa de intumescimento, maior concentração de poros e são termicamente mais estáveis. Membranas que contem T80 e Gli juntos apresentam uma menor taxa de degradação na solução de Hank e menos concentração de poros com diâmetros maiores. A adição de PHB aumenta a hidrofobicidade das membranas tornando-as mais resistentes a degradação térmica, solução de Hank e ao intumescimento.

1.0. Introdução

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada em situações clínicas mais severas, somente o transplante do órgão retoma as atividades normais do organismo. Assim, de forma idealizada outra possibilidade seria obter um novo órgão ou tecidos, criados em laboratório utilizando a técnica conhecida como engenharia de tecidos. Esta técnica consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de células do próprio paciente que são cultivadas sobre matrizes poliméricas (arcabouços, filmes, membranas) para serem re-inseridas no organismo. Como material para confecção deste suportes, as blendas de polímeros naturais e sintéticos têm se mostrado uma alternativa viável, pois é possível trabalhar diversas propriedades a fim de viabilizar as características específicas de cada aplicação. As membranas poliméricas feitas a partir de biopolímeros, podem ser utilizadas como suporte por serem biocompatíveis para vários tipos de células.

Desta forma, 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 muitos suportes poliméricos foram investigados com a finalidade de recobrimento de lesões utilizando como, por exemplo, PVA, borracha de silicone, poli (L-ácido láctico) e polímeros naturais tais como quitosana, alginato de sódio, gelatina e colágeno, entre outros. ¹⁻⁴

Neste sentido, foram desenvolvidas membranas para que possuam as seguintes características: serem biocompatíveis e bioreabsorvíveis com controladas velocidades de degradação, para ajustar a substituição do tecido; terem uma rede de poros para o crescimento das células e transporte do fluxo dos nutrientes; terem superfície química apropriada para a fixação, proliferação e diferenciação das células; terem propriedades mecânicas para igualar às dos tecidos no sítio de implantação.

2.0. Revisão Bibliográfica

2.1. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que combina a biologia, bioquímica, ciência de materiais e a reconstrução cirúrgica. Esta área visa desenvolver materiais substitutos para os tecidos vivos que possam restaurar e manter ou melhorar a função de tecidos danificados. A engenharia de tecidos destaca-se por permitir o fornecimento de órgãos e/ou tecidos e oferecer a possibilidade de reparar tecidos, desenvolver procedimentos cirúrgicos mais eficientes, e melhorar significativamente da qualidade de vida.³

De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos segue algumas etapas: seleção e processamento do suporte polimérico; inoculação da população celular sobre o suporte; crescimento do tecido prematuro; crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (bioreator); re-implante cirúrgico e simulação do produto, Figura 1.

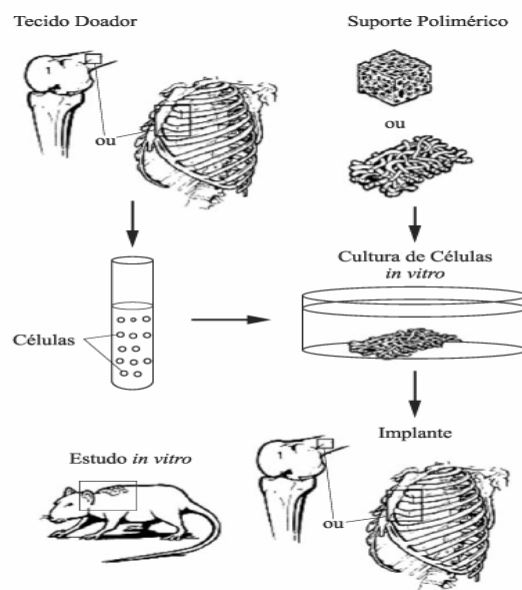


Figura 1: Técnica da engenharia de tecidos

Os suportes poliméricos permitem a penetração de células, nutrientes e fatores osteoindutivos, bem como, a fixação, migração, diferenciação proliferação e crescimento das células, além da remoção de resíduos metabólicos, e impedem a penetração de tecidos indesejáveis.

As propriedades essenciais dos suportes são: biocompatibilidade para evitar resposta imune e infecção; porosidade e interconectividade dos poros para permitir a difusão dos nutrientes e gases, a remoção dos metabólicos, bem como, a vascularização tecidual; propriedades químicas e topográficas superficiais adequadas para permitir a adesão e proliferação celular; osteoindução para facilitar o recrutamento das células osteoprogenitoras e conseqüente diferenciação osteogênica; resistência mecânica para suportar a pressão hidrostática e manter a estrutura adequada para a proliferação celular e formação da matriz; e biodegradabilidade adequada para que a taxa de degradação esteja ajustada à taxa de crescimento do novo tecido.^{4,5}

2.2 Reconstituição tecidual

Reconstituição de tecido é um processo fisiológico e dinâmico que restaura a continuidade dos tecidos. Após ocorrer lesão de um tecido, imediatamente iniciam-se fenômenos dinâmicos conhecidos como cicatrização, que é uma seqüência de respostas dos mais variados tipos de células (epiteliais, inflamatórias, plaquetas e fibroblastos), que interagem para o restabelecimento da integridade dos tecidos. A cicatrização pode ocorrer em feridas limpas, com perda mínima de tecido; em feridas abertas com perdas teciduais e em feridas infectadas com ou sem perda de tecido. Na seqüência da cicatrização um suprimento de oxigênio é essencial para a síntese de formação de colágeno.⁶

Desta forma, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas visando desenvolver materiais alternativos de baixa toxicidade associado à atividade bactericida e elevada eficiência no reparo de tecidos. Entre estes materiais muitas membranas poliméricas foram investigadas com a finalidade de recobrimento de lesões.

Dados recentes reportados por Costa e col.⁷ no estudo de filmes de Quitosana/PVA reticulada com Glutaraldeido para aplicação em engenharia de tecidos, apresentam indícios de falha na miscibilidade do filme da blenda e forte evidência de que controlando o PVA e a quitosana, como precursores, associado à reticulação química é possível obter híbridos orgânico-orgânico, com variação das propriedades fisico-químicas em função da necessidade de aplicação.

Em outro estudo desenvolvido por Tuzlakoglu,⁸ diferentes estruturas à base de quitosana e amido foram aplicadas na engenharia de tecidos na forma de fibras.

Os resultados demonstraram que as estruturas à base desta fibra poliméricas podem servir com êxito como suporte para engenharia de tecidos.

2.3 Blendas poliméricas

Blendas poliméricas são misturas de dois ou mais polímeros ou copolímeros. Os principais objetivos da preparação de blendas são: os econômicos, ou seja, adicionar um polímero de baixo custo a um polímero de engenharia mantendo um bom desempenho do material resultante; combinar as propriedades dos polímeros componentes da blenda a fim de se obter um alto desempenho; uma melhor processabilidade da blenda em relação a um dos polímeros puros.

A mistura física de polímeros pode dar origem a um sistema miscível, o qual é favorecido na presença de interações intermoleculares, resultando em uma mistura homogênea. Entretanto, predominam sistemas imiscíveis, com a formação de duas ou mais fases, cujas propriedades e desempenho das blendas dependem da dispersão dos domínios na matriz e das forças de interação entre eles. A adição de um agente compatibilizante que atue na interface das fases modificando as propriedades mecânicas é bastante comum.⁹

2.4. Quitosana (QT)

A quitosana (QT) (Figura 2) é um biopolímero obtido principalmente a partir da quitina (Figura 2 - a), um biopolímero que é o segundo polímero natural mais abundante depois da celulose e está presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos nas paredes celulares de fungos. A quitina é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligações β -(1→4) e quando desacetilada resulta na estrutura β -(1→4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, conhecida como quitosana com grau médio de acetilação maior ou igual a 50%.¹⁰

A hidrólise dos grupos acetamida da quitina pode ser realizada em meio ácido ou alcalino. A conversão mais comum é em meio básico realizada pelo tratamento com solução de hidróxido de sódio ou potássio (40-50%) usualmente a 100 °C.

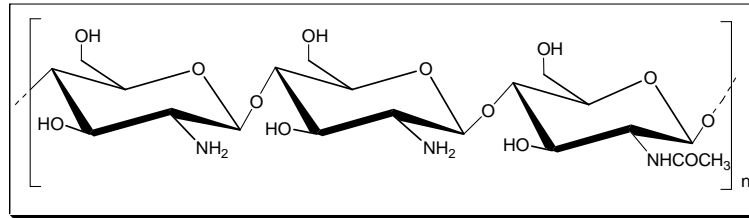


Figura 2 Estrutura da quitosana

A solubilidade apresentada pela quitosana em água é atribuída pela presença de grupos amino na sua estrutura, os quais são protonados em meio ácido, resultando em cargas positivas distribuídas ao longo de suas cadeias.¹¹

.A quitosana 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 ter mostrado um comportamento bactericida e fungicida, bem como os resultados de sua degradação em organismos vivos que produz as glicosaminas, substâncias não tóxicas.^{12,13}

2.5 Poli (β -hidroxibutirato) (PHB)

O PHB (Figura 3) é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono. Este polímero pertence à família dos polihidroxicarboxilatos (PHA) que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de carboidratos.

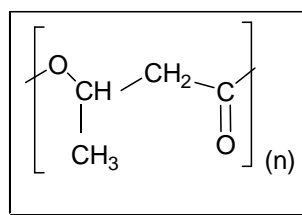


Figura 3 Estrutura do PHB

Tais polímeros, em condições apropriadas de cultivo bacteriano, são acumulados na forma de grânulos intracelulares, os quais podem ser separados e removidos após a quebra celular, gerando uma resina com propriedades semelhantes às dos plásticos de origem petroquímica, com a vantagem ser biodegradáveis.¹⁴

Além de propriedades termoplásticas, que lhes permitem ser moldados ou transformados em filmes para aplicações diversas, o PHB é biocompatível com várias linhas celulares, incluindo osteoblastos, células epiteliais e condrócitos ovinos. Pesquisas têm obtido boas aproximações para avaliar a biocompatibilidade de materiais implantados através do estudo em culturas de células em PHB, com potencial para aplicações médico-veterinárias, como suturas, suportes de culturas de tecido para implantes (scaffolds), encapsulação de fármacos para liberação controlada etc.¹⁵

O PHB possui propriedades mecânicas semelhantes ao polipropileno, é resistente à água, tem boa estabilidade à radiação ultravioleta.

Quanto à biodegradabilidade, ele se decompõe em uma diversidade de meios, liberando apenas água e gás carbônico. Em fossas sépticas, a perda da massa chega a 90% em 180 dias e em aterro sanitário perde 50% da massa em 280 dias. Ecologicamente correto estes polímeros pode ser obtido a partir do bagaço da cana-de-açúcar.^{16,17}

2.6 Poli (álcool vinílico) (PVA)

O poli(álcool vinílico) (Figura 4) é um polímero sintético, um plástico de grande importância industrial preparado por hidrólise de poli(acetato de vinila). O (PVA) com massa molar média entre 30.000 e 70.000 g/mol é solúvel em água. A solução aquosa não é estável na presença de traços de ácidos ou bases, podendo ocorrer uma série de reações reversíveis e irreversíveis. Por exemplo, ligações cruzadas podem ocorrer resultando em um acréscimo da viscosidade e na formação de produtos insolúveis.

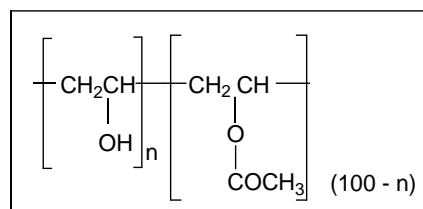


Figura 4 Estrutura polimérica do PVA.

As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise. É um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas, sua resistência à passagem de oxigênio é superior a de qualquer polímero conhecido.¹⁸ Além de apresentar uma

capacidade de estabilização de dispersões, excelente resistência química e biocompatível.⁷

2.7. Aditivos

2.7.1 Aditivos Plastificantes

Os aditivos são substâncias facilmente incorporadas por polímeros, que melhoram suas propriedades físico-químicas e aparência. Existem inúmeras classes de aditivos, cada uma com uma função bem definida. Os plastificantes são substâncias normalmente líquidas que pertence à classe dos aditivos que melhoram a flexibilidade e elasticidade dos polímeros na temperatura de utilização.⁹ São utilizados também com o intuito de unir fases, tornando a matriz filmogênica menos heterogênea, facilitando a dissolução, aumentando a viscosidade da solução, ajudando a evitar a formação de cristais que afetaria a textura dos materiais além de manter a aparência homogênea.¹⁹ Outras características dos plastificantes é a capacidade de diminuir a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão, e aumentar a permeabilidade a gases, proporcionalmente ao seu conteúdo. Os mais utilizados em membranas poliméricas são: glicerol, sorbitol, propilenoglicol, polietilenoglicol, monoglicerídeos, Tween 80, entre outros.²⁰

Membranas feitas a base de polímeros biodegradáveis apenas com as suas soluções, sem outros materiais, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plastificantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade das membranas, devido à habilidade destes aditivos em reduzir ligações hidrogênio internas entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças de atração inter e intramoleculares ao mesmo tempo aumentando ou diminuindo o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas.²¹

2.7.2. Aditivos inorgânicos - Óxido de zinco (ZnO)

O óxido de zinco é um material cerâmico versátil, o qual pode ser utilizado em diversas aplicações tecnológicas tais como: catalisadores, aditivos em óleos lubrificantes, materiais luminescentes, sensores de gás, pigmentos, protetor solar, materiais farmacêuticos, entre outras. Para um melhor desempenho o ZnO é utilizado com tamanho de partícula em escala nanométrica, esta característica que

leva ao desenvolvimento de vários métodos químicos. Entre os vários métodos de síntese química que vem sendo utilizado para a preparação de nanopó de ZnO pode-se citar o método de solgel, o spray pirólise, reação por combustão via líquida, SHS, síntese hidrotérmica, spray-drying e o método Pechini. Entre esses métodos, o método Pechini destaca-se como uma técnica alternativa e promissora para a preparação de ZnO cristalino e nanométrico com tamanho de partícula controlado.^{22,}

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas membranas de quitosana, poli (álcool vinílico) e poli(β -hidroxibutirato) com aditivos os glicerol, Tween 80 e ZnO para aplicação na engenharia de tecidos.

3.2 Objetivos específicos

Preparar membranas de QT/PVA/PHB contendo Gli, T80 e ZnO.

Obter membranas porosas, mecanicamente resistentes e flexíveis.

Caracterizar as membranas obtidas através das técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise térmica (TG), e morfologia (MEV).

Testar *in vitro* a degradação, usando solução de Hank e grau de intumescimento.

4.0. Materiais e métodos

4.1. Materiais

A quitosana com grau de desacetilação de 90% e massa molar média de $1,2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, adquirida da Purifarma (São Paulo, Brasil), (a massa molar média determinada por viscosimetria); poli(vinil álcool), com grau de hidrólise entre 87-89% e massa molar média de entre $8,5 \times 10^4$ e $12,4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, e Tween 80 adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil); poli(β -hidroxibutirato) adquirido da Biomer (Alemanha), com massa molar média de $183,5 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$; ácido acético glacial (99,7%), ácido cítrico (99,5%), glicerol, e diclorometano, etileno glicol, óxido de zinco, NaCl, NaHCO_3 , KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ da Nuclear e água destilada.

4.2. Metodologia

4.2.1 Preparação das partículas de ZnO - Método de Pechini

As partículas de ZnO foram preparadas pela formação de uma resina polimérica através da mistura de ZnO/ácido cítrico na proporção de 2/1 com adição de poucas gotas do ácido nítrico para dissolver a mistura a 60 °C. Após a dissolução completa da mistura, a temperatura foi elevada para 70 °C e foi adicionado 3 partes de etileno glicol. A temperatura foi elevada até 80 °C para evaporação da água. Após a remoção do excesso da água, a resina foi calcinada 350 °C em uma mufla, tendo como resultado a expansão e formação da resina polimérica. A resina foi resfriada a temperatura ambiente e triturada. O pó obtido foi calcinado novamente a 500 °C por 1 h para eliminar toda a parte orgânica e ser obtida as nanopartículas de ZnO.^{22, 23,24}

4.2.2. Preparação das membranas de QT/PVA/PHB

As membranas de QT/PVA/PHB foram preparadas em proporções diferentes de QT/PHB (m/m) A(3:1) e B(3:2). Cada polímero QT/PVA/PHB foi solubilizado no solvente adequado, sendo eles: ácido acético 5%, água e diclorometano, respectivamente. As soluções foram misturadas com a adição de Tabela 1 glicerol, T80 e ZnO sob agitação vigorosa até obter uma solução polimérica homogênea.

Foram adicionadas sempre a mesma massa de PVA (2 g) para as diferentes membranas. Esta solução foi vertida em placas e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente até a formação da membrana.

Tabela 1: Composição das membranas A-QT/PHB A (3:1) e B-QT/PHB (3:2).

Amostras A	Gli (g)	T80 (g)	ZnO (g)	Amostras B	Gli (g)	T80 (g)	ZnO (g)
A-Gli	2,0			B-Gli	2,0		
A- Gli- ZnO	2,0		0,5	B-Gli- ZnO	2,0		0,5
A-T80		2,0		B-T80		2,0	
A-T80- ZnO		2,0	0,5	B-T80- ZnO		2,0	0,5
A-Gli-T80	1,0	1,0		B-Gli-T80	1,0	1,0	
A-Gli-T80-ZnO	1,0	1,0	0,5	B-Gli-T80-ZnO	1,0	1,0	0,5

4.2.3. Caracterização membranas QT/PVA/PHB

4.2.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Com o objetivo de identificar a natureza química das membranas obtidas será realizada análise de espectroscopia se infravermelho com transformada Fourier. O espectrômetro de FTIR utilizado foi o ABB-Bomen, modelo FTLA 2000, da Central de Análise do Departamento de Química, UFSC.

4.2.5. Análise termogravimétrica (TG)

O estudo termogravimétrico foi realizado até a temperatura de 300 °C, com acréscimo da temperatura 10 °C min⁻¹ e atmosfera de N₂. Foi usado um analisador termogravimétrico da marca Shimadzu Termogravimetric Analyser (TGA 50, Japan) da Central de Análise do Departamento de Química, UFSC.

4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Estudar a morfologia das membranas poliméricas visando sua aplicação é importante para avaliar a miscibilidade entre os polímeros, efeito entre os aditivos e polímeros e a existência de poros. As morfologias das membranas foram avaliadas através de MEV em um Microscópio Eletrônica de Varredura, marca Phillips, modelo

XL 30, do Laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As amostras serão fraturadas com N₂ líquido e recobertas com uma fina camada de ouro, para então microfotografar a secção transversal.

4.2.7. Determinação do grau de intumescimento (GI%)

Foi determinado o grau de intumescimento (GI%) das membranas para verificar a diferença entre a massa hidratada (M_h) e a massa seca (M_s). Este estudo foi realizado em água destilada, onde uma amostra da membrana seca foi colocada em contato com água destilada por 24 horas e retiradas desta solução, secas ligeiramente em papel absorvente, para eliminar excesso de água e pesadas para comparar a diferença de massa entre a membrana seca e a submetida à hidratação. Este procedimento foi realizado em triplicata para se obter uma média.

O grau de intumescimento (GI %) foi calculado pela equação abaixo,

$$GI\% = \frac{M_h - M_s}{M_s} \times 100$$

4.2.8. Testes de degradação na Solução de Hank

O teste de degradação *in vitro* em soluções que simulam propriedades fisiológicas é uma forma de avaliar as interações entre os fluidos corporais e o biomateriais, estudar sua estabilidade e taxa de degradação. Apesar de ser impossível simular completamente o caráter químico do estudo *in vitro* para prever o comportamento dos biomateriais no meio fisiológico humano é uma parte importante para se considerar de possíveis materiais para implantes.¹⁵ Através da solução de Hank, foi possível simular as propriedades fisiológicas do sangue e verificar a resistência à degradação.

A solução de Hank foi preparada sob adição dos seguintes sais: 8 g NaCl, 0,35g NaHCO₃, 0,4 g KCl, 0,06 g KH₂PO₄, 0,10 g MgCl₂.6H₂O, 0,14 g CaCl₂, 0,06g Na₂HPO₄.2H₂O, 0,06 g MgSO₄.7H₂O, 1 g glicose, adicionados em 1000 mL de água destilada.²⁵

Amostras das membranas foram preparadas com dimensões de 2,0 cm² secas e pesadas. As amostras foram imersas na solução e após uma semana este material foi recolhido, seco e pesado. Dessa forma foi possível analisar a perda de massa das membranas. Este procedimento foi realizado em triplicata para se obter uma média.

5.0. Resultados e discussões

5.1. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi usada para identificar as principais bandas que caracterizam os grupos funcionais dos polímeros de QT, PVA e PHB e dos aditivos T80 e glicerol, (Tabela 2).

Tabela 2 Relação das bandas de FTIR e os respectivos grupos químicos dos polímeros de QT,⁷ PVA,⁷ PHB,^{14,15} e dos aditivos T80 e Gli.²⁷

Material	Bandas (cm ⁻¹)	Grupos	Material	Bandas (cm ⁻¹)	Grupos
QT	3450-3200	$\nu(\text{N—H})$	Gli	3360	$\nu(\text{O—H})$
	2922-2845	$\nu(\text{C—H})$		2940-2885	$\nu(\text{C—H})$
	1658-1500	$\nu(\text{C=O})$ amida I		1415	$\delta(\text{C—H})$
	1379	(CH ₂)		1108-1043	$\nu(\text{C—O})$
	1379-1250	$\delta(\text{C—N})$ Amina III	T80	3498	$\nu(\text{O—H})$
	1423	$\delta(\text{C—N})$ Amina I		2921	$\nu(\text{C—H})$
	1300-1000	$\nu(\text{C—O})$ Cíclico		2865	$\nu(\text{=C—H})$
PHB	1723	$\nu(\text{C=O})$	1734	$\nu(\text{C=O})$	
	1379	$\nu(\text{CH}_3)$	1458	$\delta(\text{C—H})$	
	1187-1134	$\nu(\text{C—O—C})$	1110	$\nu(\text{C—O})$	
	2937-2870	$\nu(\text{C—H})$			
	1727-1712	$\nu(\text{C=O})$			
PVA	1461-1417	$\delta(\text{CH—CH}_2)$			
	1254	$\delta(\text{=C—O—C})$			
	1084	$\nu(\text{C—O})\text{-C—OH}$			
	842	$\delta(\text{C—C})$			

Os dados da Tabela 2 foram usados como referência para identificar as bandas dos espectros de FTIR das membranas mostrados na Figura 5. As principais bandas das membranas estão localizadas em 3600-3200 cm⁻¹ podem estar associadas aos estiramentos do grupo amina da QT e das hidroxilas da QT, PVA, Gli e T80;^{7,27} em 2935-2874 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações do estiramento C-H;^{7,14,15,27} próximas de 1723 cm⁻¹ correspondem ao estiramento C=O dos de acetato residual da QT e PVA e principalmente do éster do PHB;^{14,15} em 1650 e 1564 cm⁻¹

correspondem aos estiramentos da amida I e amida II;⁷ em 1420 cm^{-1} correspondem ao estiramento CH_2 ;^{7,14,15,27} as bandas em 1379 , 1325 e 1252 cm^{-1} estão associadas aos estiramentos das aminas terciárias, primárias e secundárias, respectivamente; na região de 1100 e 1000 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C-O da hidroxila e do anel glicosídica.⁷

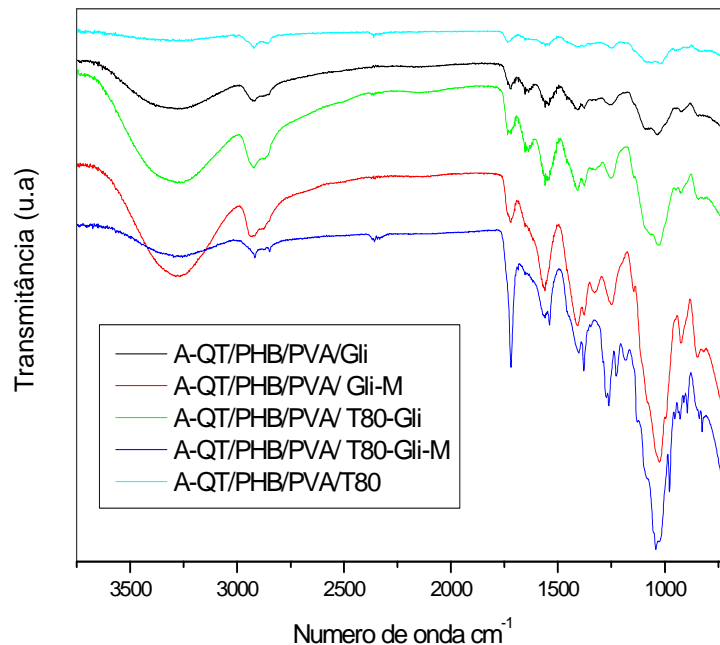


Figura.5. Espectro de infravermelho das membranas A-QT/PVA/PHB

Em geral os espectros de FTIR das membranas das blendas poliméricas apresentaram bandas mais definidas com relação aos materiais isolados como estiramento de N-H, estiramento da amida e do éster e estiramento C-H.

As bandas próximas de 3300 e 1720 cm^{-1} das membranas A e B apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos comprimentos de onda dos componentes isolados (Tabela 2). Esta diferença se deve as interações entre os componentes das blendas, que promoveu o alargamento e deslocamento das bandas. O mesmo comportamento foi observado variando a proporção entre os componentes da blenda QT/PHB.

A análise das amostras que não contém ZnO (Tabela 3) demonstra que os plastificantes Gli e T80 adicionados separadamente ou em conjunto nas membranas possuem deslocamentos semelhantes na região entre 3600 - 3200 cm^{-1} para menores comprimentos de onda. Na região de 1720 cm^{-1} não foram observados deslocamentos significativos.

Tabela 3. Efeito no FTIR da adição do T80 e Gli nas membranas QT/PVA/PHB do tipo A e B.

Bandas (cm⁻¹)					
	$\nu(\text{N—H})$	$\nu(\text{C=O})$		$\nu(\text{N—H})$	$\nu(\text{C=O})$
A Gli	3278	1719	B Gli	3278	1719
A T80	3261	1719	B T80	3278	1722
A Gli-T80	3261	1719	B Gli/T80	3261	1719

Para membranas que contém ZnO (Tabela 4) comparando com as membranas sem adição de ZnO e dos componentes isolados foi observado deslocamento considerável da banda próxima a 1720 cm⁻¹ para maiores comprimentos de onda. Este comportamento pode indicar uma possível coordenação do zinco. Para as amostras A Gli- ZnO e B-Gli/ZnO foi evidenciado um comportamento semelhante aos das membranas que não possuem ZnO em sua fórmula, tendo diferença significativa na região entre 3600-3200 cm⁻¹ e como característica destas blends poliméricas o deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda.

Tabela 4. Efeito no FTIR da adição do ZnO nas membranas QT/PVA/PHB do tipo A e B.

Bandas (cm⁻¹)					
	$\nu(\text{N—H})$	$\nu(\text{C=O})$		$\nu(\text{N—H})$	$\nu(\text{C=O})$
A- T80/ZnO	3261	1734	B-T80/ZnO	3277	1734
A- T80/Gli/ZnO	3261	1734	B-T80/Gli/ZnO	3261	1734
A Gli/ZnO	3288	1720	B-Gli/ ZnO	3287	1719

Estes deslocamentos evidenciados no espectro de infravermelho das amostras são conseqüências de possíveis interações do tipo ligação de hidrogênio. As ligações hidrogênio ocorrem em sistemas contendo grupo doador e um aceptor de próton. Os grupos doadores de prótons mais comuns nas moléculas orgânicas são os grupos carboxilas, hidroxila, amina e amida. Os átomos aceptores mais comuns são oxigênio, nitrogênio, halogênios e grupos insaturados. A força de ligação hidrogênio altera a constante de forças de ambos os grupos e, assim as freqüências de deformação axial e angular são alteradas, afetando assim os deslocamentos das bandas de absorção ²⁸.

Os deslocamentos observados no espectro de infravermelho das membranas quando comparados com os espectros dos compostos isolados demonstram a

afinidade entre os polímeros e aditivos que estão presentes, visando sua aplicação para engenharia de tecidos como suportes poliméricos.

5.2 Análise Termogravimétrica (TG)

A Figura 6 mostra a curva de perda de massa da QT, PHB e da blenda de QT/PVA. O PHB apresenta estabilidade somente até 170 °C, apresenta apenas um estágio de perda de massa na faixa de temperatura de 170-300°C e a cisão de cadeia resulta em uma rápida diminuição de sua massa em torno de 80%. O PHB é completamente volatilizado acima de 300°C, sendo os principais produtos oligômeros diméricos, triméricos e tetraméricos. A curva de TG da quitosana apresenta dois estágios de degradação, o primeiro entre 50-120 °C referente a perda de água na superfície e a água ligada inter e intramolecular e a partir de 250-300 °C degradação da cadeia principal. A blenda de QT/PVA apresenta menos estabilidade térmica em relação a quitosana. O primeiro estágio de perda de massa esta entre 50-150 °C referente a perda de água, o segundo estágio entre 250-300 °C referente a quebra da cadeia principal de QT. Acima de 450 °C ocorre a degradação do PVA. A menor estabilidade térmica da blenda pode ser atribuída à adição do PVA, pois este penetra entre as cadeias de QT aumentando o volume livre entre elas, além disso, o PVA possui hidroxilas que levam a maior absorção de água e aceleram o processo de perda de massa.^{15, 24}

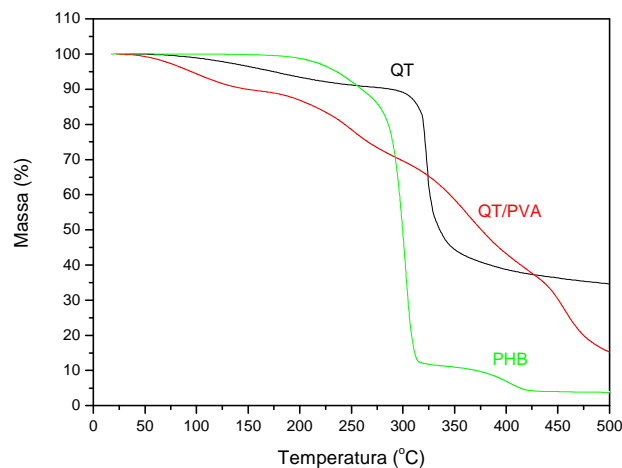


Figura 6 Termogramas a QT, PHB e da blenda QT/PVA

A Figura 7 mostra os termogramas das membranas de QT/PVA/PHB com as composições A e B. Para estas membranas de QT/PVA/PHB A e B observa-se dois estágios de degradação. O primeiro estágio entre 50 e 150 °C é atribuído a

água retida na matriz polimérica. Até 100 °C a degradação está associada a água adsorvida na superfície e, acima de 100 °C a degradação está associada a água ligada inter e intramolecular. O segundo estágio entre 200 e 300 °C corresponde a degradação da QT. A degradação do PVA ocorre em temperaturas maiores que 300 °C.

Pode-se observar que as membranas QT/PVA/PHB do tipo A e B com T80 puros ou combinadas com Gli e/ou ZnO apresentam menor perda de massa. A estabilidade térmica observada para estas membranas pode ser atribuída ao efeito reticulante do T80, que diminui a mobilidade das cadeias poliméricas. Membranas que contêm Gli apresentaram maior perda de massa. A maior taxa de degradação pode ser atribuída ao efeito plastificante da Gli, que aumenta a absorção de água e aceleram o processo de perda de massa.

As membranas do tipo B apresentam menores taxa de degradação. A maior estabilidade térmica deve-se a maior quantidade do PHB que aumenta a hidrofobicidade das blendas conferido maior estabilidade térmica e as deixam mais rígidas.

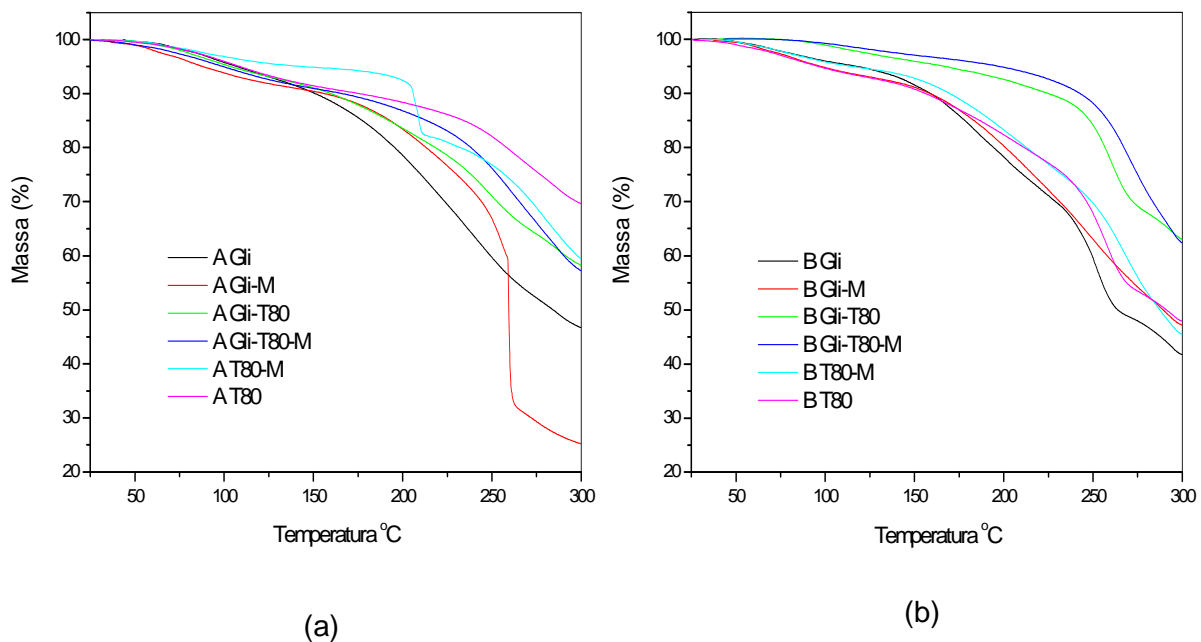


Figura 7 Termogramas das membranas (a) A-QT/PVA/PHB e (b) B- QT/PVA/PHB com a adição dos diferentes plastificantes

5.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da morfologia teve início com observações visuais qualitativas e posteriormente com a avaliação das membranas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Figuras 8, 9, 10). Nas análises qualitativas (a temperatura ambiente) foi observado que as membranas apresentaram-se esbranquiçadas, flexíveis e sem segregação de fase. As membranas com composição B apresentaram-se menos flexíveis. A perda de flexibilidade é devida ao polímero PHB que enrijece a blenda polimérica.

Os estudos da morfologia das membranas foram realizados a partir das micrografias da secção transversal das membranas do tipo A e B, que apresentam as mesmas características, e são representadas pela morfologia das membranas com composição A. As Figuras 8(a) e 8(b) das membranas que tem em sua composição apenas glicerol como aditivo, possuem morfologias semelhantes, compactas e apresentaram poucos microporos.

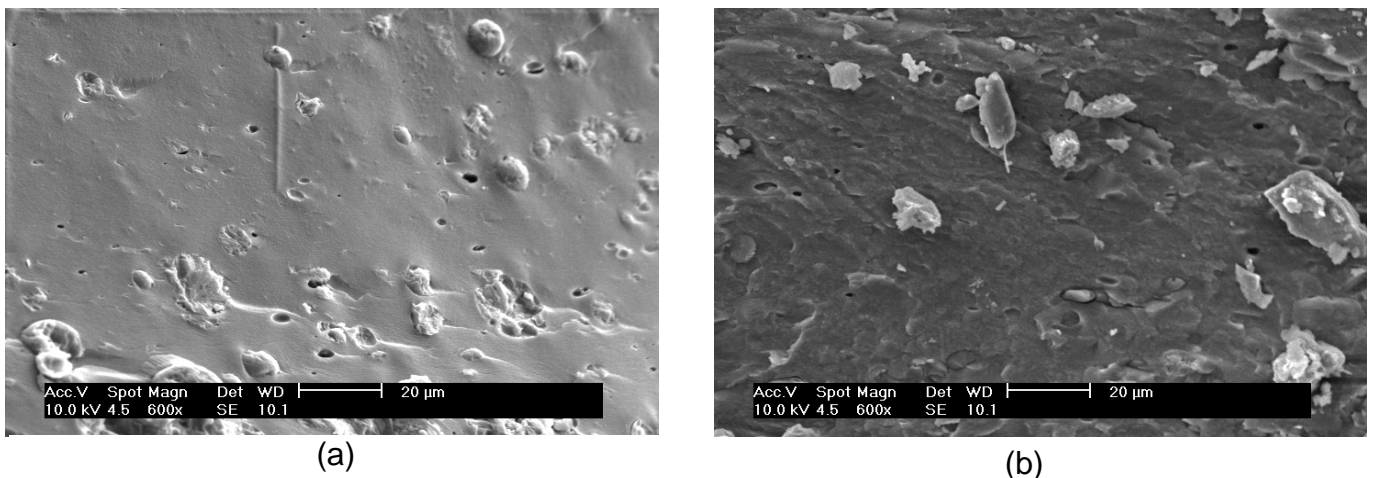


Figura 8 Micrografias das membranas (a) A-Gli e (b) A-Gli/ZnO

As Figuras 9(c) e 9(d) das membranas que possuem como plastificante T80, apresentou em suas morfologias aspecto esponjoso por possuir grande concentração de poros. A Figura 9(c) A-T80 apresenta a formação de menos de poros e maiores comparando-se a imagem da Figura 9(d) A-T80/ZnO que apresentam mais poros e com diâmetros menores.

As Figuras 10(e) e 10(f) das membranas QT/PVA/PHB que possuem os aditivos plastificantes juntos T80/Gli apresentaram menor concentração poros com diâmetros maiores e mais espalhados em relação às membranas com T80 apenas. A

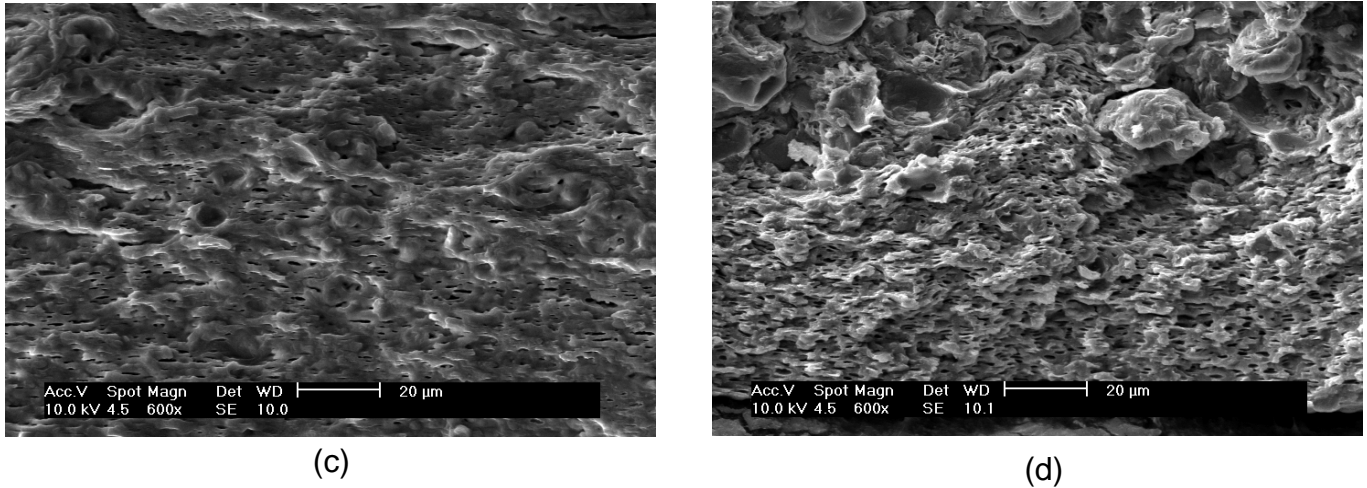


Figura 9 Micrografias das membranas (c) A-T80 e (d) A-T80/ZnO

Figura 10(e) A-T80/Gli apresenta maior quantidade de poros e com menores diâmetros em comparação com a membrana da Figura 10(f) A-T80/Gli/ZnO que apresenta menos poros e com diâmetros maiores.

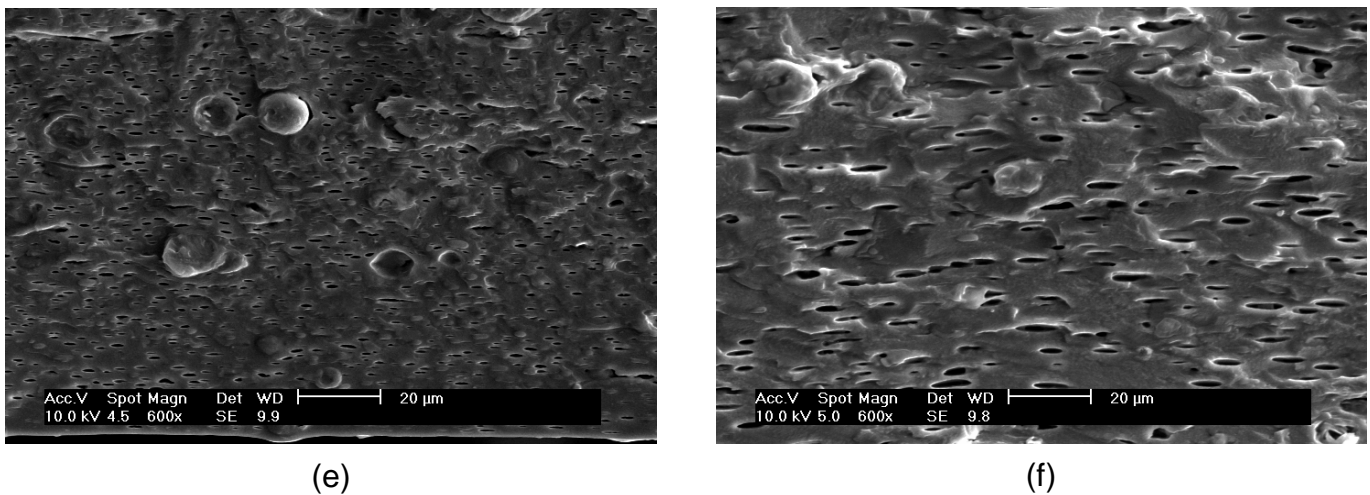


Figura 10 Micrografias das membranas (e) A-T80/Gli e (f) A-T80/Gli/ZnO

A blendas poliméricas que contém ZnO apresentaram diferenças em suas morfologia em comparação com as membranas que não possuem este aditivo em sua composição. Provavelmente as partículas de ZnO interferem nas interações intra

e intermolecular entre os componentes da blenda, possivelmente ocorre a formação de complexos obrigando a uma reorganização.

Os poros foram observados nas membranas que contém T80 em sua composição. A porosidade pode ser atribuída à estrutura anfifílica das moléculas deste plastificante, que se aglomeram em algumas regiões da blenda e formam cavidades, ou à rápida evaporação do solvente devido ao efeito reticulante do T80 tornando a membrana mais hidrofóbica.

A homogeneidade entre os polímeros e a existência de poros, observadas na morfologia das membranas, são bons indícios para o uso das membranas para confecção de suportes poliméricos aplicados na reconstituição tecidual.

5.4. Determinação do grau de intumescimento (GI) em água.

O grau de intumescimento para membranas A e B (Tabela H) demonstram como os aditivos influenciam de forma diferente na absorção de água. As membranas com composição A tem um valor de GI maior que a membrana com composição B, este comportamento possivelmente é observado devido à variação na composição de QT/PHB. A membrana com composição B tem uma maior quantidade do polímero PHB, que é hidrofóbico e dificulta a entrada da água.

Tabela 5 Grau de intumescimento (GI%) das membranas A e B.

Membranas	GI%	Membranas	GI%
A-T80		B-T80	
A-T80/ZnO		B-T80/ZnO	
A-Gli/T80/ZnO	154,63 ± 52,32	B-Gli/T80/ZnO	147,07 ± 7,43
A-Gli/ZnO	153,75 ± 33,57	B-Gli/ ZnO	121,38 ± 7,63
A-Gli/T80	84,92 ± 5,44	B-Gli/T80	68,34 ± 2,74
A-Gli	51,02 ± 3,37	B-Gli	46,78 ± 1,80

Não foi possível avaliar o GI das membranas A-T80, B-T80, A-T80/ZnO e B-T80/ZnO pois solubilizaram completamente. Pode-se atribuir a solubilização a alta concentração de poros como pode ser observado na análise das micrografias Figuras 9(c) e 9(d), que aumenta a absorção de água, Atribui-se também a solubilidade destas membranas ao T80 e ao ZnO. O aditivo T80 quando incorporado na membrana como plastificante aumenta o volume livre entre as cadeias poliméricas permitindo à entrada de água, este fenômeno ocorre devido à molécula

de T80 ser grande e do seu caráter anfifílico, ou seja, uma parte da molécula tem uma interação forte com os componentes da blenda e a outra não tão forte, deixando grandes espaços entre as cadeias. A presença das partículas de ZnO nas membranas pode provocar o afastamento das cadeias poliméricas interferindo nas interações entre os polímeros e plastificantes aumentando o caráter hidrofílico que favorece assim a entrada de água.

As membranas, A-Gli/T80/ZnO, e B-Gli/T80/ZnO foram as que tiveram o maior valor de GI. Como pode ser observado nas micrografias das membranas Figuras 9(c) e 9(d), a existência de poros favoreceu a entrada da água. Pode-se atribuir também a absorção de água ao T80 e ao ZnO. As membranas A-Gli/ZnO e B-Gli/ZnO não apresentaram poros mas apresentaram elevado GI, o intumescimento pode ser também atribuído as partículas de ZnO, conforme sugerido para as membranas A-T80/ZnO e B-T80/ZnO. As membranas A-Gli/T80 e B-Gli/T80/ZnO tiveram um valor de GI intermediário. Pode ser observada nas Figuras 10(e) e 10(f) a presença de poros. Também se pode atribuir à absorção de água, as blendas possuírem em sua em composição os dois tipos de plastificantes Gli e T80, um compacta a membrana e o outro deixa espaços entre as cadeias poliméricas, respectivamente. As membranas A-Gli e B-Gli foram as que tiveram o menor grau de intumescimento, como pode ser visto na Figura 8(a) e 8(b) não possuem poros, sendo assim, menor absorção de água, tornado as membranas menos intumescidas. A menor taxa de intumescimento possivelmente deve-se também as interações que ocorrem entre os componentes das blendas e o plastificante glicerol, compactando-a.

5.5. Teste de degradação das membranas

Comparando a degradação das membranas A e B (Tabela 5) observou-se uma menor degradação para as membranas B, com quantidade maior do polímero PHB, que confere maior hidrofobicidade à membrana. O aumento do caráter hidrofóbico das membranas diminui o acesso de água que atenua uma possível hidrólise dos polímeros da blenda, assim como a solubilização dos aditivos.

Tabela 6 Taxa de degradação-Solução de Hank

Membranas A	Degradação (%)	Membranas B	Degradação (%)
A-T80/Gli	36,65 ± 4,66	B-T80/Gli	35,04 ± 0,83
A-T80/GLI/ZnO	44,22 ± 0,95	B-T80/GLI/ZnO	43,00 ± 1,23
A-Gli	41,76 ± 0,41	B-Gli	38,03 ± 0,28
A-T80	51,09 ± 1,41	B-T80	43,05 ± 3,47
A-Gli/ZnO	52,11 ± 0,44	B-Gli/ZnO	52,73 ± 0,32
A-T80/ZnO	52,17 ± 3,77	B-T80/ZnO	36,72 ± 2,68

Os aditivos apresentaram influências sobre a degradação das membranas. As membranas contendo Tween ou glicerol com ou sem ZnO apresentaram maior degradação. As membranas contendo os dois aditivos juntos apresentaram uma menor degradação, a qual pode ser atribuída à compactação das cadeias poliméricas proporcionada pelo glicerol, associado à interface hidrofóbica que o surfactante Tween 80 pode formar. Pode ser sugerido que esta proteção causada pela mistura simultânea dos plastificantes impede a entrada de água diminuindo degradação hidrolítica das membranas.

A degradação hidrolítica causa a ruptura do polímero em unidades menores. Esta reação pode ser catalisada em condições ácidas, básicas ou outras condições, como temperatura, luz. A degradação de um sólido não está apenas associada à clivagem química da cadeia polimérica, a simples solubilização do polímero como resultado de variações no pH, pode conduzir à degradação do material.

Os principais fatores que influenciam o processo de degradação são a estabilidade química da cadeia polimérica, a hidrofobicidade da unidade repetitiva, a morfologia do polímero, a cristalinidade, a massa molar inicial do polímero, a presença de catalisadores, aditivos plastificantes, e a geometria do implante. A hidrofobicidade pode evitar a absorção de água pelo polímero, reduzindo assim as taxas de hidrólise. Em polímeros hidrofóbicos, a degradação é geralmente um fenômeno superficial com erosão lenta do polímero, em polímeros hidrofílicos a degradação ocorre normalmente até o interior do material. Assim, qualquer tratamento que altere a hidrofobicidade do polímero, tais como orientação e cristalinidade, afeta a sua taxa de degradação.

6.0. Conclusões

Neste estudo foram preparadas e caracterizadas membranas de blendas de quitosana (QT), poli (álcool vinílico) (PVA) e poli (β -hidroxibutirato) (PHB). A estas membranas foram adicionados aditivos, como o glicerol (Gli), o Tween 80 (T80) e ZnO, visando aplicação como suportes poliméricos na reconstituição tecidual. Estas membranas foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, Análise Termogravimétrica(TG), morfologia, grau de intumescimento e teste de degradação na solução de Hank.

No estudo da espectroscopia de infravermelho foram identificadas bandas referentes aos polímeros utilizados e foram verificados os principais deslocamentos causados pela adição dos plastificantes e foram semelhantes para membranas do tipo A e B.

A análise termogravimétrica mostrou que adição dos plastificantes altera a temperatura de degradação e que as membranas do tipo B foram mais estabilidade térmica (menor perda de massa foi). As membranas com o T80 se mostraram mais estáveis do com o plastificante Gli. A membrana que apresentou maior estabilidade foi B-T80/Gli/ZnO.

As análises da morfologia das membranas mostraram a presença de poros para membranas que continha T80 em sua composição. As membranas que apresentaram maior concentração de poros foram A-T80/ZnO e B-T80/ZnO, semelhantes entre si.

O teste de intumescimento mostrou que as membranas do tipo B absorvem menos água e que a adição de T80 com ou sem ZnO favorece o intumescimento. A membrana que menos intumescceu foi B-Gli.

O teste de degradação mostrou que membranas do tipo B degradaram menos e que a adição dos plastificantes T80 e Gli juntos confere maior estabilidade a degradação.

As membranas preparadas apresentaram estruturas porosas, que permitem a fixação e crescimento das células, o transporte de oxigênio e nutrientes. Apresentaram resistência térmica acima de 100 °C.

7.0. Referências Bibliográficas

1. Wang, T-W.; Wu, H-C.; Huang, Y-C.; Sun, J. S.; Lin, F-H.; *Biomimetic Bilayered Gelatin-Chondroitin 6 Sulfate-Hyaluronic Acid Biopolymer as a Scaffold for Skin Equivalent Tissue Engineering*. *Artificial Organs* 30, **(2006)**, 141-149. doi: 10.1111/j.1525-1594.2006.00200.
2. Hou, Q.; Grijpma, D. W.; Feijen, J.; *Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique*. *Biomaterials* 24, **(2003)**, 1937–1947.
3. Hutmancher, D. W.; *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. *Biomaterials* 21, **(2000)**, 2529-2543.
4. Mano, J. F.; Hungerford, G.; Ribelles, J. L. G.; *Bioactive poly(L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds*. *Materials Science and Engineering: C*, doi: 10.1016/j.msec.2008.03.005.
5. Hunt, T. K. *The effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis*. *Surgical Gynecology Obstetrics* 135, **(1972)**, 561-577.
6. Barbanti, S. H.; Zavaglia; C. A. C.; Duek, E. A. R.; *Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15, **(2005)**, 13-21.
7. Costa Jr., E. S.; Mansur, H. S.; *Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/ Poli (Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido*. *Quim. Nova* 21, **(2008)**, 1460-1466.
8. Tuzlakoglu, K.; *Estruturas de fibra à base de polímeros de origem natural para da engenharia do tecido*. Tese de doutoramento em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade do Minho, **(2008)**, Portugal.
9. Canevarolo Jr. Sebastiao V. *Ciências dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, Artliber Editora, **(2002)**, São Paulo.
10. Queiroz, D. C.; Dias F. R.; Nascimento, R. F.; Lima, M. B.; *Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana*; *Quim. Nova*, 31, **(2008)**, 160-163
- 11 Battisti, M. V.; Campana Filho, S. P.; *Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de Macrobrachium rosembergii*; *Quim Nova*, 31, **(2008)**, 2014-2019.

- 12 Vitali, L.; Laranjeira, M. C. M.; Gonçalves, N. S.; Fávere, V. T.; *Microencapsulação do agente quelante sulfoxina em microesferas de quitosana preparadas por spray drying como novo adsorvente para íons metálicos*. Quim. Nova 31, **(2008)**, 1400-1404.
- 13 Mello, R. S.; Bedendo, G. C.; Nome, F.; Fiedler, H. D.; Laranjeira, M. C. M.; *Preparation of chitosan membranes for filtration and concentration of compounds under high pressure process*. Polymer Bulletin 56, **(2006)**, 447-454.
- 14 Pezzin, S. H; Pires; gelsanger, N; Formolo, M. C; Pezzin, A. P. T. Schneider, A. L. S.; Furlan, S. A.; Bernardo, H. P. A. T. N.; Duek, E. A. R.; *Blendas Biodegradáveis de poli (hidroxibutirato)/Poli(ϵ -Caprolactona): Obtenção e Estudo da Miscibilidade*; Materials Research; 6 **(2003)** 359-365.
15. Mendonça, R. H; *Imobilização de Fibronectina na Superfície de Suportes Porosos de PHB Para Aplicação em Engenharia Óssea*; Dissertação de mestrado; Universidade Federal do Rio de Janeiro **(2008)**
16. Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Rocha, R. C. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C.; *Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no brasil*. Quim. Nova 30, **(2007)**, 1732-1743.
17. Rosa, D. S.; Chuí, Q. S. H.; Pantano Filho, R.; Agnelli, J. A. M.; *Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado*. Polímeros: Ciência e Tecnologia 12, **(2002)**, 311-317.
18. Aranha, I. B.; Lucas, R. F.; *Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo*. Polímeros: Ciência e Tecnologia 11, **(2001)**, 174-181.
19. Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Dekker, R. F. H.; Barbosa; A. M., *Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo Botryosphaeria SP*; Acta Scientiarum. Biological Sciences, 26, 4, **(2004)** 463-470.
20. Gennadios, A; *Protein-Based Films and Coatings*, Florida CRC Press, **(2002)**.
21. Martelli, S. M; *Obtenção e Caracterização de Filmes de Queratina de penas de frango*; Dissertação de mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina **(2005)**.
22. Abrarov, S. M.; Yuldashev, S. U.; Lee, S. B.; Kang, T. W.; *Journal of Luminescence*; 109, (2004), 25-29.

23. Costa, A., C., F.; Ramalho, M., A., F.; Neiva, L., S.; Alves Jr, S.; Kiminami, R.,H.,G.,A., L.; Gama; L.; *Avaliação do tamanho da partícula do ZnO obtido pelo método Pechini; Revista Eletrônica de Materiais e Processos*,2.3 **(2007)**,14-19.
24. Vicentini, D. S.; Smania Jr. A.; Laranjeira, M. C. M.; Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers; *Materials Science and Engineering*; **(2009)**.
25. Ding, S.J.; *Biodegradation behavior of chitosan/calcium phosphate composites. Journal of Non-Crystalline Solids* 353, **(2007)**, 2367-2373.
26. Matsui, M.; *Correlações entre Estrutura Química, Super-Estrutura Macromolecular e Morfologia das Blendas e Redes Poliméricas a Base de Quitina e Poliuretano*; Dissertação de mestrado; Univercidade Federal do Paraná; **(2007)**.
27. Cardenas, G; Miranda, S, P; FTIR And TGA Studies of Chitosan Composites Films; *J. Chil. Chem. Soc*; 4, **(2004)**, 49.
28. Silverstein, R., M; Bassler, G.,. C,. E; Morrill, T, C; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley and Sons Editora; **(1981)**; New York.