



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA  
LEGAL – BIONORTE**



**PREPARAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS À BASE DE COLÁGENO PÍSCEO E  
QUITOSANA**

**ROSIANE SILVA PENHA**

São Luís - MA

2016

**ROSIANE SILVA PENHA**

**PREPARAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS À BASE DE COLÁGENO PÍSCEO E  
QUITOSANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Jaciene Jesus Cardoso Rocha

São Luís - MA

2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SILVA PENHA, ROSIANE.

PREPARAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS À BASE DE COLÁGENO  
PÍSCOE QUITOSANA / ROSIANE SILVA PENHA. - 2016.

99 f.

Coorientador(a): JACIENE JESUS CARDOSO ROCHA.

Orientador(a): CÍCERO WELLINGTON BRITO BEZERRA.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS-MA, 2016.

1. BIOMATERIAIS. 2. BLENDA. 3. COLÁGENO. 4. QUITOSANA. I.  
BRITO BEZERRA, CÍCERO WELLINGTON. II. JESUS CARDOSO ROCHA,  
JACIENE. III. Título.

**ROSIANE SILVA PENHA**

**PREPARAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS À BASE DE COLÁGENO PÍSCEO E  
QUITOSANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jaciene Jesus Cardoso Rocha

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

Departamento de Química - UFMA

---

Prof. Dr. Maurício Boscolo

Departamento de Química e Ciências Ambientais- UNESP

---

Prof. Dr. Antônio Francisco Fernandes de Vasconcelos

Departamento de Química e Biologia- UEMA

---

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Departamento de Tecnologia Química – UFMA

---

Prof. Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia Silva Luz

Departamento de Química – UFMA

São Luís – MA

2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, por não ter me abandonado nos meus piores momentos, por me deixar chorar a noite inteira, mas logo de manhã dá-me o consolo. Por não desistir de mim um só momento, e quando pensava que estava sozinha, sentia tua mão protetora me carregando nos braços, me dizendo que não permitiria nada que não superaria. Como te amo meu Senhor, obrigada meu pai, obrigada Deus.

À minha mãe, Maria de Jesus S. Penha que mesmo não estando mais aqui, deixou seu amor, sua garra e coragem. Aprendi a ter coragem com ela, ah “como gostaria que estivesse aqui”, sempre dizia que iria dar-te uma vida de rainha, não deu tempo. Mas carrego comigo seus ensinamentos e espero transmiti-los um pouco deles a minha filha. Sei que tinha muito orgulho de mim, dizia isso às pessoas, me apoiava em todas as decisões, sonhava junto comigo. Só tenho que te agradecer muito minha rainha, essa tese de doutorado também é sua.

À meu pai, José Leozínio S. Penha, que depois da minha mãe merece também todo o meu agradecimento. A você meu pai que assumiu todas as responsabilidades agora que nossa mãe não está mais aqui, que acorda 5 horas da manhã pra fazer café e almoço para os filhos levar para o trabalho, que cuidou da neta a partir de 2 meses até os 11 meses para eu poder fazer os experimentos desta tese no LIM. Amo você meu velhinho (como diz Natália), cuido de você e você cuida de mim. A você o meu mais sincero agradecimento.

À minha filha, Natália S. P. Pimenta que trouxe vida para toda a minha família, que ilumina minha vida todos os dias. A você meu amor, minha pequena, a você que diz: mãe, você é linda, você não é feia não, eu te amo, e me enche de beijos, aí não resisto. Você foi o motivo para eu não desistir, e se hoje estou aqui, devo a você também. Sim, pensei em desistir várias vezes, e tive motivos fortes para isso, mas não desisti, não sei por que, mas não desisti. A você filha que foi motivo das minhas maiores dificuldades e limitações, mas também motivo de muita alegria. Eu te amo Natália Pimenta.

A meus irmãos, Joseane Penha, Cleonice Melo, Romilson Penha e Gilson Duarte que torceram por mim. Joseane queria ler meus artigos em inglês e escrever minha tese na época da qualificação, nunca vou esquecer, só pra me ajudar, mas tem coisa que só nós mesmos podemos fazer, mas te agradeço minha mana dotada de

inteligência, a psicóloga da família. Eu te ajudo e tu me ajudas. Cleonice que cuidou de Natália tantas vezes para eu escrever este trabalho, e cuidou com amor e dedicação. Eu te agradeço mana de coração, sei que tens bondade no coração e não hesita em nenhum momento em ajudar o próximo. Deus te abençoe. Romilson e Gilson, meus manos, que quando a família e os amigos comentam eles falam: minha irmã é muito dedicada e inteligente, se fosse para outro estado estaria bem, ganhando muito dinheiro, rsrs. Amo vocês meus manos, vocês são os craques da família como dizia nossa mãe.

Ao meu orientador, Cicero W. B. Bezerra, por ter acreditado em mim, por não ter me deixado desistir, sim, o meu orientador também não me deixou desistir! Sempre com suas palavras de incentivo e amor, jamais esquecerei, enxugou minhas lágrimas várias vezes, desde a graduação (fiz duas monografias com ele: química industrial e química licenciatura), sou sua filha de iniciação científica, de mestrado e agora de doutorado. Meus primeiros passos na pesquisa foram com ele, um verdadeiro Pai! Detalhe: se credenciou no BIONORTE só para me orientar, para me ajudar, pois a bondade do seu coração é tamanha, sempre digo: professor, se o senhor não for para o céu, ninguém mais vai, dizia isso para a minha mãe também, comparo a bondade dos dois. Meu professor, meu orientador, meu mestre: Dr. Cícero Bezerra, eu te agradeço.

À minha co-orientadora, Jaciene Cardoso, pelos conselhos e pelos ensinamentos, por compartilhar conosco as pizzas no laboratório nos dias de quarta feira, rsrs. À você meu muito obrigada.

À Mariana Arruda e Ana Carolina Dias, pela força, pelas palavras de ânimo, e por não me deixarem desfalecer, pois vocês também contribuíram para que eu não desistisse e chegasse até aqui. Obrigada amigas pela companhia durante esta caminhada no doutorado, amizade firmada que levarei para a minha vida. Amo vocês.

À minha primeira aluna de iniciação científica Andressa Coelho, pelo auxílio, pelo apoio e pela paciência nos meus momentos de desespero. Quando já não tinha força, você me inspirou minha aluna inteligente. A você meus agradecimentos.

Ao LIM (Laboratório de Interfaces e Materiais), finalmente, ao meu laboratório, deixei por último para caprichar, afinal foi aqui que passei a maior parte das horas do meu dia durante esta jornada, desde 2014. Ao chegar, ainda tímida, sem conhecer ninguém, me lembro como se fosse hoje, vinha por que era o jeito. Mas o tempo, ah o tempo, o tempo e a convivência com os integrantes me fez amar o laboratório, minha segunda casa, vou sentir muitas saudades. Agradeço a esta grande família LIM, aos integrantes LIM, Liane Miranda, Carla Cavalcante, Luziane Maia,

Suringo Falcão, Marta França, Chirlene Botelho, Antônio Junior, Clayane Santos, Nataliane Lima e Eliana Costa, alguns ainda estão aqui, outros não, mas vão sempre fazer parte da família LIM. Sei que me consideram hoje a mãe do laboratório e eu os considero como filhos, embora não tenha idade para isso, rsrs. Agradeço muito a vocês meus filhos. Clayane foi a primeira que conheci e me ajudou em muitas coisas, até hoje me ajuda, sou eternamente grata. Liane, é minha filha do laboratório gente, faço um monte de coisa por ela e ela por mim, o carinho e gratidão é recíproco, tão meiga minha menina, vou levá-la sempre no meu coração! Carla, companheira das conversas e de alguns desabafos, ah momentos de descontração, precisamos conversar sobre outras coisas que não seja pesquisa ou pós-graduação não é mesmo? Eliana minha menina, você faz falta, teu sorriso e tuas gargalhadas enchiam de alegria a nossas tardes no LIM. Luziane ‘Nega’ você sempre acreditou em mim e isso foi importante viu? Quando você não vem, o laboratório fica vazio. Suringo meu filho, reclama, reclama, mas sempre faz tudo que peço, obrigada por tudo. Nataliane meu bem, te conheci mais de perto no fim do teu mestrado, mas você me ajudou muito, tens um espaço grande no meu coração. Martha, Chirlene e Antônio, os dias são mais alegres no LIM com suas presenças. Guardarei cada um no meu coração, jamais esquecerei os momentos de confraternização, os almoços, os lanches, as comemorações, as festas quando cada um de nós alcançava uma conquista, e detalhe, a maioria eu que inventava! Família LIM amo muito.

Hoje só tenho a agradecer a Deus e a todos vocês por ter chegado até aqui. Sim, cheguei, quase não acredito, mas cheguei ao fim, mesmo com tantos obstáculos e dificuldades e com todas as atribuições que tenho: mãe, dona de casa e professora realizei o sonho de conclusão desta tese.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

Quitosana (QT) e colágeno (COL) são macromoléculas naturais de amplo interesse e aplicação, e que podem interagir entre si formando blendas com características de um biomaterial. Neste trabalho, em virtude das vantagens dos colágenos píceos, definiram-se rotas de sínteses para blendas entre estes dois biopolímeros. Dentre as propostas de sínteses investigadas, foram empregadas as técnicas de liofilização e precipitação seletiva (salina, alcalina, salino-alcalina) em misturas QT:COL nas proporções (m%) de 80:20, 50:50 e 20:80. A quitosana empregada foi de origem comercial e com grau de desacetilação (GD) determinado por titulação condutométrica de 82 %, e o colágeno foi extraído da bexiga natatória e da pele da Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*) e da Gurijuba (*Arius luniscutis*). O conteúdo de colágeno nos géis preparados foi determinado pelo método da 4-hidroxi prolina, e equivalente a 189,24 - 394,75 mg.g<sup>-1</sup>. Ambos os materiais foram caracterizados separadamente e em conjunto por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR), difratometria de Raios-X (DRX), análise térmica (TG, DSC e DTA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados das caracterizações indicaram, quanto aos precursores, que a integridade estrutural proteica do colágeno foi preservada durante a extração e precipitação (FTIR), que o mesmo apresentou-se em uma forma amorfa (DRX), rugosa e irregular (MEV). A quitosana apresentou-se amorfa, mas com certos domínios cristalinos (DRX), rugosa (MEV) e estável termicamente até, aproximadamente, 250 °C. Os materiais obtidos a partir das misturas QT:COL, nas diversas proporções, apresentaram diferenças em seus perfis espectral, térmico e de viscosidade em relação aos precursores, indicando interação entre as matrizes e a obtenção de novos materiais.

**Palavras-chaves:** quitosana, colágeno, blendas, biomateriais

## ABSTRACT

Chitosan (QT) and collagen (COL) are natural macromolecules of wide interest and application, and which can interact themselves in order to develop blends with biomaterial characteristics. In this work, on account of the fish collagen advantages, we aimed to develop synthesis routes among both biopolymers. It was used chitosan from commercial source, with 82% of deacetylation degree (DG) determined by conductometric titration, and the collagen was extracted from the swimming bladder and the skin of the *Pescada Amarela* (*Cynosian acoupa*) and *Gurijuba* (*Arius luniscutis*). The collagen's content used on the prepared gels was determined by the 4-hydroxyproline's method and equal to 189,24-394,75 mg.g<sup>-1</sup>. Both materials were separately characterized through Fourier transform infrared spectroscopy in the infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD), thermal analysis (TGA/DTG and DSC) and scanning electron microscopy (SEM). Amongst the proposed blend's synthesis, lyophilization and selective precipitation techniques (saline, alkaline, saline-alkaline) were used in the following QT:COL (wt%) mixtures: 80:20, 50:50 and 20:80. Regarding to precursors, the results of the characterization indicated that the protein structural integrity of the collagen was preserved during extraction and precipitation (FTIR), that it presents an amorphous form (XRD), rough and irregular (SEM). Chitosan also showed amorphous, but with some crystalline domains (XRD), rough (SEM), and thermally stable up to approximately 250 ° C. The obtained materials from chitosan:collagen mixtures and in all different proportions, showed differences in their spectral, thermal and viscosity profiles, indicating interaction between them and suggesting the formation of new materials.

**Keywords:** chitosan, collagen, blends, biomaterials

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Figura representativa da estrutura primária do colágeno.....	19
<b>Figura 2</b> - Estrutura da glicina (a), prolina (b) e hidroxiprolina (c). .....	19
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da tripla hélice do colágeno .....	20
<b>Figura 4</b> - Representação da desnaturação do colágeno.....	21
<b>Figura 5</b> - Representação da estrutura terciária do colágeno.....	21
<b>Figura 6</b> - Representação da estrutura quaternária do colágeno.....	22
<b>Figura 7</b> - Estruturas químicas da quitina (a) e quitosana (b).....	24
<b>Figura 8</b> - Fluxograma de extração do colágeno .....	33
<b>Figura 9</b> - Esquema reacional simplificado empregado para a determinação da hidroxiprolina. (I) - Hidroxiprolina; (II) - ácido $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -hidroxi- $\delta$ -aminovalérico; (III) - ácido $\Delta^2$ -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico; (IV, V) - ácido pirrol-2-carboxílico; (VI) - pirrol. ....	34
<b>Figura 10</b> - Curva analítica para a determinação da 4-hidroxiprolina ( $\lambda = 560$ nm).....	36
<b>Figura 11</b> - Curva de titulação condutométrica da amostra de quitosana.....	42
<b>Figura 12</b> - Teores de 4-hidroxiprolina e de colágeno para bexiga e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba.....	42
<b>Figura 13</b> - Análises físico-químicas (composição centesimal) dos colágenos extraídos das bexigas natatórias e peles da Pescada Amarela e da Gurijuba.....	44
<b>Figura 14</b> - Espectro de FTIR para a quitosana.....	45
<b>Figura 15</b> - Espectros FTIR para os colágenos obtidos a partir da bexiga natatória e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba. ....	47
<b>Figura 16</b> - Curvas da viscosidade reduzida em função da concentração das soluções dos biopolímeros ( $\text{g.L}^{-1}$ ). Valores de regressão: Quitosana ( $y = 0,7253 + 0,2666C$ , $R = 0,993$ ), B-PA ( $y = 0,08227 + 0,00679C$ , $R = 0,927$ ), P-PA ( $y = 0,05168 + 0,00215C$ , $R = 0,881$ ), B-GJ ( $y = 0,18252 + 0,01086C$ , $R = 0,995$ ), P-GJ ( $y = 0,13523 + 0,01003C$ , $R = 0,973$ )......	51
<b>Figura 17</b> - Difratoograma de Raios-X da Quitosana .....	53
<b>Figura 18</b> - Difratoograma do colágeno a partir da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba.....	54
<b>Figura 19</b> - Curvas de TG/DTG para a quitosana em atmosfera de $\text{N}_2$ .....	55
<b>Figura 20</b> - Curva de DTA da quitosana, em atmosfera de $\text{N}_2$ .....	57
<b>Figura 21</b> - Curva DSC para a quitosana, em atmosfera de $\text{N}_2$ .....	57

<b>Figura 22</b> - Curvas de TG para a bexiga e pele da Pescada Amarela em atmosfera de N <sub>2</sub> .....	59
<b>Figura 23</b> - Curva de DTA do colágeno a partir da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba em atmosfera de N <sub>2</sub> . ....	59
<b>Figura 24</b> - Micrografia da quitosana. Aumento de 400x .....	60
<b>Figura 25</b> - Micrografias de colágeno da bexiga (a) e pele (b) da Pescada Amarela ....	61
<b>Figura 26</b> - Micrografias de colágeno da bexiga (a) e pele (b) da Gurijuba. ....	61
<b>Figura 27</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.....	62
<b>Figura 28</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.....	63
<b>Figura 29</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.....	63
<b>Figura 30</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.....	64
<b>Figura 31</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. ....	66
<b>Figura 32</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. ....	66
<b>Figura 33</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.....	67
<b>Figura 34</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. ....	67
<b>Figura 35</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.....	68
<b>Figura 36</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.....	68
<b>Figura 37</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.....	69
<b>Figura 38</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.....	69
<b>Figura 39</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.....	70

<b>Figura 40</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.....	70
<b>Figura 41</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.....	71
<b>Figura 42</b> - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.....	71
<b>Figura 43</b> - Viscosidade da quitosana, do colágeno e das blendas produzidas. ....	76
<b>Figura 44</b> - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas liofilização. ....	78
<b>Figura 45</b> - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaOH/NaCl. ....	78
<b>Figura 46</b> - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaOH.....	79
<b>Figura 47</b> - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaCl.....	79
<b>Figura 48</b> - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por liofilização.....	81
<b>Figura 49</b> - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. ....	81
<b>Figura 50</b> - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaOH.....	82
<b>Figura 51</b> - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaCl.....	82
<b>Figura 52</b> - Micrografias da (a) quitosana, (b) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (c) 80:20, (d) 50:50 e (e) 20:80, obtidas por liofilização. Aumento de 400x .....	85
<b>Figura 53</b> - Micrografias da (a) quitosana, (b) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (c) 80:20, (d) 50:50 e (e) 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. Aumento de 400x .....	86
<b>Figura 54</b> - Micrografias da (a) quitosana, (b) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (c) 80:20, (d) 50:50 e (e) 20:80, obtidas por precipitação com NaOH. Aumento de 400x .....	87
<b>Figura 55</b> - Micrografias da (a) quitosana, (b) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (c) 80:20, (d) 50:50 e (e) 20:80, obtidas por precipitação com NaCl. Aumento de 1000x .....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais tipos de colágenos e localização.....	23
<b>Tabela 2</b> - Medidas de viscosidade da quitosana e dos colágenos extraídos da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba. ....	49
<b>Tabela 3</b> - Rendimento (%) das blendas obtida QT:COL para as proporções 80:20, 50:50 e 20:80. Valores em negrito e em itálico indicam, respectivamente, o maior e o menor rendimento observado. ....	74
<b>Tabela 4</b> - Teor de Hidroxiprolina e de Colágeno dos blendas obtidos nas três proporções (80:20, 50:50 e 20:80) de quitosana/colágeno de bexiga e pele da Pescada Amarela e de Gurijuba com as três rotas de preparação (precipitação com NaOH/NaCl, NaOH e NaCl). ....	75
<b>Tabela 5</b> - Medidas de viscosidade das misturas QT:B-GJ .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

QT = quitosana

COL = colágeno.

B PA = bexiga da pescada amarela.

P PA = pele da pescada amarela.

B GJ = bexiga da gurijuba.

P GJ = pele da gurijuba.

$P_p$  = (recipiente + amostra úmida) – (recipiente + amostra seca) em g

$P_a$  = peso da amostra em g

$P_c$  = (peso do recipiente + amostra após procedimento) – peso do recipiente vazio em g

$V_n$  = diferença entre o volume de HCl e o volume de NaOH gasto na titulação na determinação de proteína

C = cinzas

N = nitrogênio

U = umidade do colágeno

P = proteínas

4-Hy = 4-hidroxiprolina

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Biomaterial .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Colágeno .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Quitosana.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Blendas de colágeno/quitosana .....</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Purificação da quitosana .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinação do grau de desacetilação da quitosana (% GD) .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Extração do Colágeno.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinação do teor da 4-hidroxirolina (4-Hy) do colágeno.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise bromatológica do Colágeno.....</b>	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Preparação das blendas: Quitosana/Colágeno.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8</b>	<b>Caracterização da quitosana, colágeno e das blendas quitosana/colágeno .....</b>	<b>38</b>
4.8.1	Medidas de viscosidade.....	38
4.8.2	Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR).....	39
4.8.3	Difratometria de raios-X (DRX) .....	40
4.8.4	Análise Térmica (TG/DTG, DTA e DSC) .....	40
4.8.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Determinação do grau de desacetilação da quitosana (% GD) .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação do teor de hidroxiprolina do Colágeno .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Análises Físico-Químicas do Colágeno .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>Caracterizações dos polímeros precursores: Quitosana e Colágeno .....</b>	<b>45</b>
5.5.1	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	45
5.5.2	Viscosidade e massa molar.....	48
5.5.3	Difratometria de Raios-X - DRX .....	53

5.5.4	Análises Térmicas - Análise Termogravimétrica (TG/DTG) / Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) / Análise Térmica Diferencial (DTA) .....	54
5.5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	60
<b>5.6</b>	<b>Caracterização das Blendas Quitosana:Colágeno .....</b>	<b>61</b>
5.6.1	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....	62
5.6.2	Rendimento e Teor de hidroxiprolina e Colágeno .....	73
5.6.3	Difratometria de Raios-X - DRX .....	77
5.6.4	Análise Térmica Diferencial – DTA .....	80
5.6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	83
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>90</b>

### 1. INTRODUÇÃO

Colágeno (COL) e quitosana (QT) não coexistem na natureza, mas são miscíveis em soluções ácidas e podem interagir formando ligações de hidrogênio que se alternam com as hélices do colágeno. Estas interações parecem envolver os grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ) da quitosana e carboxílico ( $\text{COO}^-$ ) do colágeno, de modo que as propriedades biológicas de interesse, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e ausência de toxicidade podem ser preservadas e melhoradas com a mistura e, assim, empregadas na produção de novos biomateriais (MACIEL, 2008; TARAVEL; DOMARD, 1993).

Os biomateriais à base de colágeno e quitosana podem ser processados de inúmeras formas, tais como: pós, géis, hidrogéis, filmes, membranas e esponjas, a partir da mistura de soluções com diferentes proporções dos dois biopolímeros, obtendo-se blendas com propriedades melhoradas em relação a seus precursores. Para estes materiais encontram-se várias aplicações, especialmente nas áreas farmacêutica e biomédica, como por exemplo, em sistemas de liberação de fármacos e em engenharia de tecidos, para revestimento de queimaduras e outras lesões na pele (TARAVEL; DOMARD, 1993; SIONKOWSKA et al., 2006; HORN et al., 2009; SIONKOWSKA et al., 2004; DASH et al., 2011; LIMA et al., 2006; CHEN et al., 2008; THACHARODI; PANDURANGA, 1995; YE et al., 2007; JIANKANG et al., 2007; CAETANO JÚNIOR; LOBO, 2011; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; SOUZA, 2013).

O colágeno é geralmente obtido a partir de espécies animais (bovinos e suínos). No Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne bovina, em função da elevada produção brasileira de carne para exportação. Porém, existe uma grande desvantagem no uso desse tipo de colágeno, devido ao risco de transferência de doenças, notadamente a encefalopatia espongiiforme bovina e a febre aftosa. Portanto, há um declarado interesse em outras fontes mais seguras de colágeno, a exemplo de peixes, em virtude da grande disponibilidade, baixo risco de transmissão de doenças, alto rendimento no processo de extração e ausência de toxicidade (SOUZA, 2013; SILVA; PENNA, 2012; FERNANDES et al., 2008; SOUSA; BEZERRA, 2010; SENARATNE et al., 2006; SOUSA, 2008).

A grande maioria dos métodos empregados para a preparação das blendas QT:COL utiliza o princípio de evaporação de solvente por secagem ao ar, ou sob vácuo (SIONKOWASKA et al., 2003; MONTOYA et al., 2010). Este método deixa dúvidas

quanto a real interação entre os biopolímeros e favorece mais a obtenção de géis e filmes destes materiais. Portanto, além de empregar uma fonte alternativa e viável de colágeno na obtenção de blendas biopoliméricas, este trabalho também considerou rotas alternativas, de baixo custo e fácil manipulação, para a produção de pós QT:COL. Ambas macromoléculas são solúveis em meio ácido, notadamente ácido acético, entretanto, enquanto é possível precipitar colágenos por adição de NaCl, a quitosana precipita pela desprotonação dos grupos  $\text{NH}_3^+$ , mediante adição de base (NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Estudos comparativos envolvendo precipitação salina, alcalina, salino-alcalina, bem como por liofilização para uma série de misturas QT:COL nas proporções em massa 80:20, 50:50 e 20:80, foram realizados, contribuindo para o entendimento da interação entre os precursores e possibilitando a obtenção de produtos na forma de pós, os quais poderão ter interesse tecnológico e comercial elevados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biomaterial**

Biomaterial pode ser definido como qualquer substância, ou combinação de substâncias, capaz de atuar ou interagir, parcial ou totalmente, em sistemas biológicos. No corpo humano, estes materiais são empregados para tratar, melhorar ou substituir tecidos, órgãos ou função do corpo por qualquer período de tempo. A sua origem pode ser natural, natural modificada ou totalmente sintética, a exemplos de: implantes, próteses, marcapassos, lentes de contato, dentre outros (PEDROSO, 2009).

Os biomateriais devem apresentar biocompatibilidade que corresponde a habilidade do material induzir uma resposta adequada a uma aplicação específica com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas quando em contato com o organismo (PEDROSO, 2009).

### **2.2 Colágeno**

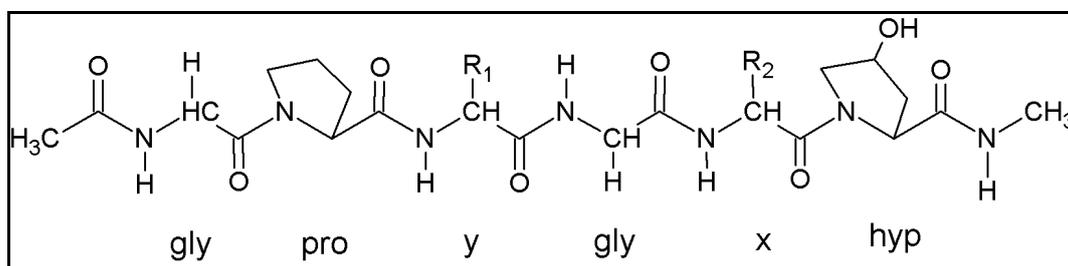
O colágeno é um polímero natural e é a principal proteína estrutural presente no organismo encontrado em todos os animais multicelulares. O termo colágeno existe há muito tempo e é derivado das palavras gregas *Kolla* (cola) e *Genno* (produção) e tem sido empregado como matéria-prima na produção de cola animal (SOUZA, 2013).

O colágeno constitui cerca de 30% de toda a matéria-prima orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais do corpo. O termo “colágeno” é atualmente utilizado para denominar uma família de pelo menos 27 isoformas de proteínas encontradas em tecidos conjuntivos ao longo do corpo, como nos ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes e músculos. Em combinação com sais de cálcio, o colágeno é responsável pela estrutura rígida dos ossos, e em combinação com outra proteína, as elastinas, forma estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais, por exemplo, para a aorta e os pulmões (SOUZA, 2013; PRESTES, 2013; WANG; STEGEMANN, 2010; TARAVE; DOMARD, 1993)

A proteína de colágeno tem uma conformação hierárquica complexa, dividida em quatro estruturas: estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária (FERREIRA et al., 2012).

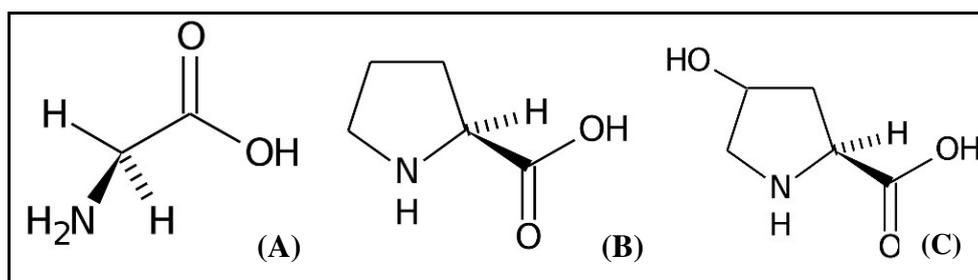
A estrutura primária do colágeno (esquema representativo, Figura 1) é caracterizada pela longa sequência tripeptídica Gly-X-Y, onde a Gly (glicina) é achada a cada três repetições de  $(\text{Gly-X-Y})_n$  e onde frequentemente X é a prolina e Y a hidroxiprolina. Os principais aminoácidos da estrutura do colágeno (glicina, prolina e hidroxiprolina) estão representados na Figura 2 (SENA, 2004). Outros aminoácidos também são encontrados, porém em menor proporção, juntamente com a glicina, em substituição do X e Y, na sequência tripeptídica. Dentre eles: lisina, arginina, glutamina e tirosina (FERREIRA et al., 2012; ASHOKKUMAR et al., 2012; SENNA, 2004).

**Figura 1** - Figura representativa da estrutura primária do colágeno.



Fonte: SENNA, 2004.

**Figura 2** - Estrutura da glicina (A), prolina (B) e hidroxiprolina (C).

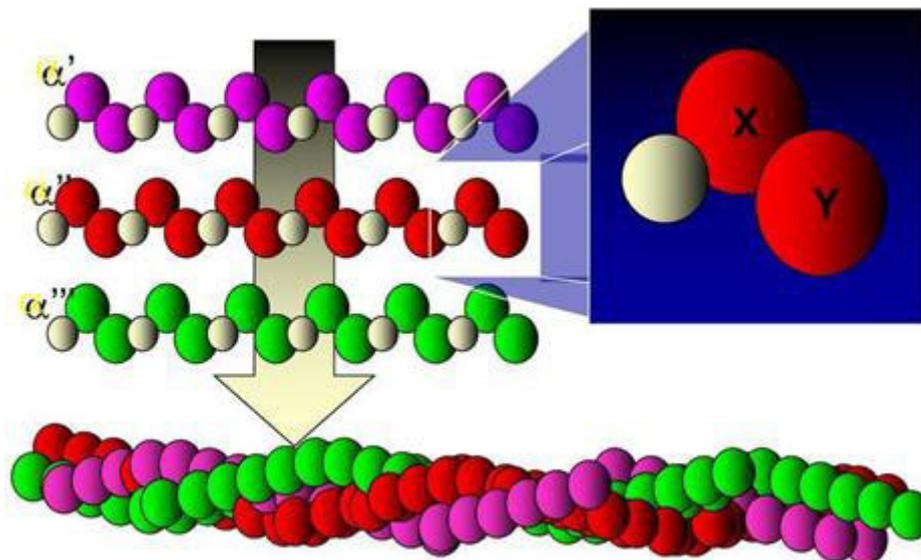


Fonte: SENNA, 2004.

A estrutura secundária do colágeno é formada pela  $\alpha$  hélice, onde a cadeia  $\alpha$  é composta por repetições do tripeptídeo  $(\text{Gly-X-Y})_n$  que é ligada umas às outras construindo características de uma tripla hélice (representado na Figura 3), também chamada de tropocolágeno, unidade fundamental do colágeno que é formada por três cadeias polipeptídicas que se entrelaçam em forma helicoidal. Essas três cadeias polipeptídicas são mantidas juntas por pontes de hidrogênio que ocorrem entre o

hidrogênio do grupo  $-NH$  e o oxigênio do grupo  $C=O$ , estabilizando a estrutura (FERREIRA et al., 2012).

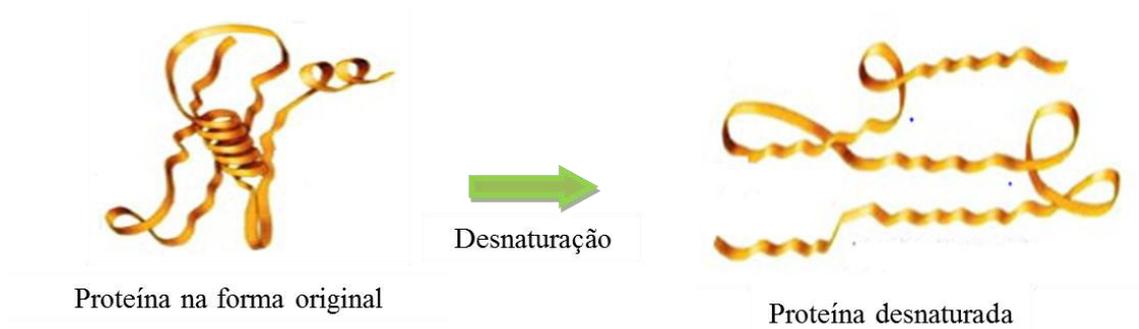
**Figura 3** – Representação esquemática da tripla hélice do colágeno



**Fonte:** RAFAT et al., 2008.

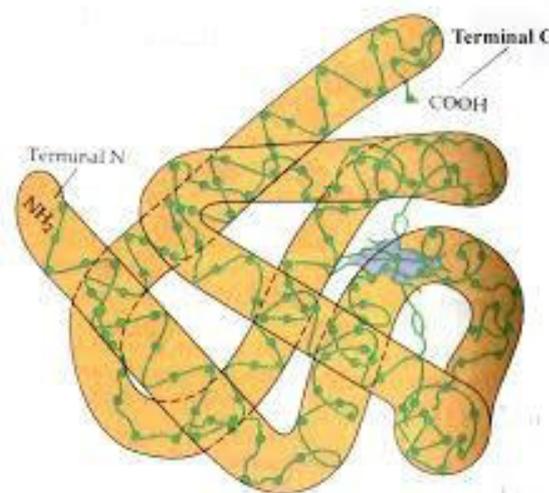
A hidroxiprolina presente na molécula do colágeno é um aminoácido raramente encontrado em outras proteínas, o que a faz ser empregada para determinar a quantidade de colágeno presente em um tecido biológico. Este aminoácido é importante na estabilização da estrutura da tripla hélice. Uma menor quantidade ou a falta de hidroxiprolina faz com que o colágeno perca a conformação de tripla hélice, quando submetido a aquecimento ou a variação de pH, causando a desnaturação da proteína (FERREIRA et al., 2012; SOUSA, 2008; PRESTES, 2013; SENA, 2004).

A desnaturação caracteriza a perda da função proteica e é uma transição de caráter irreversível, em que a tripla hélice é desfeita e as cadeias, na maioria dos casos, tornam-se incapazes de se reorganizarem. O colágeno desnaturado, então, apresenta uma estrutura secundária aleatória (desordenada) provocada pela quebra de ligações de hidrogênio responsável pela estabilidade da tripla hélice. Esta forma desorganizada é comumente chamada de gelatina (SENA, 2004). Na Figura 4 ilustra um esquema de desnaturação do colágeno.

**Figura 4** - Representação da desnaturação do colágeno

**Fonte:** VAZ, 2013.

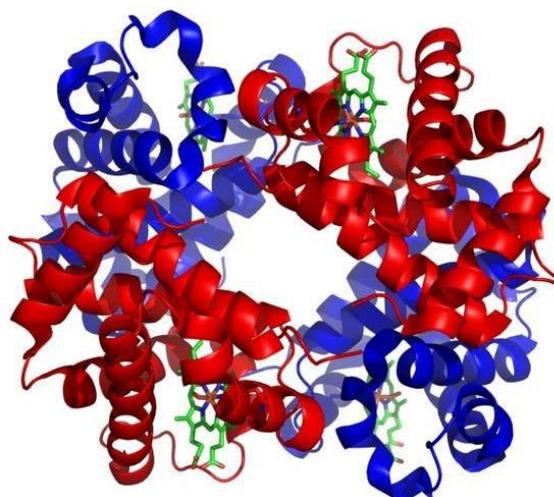
Na estrutura terciária a tripla hélice do colágeno, principalmente tipo 1, é geralmente formada por  $\alpha_1 \alpha_1 \alpha_2$ , onde duas cadeias  $\alpha$  são idênticas e uma cadeia  $\alpha$  diferente com aproximadamente 1000 aminoácidos, com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Nas três cadeias  $\alpha$  na sequência Gly-X-Y, a glicina é localizada em torno do eixo central e os aminoácidos, X e Y, geralmente prolina e hidroxiprolina ocupam posições externas, as cadeias são ligadas umas às outras através de pontes de hidrogênio que dá estabilidade a molécula de colágeno. A estrutura terciária diz respeito à forma tridimensional específica assumida pela proteína como resultado do enovelamento global de toda a cadeia polipeptídica. A Figura 5 mostra a representação esquemática desta estrutura terciária do colágeno (FERREIRA et al., 2012).

**Figura 5** - Representação da estrutura terciária do colágeno

**Fonte:** FERREIRA et al., 2012.

A estrutura quaternária do colágeno é apresentada na Figura 6. Nesta estrutura as moléculas têm a capacidade de se auto-organizar em uma estrutura supramolecular formando pacotes de quartas com a tripla hélice do colágeno. Esta estrutura é formada pelo entrelaçamento das três cadeias peptídicas, formando um cabo em super-hélice. As ligações de hidrogênio entre os grupos da glicina e os grupos CO das outras cadeias estabilizam a estrutura, além de ligações feitas pelo grupamento OH da hidroxiprolina. A estrutura quaternária descreve a forma com que as diferentes subunidades (enovelamento de cadeias polipeptídicas) se agrupam e se ajustam para formar a estrutura total da proteína (FERREIRA et al., 2012).

**Figura 6** - Representação da estrutura quaternária do colágeno



**Fonte** - (Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/aminoacidos.html>)

Existem tipos distintos de colágeno, diferenciados pela composição e sequência de aminoácidos na organização dos diferentes arranjos estruturais das cadeias polipeptídicas, denominados de tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV e assim sucessivamente. O colágeno tipo I é o principal e mais abundante e pode ser encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos, é constituída de três cadeias polipeptídicas (duas cadeias idênticas denominada  $\alpha_1$  e uma cadeia diferente denominada  $\alpha_2$  de aminoácidos) que estão sob a forma helicoidal (HORN et al., 2009). Na Tabela 1 estão apresentados os tipos mais comuns de colágeno, sua composição e localização.

**Tabela 1-** Principais tipos de colágenos e localização

Tipo	Composição em $\alpha$ hélice	Localização
I	$[\alpha_1 (I)]_2 \alpha_2 (I)$	Tecido conjuntivo, pele, osso, ligamento e tendão
II	$[\alpha_1 (II)]_3$	Cartilagem, humor vítreo
III	$[\alpha_1 (III)]_3$	Vasos sanguíneos, trato gastrintestinal
IV	$[\alpha_1 (IV)]_2 \alpha_2 (IV)$	Membrana basal

Fonte: GOISSIS, 2007; MOREIRA, 2014.

### 2.2.1 Colágeno pisco no Maranhão

Na região nordeste, o Maranhão destaca-se como um dos maiores produtores de pescado. Em 2010, a pesca extrativa marinha no estado produziu 43.780,1 toneladas de pescado, sendo considerado o segundo maior produtor dessa região. Os recursos pesqueiros de maior importância econômica no estado são a Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*), Pescada Branca (*Cynoscion leiarchus*) e a Gurijuba (*Hexanemichthys parkeri*), que possuem valores comerciais diferenciados entre os municípios (LOPES *et al.*, 2012).

Dentre as espécies citadas, a Pescada Amarela contribui com maior volume de produção. Somente em 2010, a produção extrativa marinha foi de 20.879 toneladas, destacando-se como a terceira espécie mais capturada no país. O município de Cedral é um importante produtor de Pescada Amarela, sendo que a produção dessa espécie compreende um sistema de grande abrangência (LOPES *et al.*, 2012).

A Pescada Amarela apresenta grande valor comercial na região norte do Brasil sendo a principal espécie consumida nas regiões costeiras maranhenses. Além de sua excelente carne, possui um subproduto bastante valorizado no mercado nacional e internacional, a bexiga natatória, ou “grude”, como assim é chamado pelos pescadores, a qual é retirada do animal imediatamente após a sua captura e, ainda a bordo é colocada ao sol para secar (ISAAC *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2011). Trata-se de um órgão interno dos peixes, uma vesícula constituída de tecido conjuntivo fibroso, cheia de ar, cuja função é controlar o nível de flutuação do peixe, permitindo que fiquem suspensos na água. Este subproduto é exportado para ser utilizado como matéria-prima para a produção de cola nos Estados Unidos e Alemanha, como produção

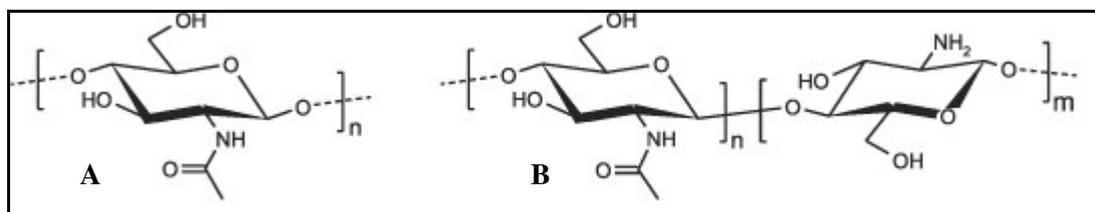
de filtro e clareador de cerveja na Inglaterra e como alimento na China e no Japão (CERVIGÓN, 1993; SOUSA, 2008; MOURÃO, 2007).

Estudos realizado com a bexiga natatória da Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*) mostrou que se trata de um tecido com alto teor de colágeno, aproximadamente 800 mg g<sup>-1</sup> (FERNANDES et al., 2008; SANTOS; CARVALHO; ALMEIDA, 2003).

### 2.3 Quitosana

A quitosana é um polímero linear constituído predominantemente por unidades repetitivas de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (glucosamina), mediante ligações do tipo β-(1-4). É proveniente da reação de desacetilação da quitina, copolímero de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglucosamina) ligados por ligações do tipo β-(1-4). A quitina é um polissacarídeo de origem natural, segundo polímero mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Pode ser encontrada em carapaças de crustáceos (camarões, caranguejos e lagostas), insetos (escorpiões, aranhas e besouros) e parede celular de fungos (DASH et al., 2011; PEREDA et al, 2011; CROISIER, 2013; LIMA et al., 2006., LARANJEIRA, 2009). As estruturas químicas da quitina e quitosana encontram-se ilustradas na Figura 7.

**Figura 7-** Estruturas químicas da quitina (A) e quitosana (B)



Fonte: SHI et al, 2006

A transformação da quitina em quitosana se dá por meio de um processo chamado desacetilação (reação alcalina com NaOH, normalmente 40 %, sob agitação e aquecimento em torno de 100 °C). Neste processo ocorre a saída de grupos acetila (COCH<sub>3</sub>) presentes na quitina, resultando na formação de grupos amino (NH<sub>2</sub>), conforme ilustração da Figura 7 (DAMIAN et al., 2005; CROISIER; JÉRÔME, 2013; LIMA, 2007).

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana e representa a percentagem de grupos amínicos livres ( $\text{NH}_2$ ) no biopolímero, diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade. Quando o GD atinge um valor maior que 50%, a quitina se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado de quitosana. Em baixos valores de pH ( $3 < \text{pH} < 6$ ) os grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) se protonam e fazem da quitosana um polieletrólito catiônico ( $\text{NH}_3^+$ ), isso leva a interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e a sua maior solvatação em água, portanto, quanto mais grupos aminos protonados, maior a solubilização da quitosana no meio. Já em meios neutros e básicos ( $\text{pH} > 6$ ) a quitosana precipita tornando-se insolúvel (AIROLDI, 2008).

A quitosana apresenta, portanto, ao longo de sua cadeia grupos amino (posição C-2) e grupos hidroxila (posição C-3 e C-6), os quais lhe conferem reatividade, permitindo uma vasta gama de possibilidade de ligações com outras moléculas. O grupo  $\text{NH}_2$ , por exemplo, protonado a  $\text{NH}_3^+$  pode interagir com outros polímeros de cargas opostas (caráter aniônico), como o colágeno que apresenta grupos  $\text{COO}^-$ . Estas modificações na sua estrutura permitem a criação de novos biomateriais com características específicas e que podem ser utilizados para diversas aplicações (DASH et al., 2011).

## **2.4 Blendas de colágeno/quitosana**

Blendas poliméricas são misturas de dois ou mais polímeros ou copolímeros. Os objetivos de se obter uma blenda são combinar as propriedades dos polímeros a fim de atingir um alto desempenho; obter uma melhor processabilidade da blenda em relação a um dos polímeros puros.

Diferentes metodologias e estratégias de aplicações da mistura quitosana/colágeno têm sido propostas por um grande número de pesquisadores. Citam-se aqui algumas destas aplicações.

Visando a aplicação na restauração de tecidos com lesões cutâneas causadas por queimaduras, Costa et al. (2012) produziram membranas a partir da dispersão de quitosana em pó em soluções de colágeno (ácido acético  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ). O colágeno foi de origem bovina e as membranas foram obtida pela evaporação do solvente ao ar. Diferentes proporções (75:25; 50:50 e 25:75, m/m) foram empregadas, e os materiais foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os autores concluíram através das

técnicas empregadas, a presença de vibrações características de grupos dos precursores nas membranas, além da integridade estrutural das mesmas.

Locilento (2012) preparou esponjas de QT:COL por liofilização, em presença e ausência de glicerol e de extratos de sementes de uva. A quitosana foi obtida a partir do gládio de lula, e o colágeno foi de origem bovina. Segundo o autor, o extrato de semente de uva, na presença de glicerol, promoveu a reticulação no colágeno aniônico. Houve deslocamento das bandas de amida I e amida II, que os autores atribuíram a interferência dos componentes do extrato (anéis aromáticos) e não a interação com o material da esponja. Os materiais apresentaram capacidade controlada de liberação de extratos, estabilidade térmica em temperatura corporal, porosidade e absorção de água adequadas, mostrando-se promissores como biomateriais para a regeneração tecidual.

Tonhi e Peplis (2002) produziram membranas de COL:QT em proporções 3:1; 1:1 e 1:3 (m/m), pH 3,5 e por secagem ao ar. O colágeno foi de procedência suína e a quitosana adquirida comercialmente. As técnicas utilizadas para caracterização dos produtos foram: espectroscopia de infravermelho, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e ensaios de viscosidade específica para verificação da possível interação entre estes dois polímeros. Segundo os autores, não há interações entre estes materiais que provoquem o surgimento de novas transições vibracionais, e as propriedades das blendas podem ser controladas variando as proporções dos precursores.

Moreira (2014) propôs a combinação de quitosana, colágeno (extraída de calda de ratos) e nanopartículas de vidro bioativo a fim de desenvolver um novo hidrogel termossensível para aplicação na medicina regenerativa, com enfoque nos tecidos ósseo e cimento dentário. A mistura dos biopolímeros foi feita em diferentes proporções quitosana/colágeno 0/100, 30/70, 50/50, 70/30, 100/0 (m/m) e adicionadas a nanopartículas de vidro bioativo de modo a obter as concentrações finais 1%, 3% e 5%. Os hidrogéis sintetizados foram caracterizados por FTIR, MEV e ensaios reológicos. Pelos espectros FTIR constatou-se a presença das bandas características de cada componente do sistema com a ausência de novas bandas. As micrografias de MEV mostraram que os hidrogéis possuem estrutura porosa e interconectividade dos poros, o que pode ser um ponto positivo para a adesão celular. O estudo reológico permitiu o acompanhamento do processo de gelificação desses hidrogéis, mostrando que a adição

de colágeno e vidro bioativo aumenta a rigidez da matriz, tornando-a promissora como biomaterial injetável na engenharia de tecido (MOREIRA, 2014).

Hidrogéis a base de quitosana (derivada de  $\beta$ -quitina, extraída do gládio de lula), xantana comercial e colágeno (derivado de tendão bovino) foram preparados e caracterizados com potencial para liberação controlada de fármacos. O preparo destes hidrogéis se deu em proporções variadas de quitosana/xantana/colágeno: 1:2:0,5 (m/m/m). Os espectros vibracionais na região do infravermelho não apresentaram, segundo a autora (HORN, 2010), evidências de deslocamento ou de novas bandas, sugerindo apenas interações eletrostáticas entre os grupamentos amina e carboxila. A análise térmica comprovou a retenção de grande quantidade de água por estes materiais e a propriedade de hidratação dos mesmos. As análises de MEV indicaram que a estrutura é dependente do polissacarídeo de maior quantidade e que o colágeno participa desta estrutura.

Tangsadhakun *et al.* (2006) prepararam, por liofilização, matrizes porosas a partir da mistura de colágeno, oriundo de pele de porco, e quitosana. Diferentes proporções COL:QT foram empregadas (10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 90/10) e os suportes foram caracterizados por FTIR e MEV. Os resultados indicaram que as interações entre os precursores são de natureza física e que as blendas são fortes candidatas a aplicações em bioengenharia tecidual.

Faikrua *et al.* (2009) prepararam filmes a partir da mistura de  $\beta$ -fosfato de glicerol (0,5%; 1%; 1,5%) e COL:QT (8:2 e 7:3, m/m). O colágeno foi de origem bovina e os filmes foram obtidos por secagem ao ar, a temperatura ambiente. Os resultados de FTIR indicaram aos autores a possibilidade de uma interação iônica entre o fosfato de glicerol e a blenda COL:QT, a qual seria responsável pelo aumento da estabilidade da matriz preparada. Nos experimentos sem a presença do fosfato, o deslocamento da banda da amida A para valores mais baixos ( $3326\text{ cm}^{-1}$  para  $3312\text{ cm}^{-1}$ ), bem com o aumento na absorbância desta banda, sugerem interação com a banda -OH da quitosana, indicando a possibilidade de uma formação de ponte de hidrogênio.

Filmes a base de colágeno (bovino)/quitosana foram produzidos em proporções 90:10; 50:50 e 10:90 (m/m) para utilização como novos biomateriais. Propriedades térmicas e dielétricas dos filmes produzidos foram medidas a fim de serem testados como implantes para estimular o crescimento ósseo. De acordo com os resultados acredita-se que devido a característica de policação a molécula de quitosana é a responsável pela maior condutividade elétrica em comparação com o colágeno. Os

resultados também mostram que a presença de quitosana na mistura contribui para um aumento da estabilidade térmica do material, que está associada com o aumento da temperatura de desnaturação das amostras de colágeno/quitosana, em comparação com a amostra de colágeno puro (LIMA et al., 2006).

Hidrogéis de colágeno (bovino)/quitosana em proporções de 0/100, 25/75, 50/50 e 75/25 (m/m) reticulada com glioxal (dialdeído) foram preparados e empregados no tecido ósseo. Observou-se que a proporção 50/50 de colágeno/quitosana com glioxal foi mais efetivo na cicatrização óssea (WANG; STEGEMANN, 2011).

Membranas compostas de colágeno/quitosana em diferentes proporções (1:3; 1:1; 3:1) foram preparadas e caracterizadas pela técnica de espectroscopia de infravermelho para serem usadas em liberação controlada de cloridrato de propranolol. Estudos de equilíbrio de intumescimento das blendas foram feitos e as propriedades de permeabilidade das blendas em cloridrato de propranolol também foram estudados. De acordo com os resultados encontrados as membranas produzidas representam candidatos promissores para liberação controlada de fármacos (THACHARODI; RAO, 1995).

Síntese e caracterização de esponjas a base de blendas colágeno/hialuronano/quitosana foram produzidos para potenciais aplicações biomédicas. Misturadas em diferentes proporções de colágeno, hialuronano e quitosana (10: 1: 0, 9: 1: 1, 8: 1: 2, 7: 1: 3, 6: 1: 4 e 5: 1: 5) foram fabricados e suas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade celular foram avaliados. Segundo dados, a proporção 9:1:1 de colágeno, hialuronano e quitosana, mostraram-se promissores como andaimes em engenharia de tecidos (LIN et al., 2009).

Misturas de colágeno (suíno) com quitosana em proporção 1:1 foram preparados e caracterizados por DSC, TG/DTG), FT-IR e SEM. Os resultados mostraram interação que envolve grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana, com grupos  $\text{COO}^-$  do colágeno (HORN *et al.*, 2009).

Filmes de bioblendas de colágeno/quitosana incorporado com nanocarbono foram produzidos. Os nanocarbonos possuem significativa condutividade elétrica e propriedades magnéticas. O colágeno e os nanocarbonos utilizados foram derivados de resíduos de pele de cabra proveniente da indústria de couro. Para obter filmes do biocompósito (nanocarbonos /colágeno-quitosana) as misturas foram feitas nas seguintes proporções de nanocarbonos 0, 5, 10, 15 e 20 % em massa e (100-0, 100-12,5 e 100-25 % em massa) de colágeno-quitosana. Os nanocarbonos quando incorporados a

mistura colágeno-quitosana melhora significativamente a condutividade elétrica, resistência a tração, propriedades magnéticas e térmicas dos filmes produzidos sem alterar sua flexibilidade e transparência, sugerindo assim possíveis aplicações em indústrias biomédicas (ASHOKKUMAR *et al.*, 2012).

Poucos trabalhos empregam colágeno de origem písceo. Ramasamy e Shanmugam (2015) e Montoya *et al.* (2010) utilizaram moluscos como fontes de colágeno na obtenção de filmes com quitosana. As blendas secaram ao ar e os autores sugeriram interações por pontes de hidrogênio para explicar as características observadas, a exemplo da homogeneidade e miscibilidade dos filmes.

Neste trabalho, além da aplicação de colágenos extraídos de peixes de interesse regional, as blendas foram preparadas por diferentes rotas, com o intuito de verificar melhor as interações entre os precursores. No processo de liofilização, em que a secagem acontece por um mecanismo de sublimação, ambos materiais permanecem na amostra, interagindo ou não. Diferentemente, nos ensaios de precipitação seletiva os teores de colágeno e quitosana nas amostras sugere-se a interação entre eles.

### **3.1 Geral**

Desenvolver metodologias para a obtenção de blendas entre colágenos píceos e quitosana.

### **3.2 Específicos**

- Extrair o colágeno de peles e bexigas natatórias da Pescada Amarela e da Gurijuba e caracterizá-los por FTIR, DRX, TG/DTA e MEV;
- Purificar a quitosana, determinando o grau de desacetilação e caracterizá-la por FTIR, DRX, TG/DTA, DSC e MEV;
- Preparar misturas ácidas QT:COL nas proporções (m%): 80:20, 50:50 e 20:80;
- Obter as blendas respectivas por liofilização, precipitação salina, precipitação alcalina e precipitação mista (salina e alcalina);
- Caracterizar as blendas obtidas por FTIR, DRX, DTA, MEV e ensaios de viscosidade.

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Materiais**

A quitosana empregada foi de procedência Aldrich, com grau de desacetilação entre 75-85 % e foi tratada antes do uso. Os demais reagentes, também de grau analítico (Aldrich e Merck), foram empregados sem prévias purificações.

As bexigas natatórias e peles da Pescada Amarela e da Gurijuba foram obtidas no mercado local. Ainda frescos estes materiais foram conduzidos ao laboratório, convenientemente lavados e armazenados para a extração do colágeno.

A água empregada no preparo de todas as soluções foi deionizada em um sistema do tipo Milli-Q.

### **4.2 Purificação da quitosana**

A quitosana foi purificada para sua desmineralização e desproteíntização de acordo com o procedimento descrito por Santos *et al.* (2003). Amostras foram dissolvidas em ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , sob agitação constante e por aproximadamente 18 h. A solução resultante foi filtrada e adicionada hidróxido de amônio concentrado até a precipitação. O precipitado foi lavado continuamente com água até que o mesmo apresentasse pH neutro, em seguida foi seco com acetona a temperatura ambiente e colocado em estufa ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h) (SANTOS *et al.*, 2003).

### **4.3 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (% GD)**

O grau de desacetilação da quitosana, que representa a percentagem de grupos  $\text{NH}_2$  livres, foi determinado por titulação condutométrica de acordo com a literatura (SANTOS *et al.*, 2003). O equipamento empregado foi o condutivímetro da Digimed, modelo 21-D. Para a realização do experimento, 0,2 g de quitosana foram suspensos em 40 mL de solução de ácido clorídrico  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , durante 18 h, de modo a garantir a protonação dos grupos aminos presentes. Em seguida a amostra foi titulada com solução padrão de NaOH  $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ , medindo-se *in situ* a condutividade após cada adição.

Para o cálculo do grau médio de desacetilação (% GD) da quitosana, empregou-se a equação 1 (SANTOS *et al.*, 2003; JANEGITZ *et al.*, 2007):

$$\%GD = \frac{16,1[base](V_2 - V_1)}{m} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo:

16,1: a massa molar da unidade repetitiva de quitosana;

[base]: a concentração da solução de hidróxido de sódio;

V<sub>1</sub>: o volume de hidróxido de sódio consumido para neutralizar o HCl em excesso;

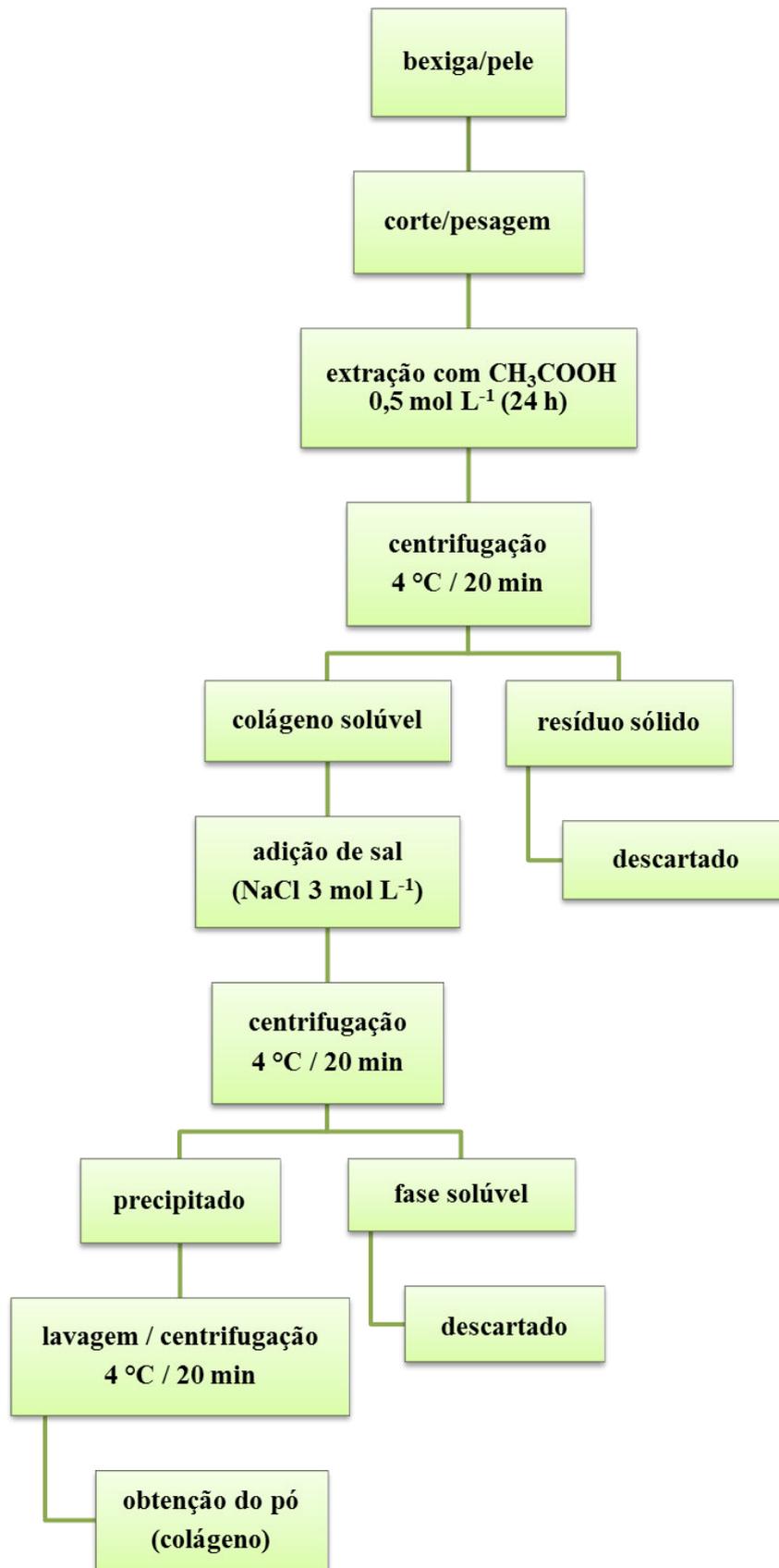
V<sub>2</sub>: o volume de base usado para a neutralização dos grupos ácidos da quitosana, e

m: a massa de quitosana contida na alíquota titulada.

#### **4.4 Extração do Colágeno**

A extração do colágeno foi feita a partir de bexiga e pele dos peixes de Pescada Amarela e Gurijuba, seguindo o procedimento descrito por Fernandes *et al* (2008). O fluxograma de execução da extração de colágeno está expresso na Figura 8.

**Figura 8** - Fluxograma de extração do colágeno



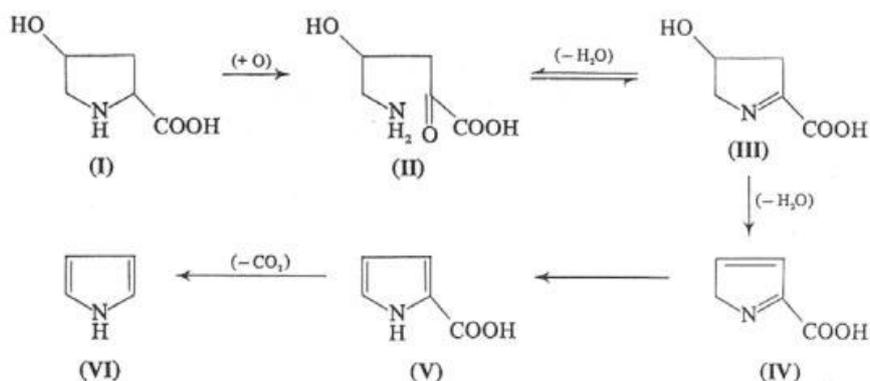
Fonte: FERNANDES *et al*, 2008.

#### 4.5 Determinação do teor da 4-hidroxirolina (4-Hy) do colágeno

A hidroxiprolina (4-Hy) é importante para a manutenção da integridade estrutural do colágeno, estabilizando a tríplice hélice através da formação de ligações de hidrogênio. O seu teor, considerando que este aminoácido ocorre apenas em moléculas de colágeno, é também empregado como parâmetro para estabelecer a quantidade de colágeno presente em um tecido ou amostra. A literatura indica um fator de conversão geralmente de 8,3 para a estimativa do teor de colágeno nos tecidos, a partir dos resultados da 4-Hy (HUSZAR *et al.*, 1980; STEGEMANN, 1967; SENA, 2004; FAUSTO, 2011; RAMACHANDRAN *et al.*, 1973; PRESTES, 2013).

A exemplo deste trabalho, as determinações da 4-Hy são normalmente realizadas por espectrofotometria na região do Uv-vis, segundo os procedimentos de Stegemann (1967) e Huszar *et al.* (1980). A Figura 09 resume aspectos desta reação. Inicialmente a 4-Hy (I) é oxidada a ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -hidroxi- $\delta$ -aminovalérico linear (II) pela ação da cloramina-T (N-cloro-*p*-tolueno sulfonamida de sódio). Este ácido formado mantém equilíbrio com a estrutura cíclica do ácido  $\Delta^2$ -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico (III). Há perda da molécula de água, com a consequente formação de uma estrutura instável (IV), a qual converte-se em ácido pirrol-2-carboxílico (V). Após a adição do reagente cromogênico, 4-dimetilaminobenzaldeído e aquecimento, ocorre a formação do pirrol (VI) por descarboxilação do ácido pirrol-2-carboxílico (ANGELINI, 2011; TORRE *et al.* 2004).

**Figura 9** – Esquema reacional simplificado empregado para a determinação da hidroxiprolina. (I) - Hidroxiprolina; (II) - ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -hidroxi- $\delta$ -aminovalérico; (III) - ácido  $\Delta^2$ -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico; (IV, V) - ácido pirrol-2-carboxílico; (VI) - pirrol.



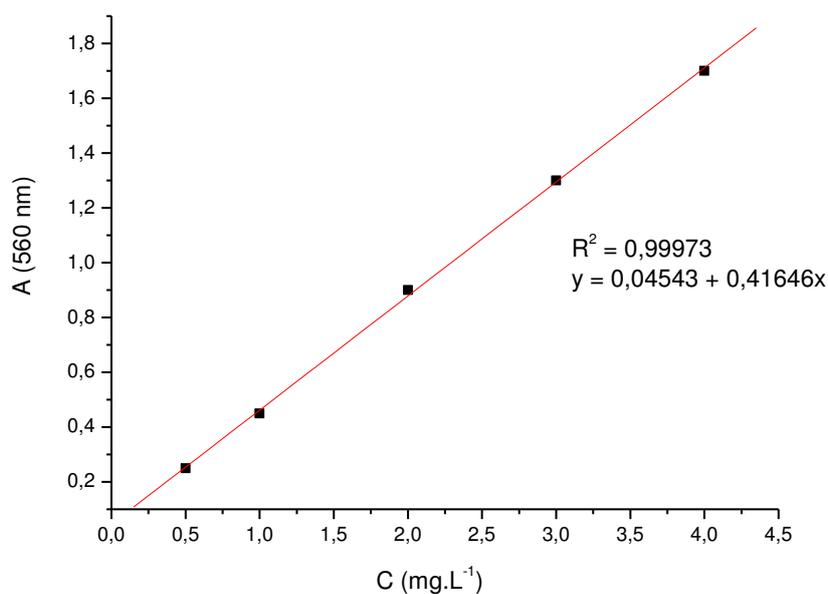
Fonte: TORRE *et al.*, 2004; ANGELINI, 2011.

Em um experimento típico, 4 mL de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados a 1 mL de amostra solúvel de colágeno (100 mg de colágeno para 100 mL de ácido acético). A hidrólise se processou a temperatura de 130 °C, por 24 h. Após esse período, a solução contendo a amostra foi neutralizada com hidróxido de sódio e o volume final completado para 100 mL. A uma alíquota de 2 mL desta solução foi adicionado 1 mL de cloramina T e deixada em temperatura ambiente por 20 min, para a completa oxidação da hidroxiprolina. Em seguida, 1 mL da solução de p-dimetilaminobenzaldeído foi adicionado para a obtenção da coloração vermelho-púrpura, e a absorbância da amostra foi registrada em um comprimento de onda de 560 nm.

O equipamento empregado foi o espectrofotômetro Uv-visível da Varian Cary 50. As cubetas foram de quartzo e o caminho óptico de 1 cm.

Embora amplamente empregado, o método da 4-Hy requer atenção por detalhes cinéticos e condições dos reagentes, notadamente da cloramina-T (RAO et al., 1970). Assim, a visualização das curvas analíticas é importante para atestar a qualidade dos resultados. As curvas analíticas foram obtidas para as seguintes concentrações de 4-Hy: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg·L<sup>-1</sup>. (FAUSTO, 2011; ANGELINI, 2011; STEGEMANN; STALDLER, 1967; FERNANDES et al., 2008; HUSZAR et al., 1980; STOCCO, 2008). Na Figura 10 está ilustrada uma das curvas analíticas obtidas neste trabalho. Pode-se observar um coeficiente de correlação (R) de 0,99973, indicando uma ótima linearidade.

**Figura 10** - Curva analítica para a determinação da 4-hidroxirolina ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ).



Fonte: Próprio autor

#### 4.6 Análises físico-químicas do Colágeno

Em função da natureza da amostra, foram realizadas determinações de proteínas, umidade e cinzas seguindo a metodologia oficial do Instituto Adolfo Lutz (2005).

O teor de nitrogênio total foi determinado segundo o método de Kjeldahl. Aproximadamente 0,1 g do colágeno extraído foi envolvido em papel próprio, isento de nitrogênio, e colocado em um tubo digestor, juntamente com 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 g dos catalisadores selênio e sulfato de potássio. Levou-se o tubo ao digestor por 2 h à temperatura de 360 °C, até obtenção de coloração clara. Após resfriamento, 1 mL de água destilada e 1 mL gotas do indicador fenolftaleína 1% foram adicionados, e a mistura reacional foi destilada na presença de 15 mL de solução de hidróxido de sódio 40 %. Em um erlenmeyer adicionaram-se 25 mL de ácido clorídrico 0,02 mol L<sup>-1</sup>, e uma mistura de indicador (vermelho de metila 0,2 % e de azul de metileno 1 %) para coletar o destilado. Finalmente, a mistura destilada foi titulada com hidróxido de sódio 0,02 mol L<sup>-1</sup> e a percentagem de proteína calculada de acordo com as equações 2 e 3:

$$\% N = \frac{V_n}{P_a} \times 0,028 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% P = \% N \times 6,25 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo que:

0,028 = miliequivalente grama de N<sub>2</sub>

6,25 = fator de conversão para proteína de origem animal

Para a determinação de umidade, 1,0 g da amostra finamente pulverizada foi pesada em cápsula de porcelana, previamente tarada, e colocada em estufa a 110 °C, por 4 h. Após este período, o material foi retirado e colocado em dessecador para esfriar e posterior pesagem. A umidade foi calculada de acordo com a equação 4.

$$\% U = \frac{P_p}{P_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

O teor de cinzas foi calculado pela equação 5, em que 2,0 g de amostra foram colocadas em cadinho de porcelana previamente seco e pesado, e em seguida foi calcinado em bico de Bunsen e levado para mufla a 600 °C, por 4 h. Após este tempo, e resfriado em dessecador, o cadinho foi pesado com cinzas.

$$\% C = \frac{P_c}{P_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

#### **4.7 Preparação das blendas: Quitosana/Colágeno**

Para os ensaios de preparação das blendas Quitosana/Colágeno (QT:COL) utilizaram-se colágenos provenientes da bexiga natatória e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba. As proporções (QT:COL % m) empregadas para as formulações das misturas foram: 80:20; 50:50 e 20:80. Previamente, soluções individuais de quitosana (QT) e dos respectivos colágenos (COL) foram preparadas pela dissolução em ácido

acético 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH = 3). Após a completa dissolução, misturas nas diferentes proporções QT:COL foram deixadas em agitação por 24 h. Após este período, os materiais foram isolados das misturas por i) liofilização; ii) precipitação salina (NaCl); iii) precipitação alcalina (NaOH) e iv) precipitação salino-alcalina (NaCl/NaOH).

Nos experimentos com liofilização, as soluções das misturas foram mantidas sob refrigeração à -70 °C, em um freezer da So-Low, modelo U85-18. Em seguida, foram submetidas à liofilização a uma temperatura de -60 °C, durante 8h. O Equipamento empregado foi da Terroni, modelo Fauvel-LB1500.

Nos ensaios por precipitação, após o tempo de mistura, foram adicionados nos sistemas respectivos, soluções de NaCl, NaOH, e NaCl/NaOH 3 ml·L<sup>-1</sup>. Para todos os casos foram observados a formação de um precipitado branco, o qual foi separado por centrifugação, lavado com água até ausência de base (controle de pH) e, conforme o caso, de íons cloreto (adição de AgNO<sub>3(aq)</sub>), seguido de lavagem com acetona e secagem em dessecador (WANG; STEGEMANN, 2010; LIMA et al., 2006; WANG, 2003).

#### 4.8 Caracterização da quitosana, colágeno e das blendas quitosana/colágeno

Os materiais obtidos foram caracterizados por FTIR, TG/DTG, DTA DSC, DRX e MEV e por viscosimetria capilar.

##### 4.8.1 Medidas de viscosidade

Com o objetivo de caracterizar as amostras obtidas de quitosana e colágeno, foram realizados testes de viscosidade em um viscosímetro capilar Cannon-Fenske Routine (Herzoo, modelo HVB-438) acoplado a um banho ultratermostático (SL 152 da SOLAB). As amostras foram dissolvidas em solução de ácido acético 0,5 mol L<sup>-1</sup> em cinco diferentes concentrações (entre 2 e 6 g.L<sup>-1</sup>) e as respectivas viscosidades foram medidas a 25±1°C.

No capilar foram colocados 5 mL de amostra, que passaram através dele, medindo-se o tempo de escoamento em segundos com o auxílio de um cronômetro digital. Cada medida foi feita em triplica, sendo utilizada a média dos valores obtidos.

A determinação da viscosidade da solução polimérica em relação ao solvente puro é bastante comum no estudo de soluções diluídas de polímeros. A relação

entre a viscosidade da solução polimérica ( $\eta$ ) e a do solvente puro ( $\eta_0$ ) é chamada de viscosidade relativa ( $\eta_r$ ). O valor da viscosidade relativa pode ser determinado através de medidas do tempo de escoamento da solução polimérica ( $t$ ) e do tempo de escoamento do solvente puro ( $t_0$ ) em um viscosímetro, considerando que a densidade das soluções poliméricas diluídas é praticamente igual ao solvente puro (Eq. 6).

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad \text{Eq. (6)}$$

A viscosidade da solução polimérica também pode ser expressa pela viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ), que está diretamente relacionada com a viscosidade relativa pela Eq. 7.

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad \text{Eq. (7)}$$

Por sua vez, a viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) é definida pela relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução polimérica ( $c$ ) (Eq. 8)

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad \text{Eq. (8)}$$

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  da solução foi determinada através de um gráfico da viscosidade reduzida  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  em função da concentração ( $c$ ) das soluções das amostras, por extrapolação da reta obtida por regressão linear para  $c=0$ , conforme a Eq. (9) apresentado por Alsarra *et al.* (2002).

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} \quad \text{Eq. (9)}$$

A massa molar viscosimétrica média ( $M_v$ ) da quitosana e do colágeno foi calculada a partir do valor da viscosidade intrínseca usando-se a equação empírica de Mark-Houwink (Eq. 10), citada por Roberts e Domszy (1982):

$$[\eta] = K \cdot (M_v)^a \quad \text{Eq. (10)}$$

Onde  $k$  e  $a$  são constantes que dependem do sistema polímero-solvente-temperatura (GUPTA e JABRIAL, 2006; WESKA *et al.* 2007).

#### 4.8.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram medidos na faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em um espectrômetro da Shimadzu, modelo: IR prestige-21, com transformada de Fourier, empregando-se uma pastilha de KBr.

#### 4.8.3 Difractometria de raios-X (DRX)

Para avaliar a cristalinidade das amostras empregou-se a análise de difração de Raios X (DRX). O Equipamento foi da Bruker, modelo D8 advanced, operando com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$ ) à 40 kV e 40 mA. As análises foram conduzidas no intervalo angular de 5-80° em  $2\theta$ , no passo de 0,02° e tempo de coleta de 0,2 s.

#### 4.8.4 Análise térmica (TG/DTG, DTA e DSC)

As análises de TG e DTA foram conduzidas no equipamento Shimadzu DTG-60H, utilizando uma massa de aproximadamente 5 mg de amostra, suporte de platina e aquecimento controlado (20 - 1000 °C) em atmosfera de nitrogênio. Foi utilizada uma razão de aquecimento de 10 °C·min<sup>-1</sup> e fluxo do gás de 10 mL·min<sup>-1</sup>.

Os experimentos de DSC foram realizados em equipamento da Shimadzu, modelo DSC-60. Aproximadamente 3 mg de cada amostra foram colocadas em uma porta amostra de alumínio selado com furo na tampa, sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 10 mL·min<sup>-1</sup>. A taxa de aquecimento foi de 25 - 600 °C, com razão de 10 °C·min<sup>-1</sup>.

#### 4.8.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

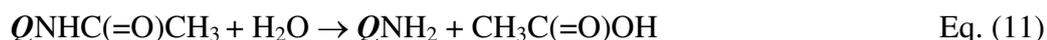
As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura da Phenom, modelo Pro-X. As amostras para análise foram depositadas em um pedaço de fita de carbono colado na porta amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

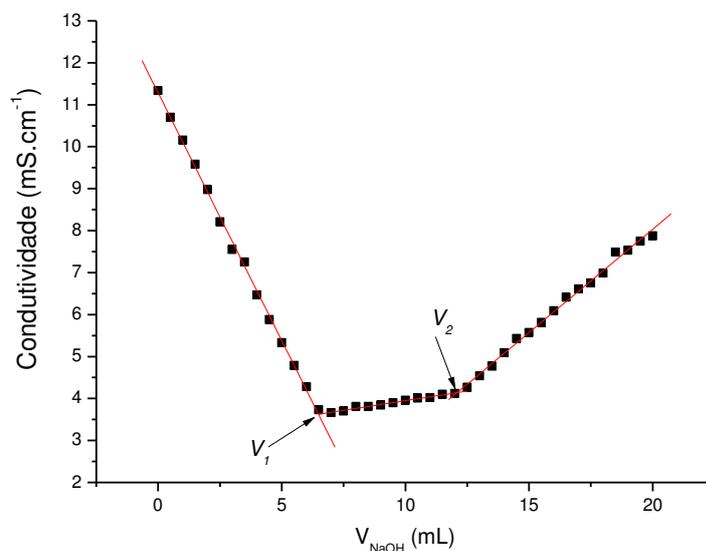
Os grupos acetil predominam nas cadeias de quitina ( $QNHCOCH_3$ ), enquanto a quitosana ( $QNH_2$ ) contém mais grupos desacetilados. Considera-se que acontece a conversão de quitina em quitosana, quando mais de 50% de unidades monoméricas apresentarem-se desacetiladas, e, quando de mais de 50% dos grupos acetil presentes se tornarem grupamentos amino. Assim, a proporção entre o número de unidades desacetiladas e o número de unidades acetiladas em uma mesma molécula é chamada de grau de desacetilação (GD) (BRANGEL, 2011).

A desacetilação da quitina é realizada por digestão alcalina, sendo que os grupos acetila ( $COCH_3$ ) são liberados na forma de ácido acético, segundo a equação 11 (CROISIER; JÉRÔME, 2013):



Há várias técnicas que podem ser aplicadas para a determinação do grau de desacetilação da quitosana. No presente caso, optou-se pela titulação condutométrica. O resultado está apresentado na Figura 11. A primeira faixa linear do gráfico representa a neutralização do ácido presente no meio. A segunda reta corresponde à neutralização dos prótons dos grupos amino da quitosana, enquanto que o terceiro segmento refere-se à variação da condutividade devido ao excesso de base adicionado. Estas três retas originam, por extrapolação, dois pontos de inflexão, os quais correspondem aos volumes  $V_1$  e  $V_2$  expressos na Eq. 1. Desta forma, o grau médio de desacetilação obtido foi de 82 %, em acordo com as indicações do fabricante (75-85 %). Quanto maior o grau de desacetilação, mais grupos amino estarão presentes na cadeia polimérica e, conseqüentemente, maior será a solubilidade e poder catiônico do material. Assim, cargas positivas nos nitrogênios tornam o polímero um polieletrólito catiônico capaz de se ligar fortemente a moléculas de caráter aniônico (SANTOS *et al.*, 2003; JANEGITZ *et al.*, 2007; BRANGEL, 2011).

Figura 11 - Curva de titulação condutométrica da amostra de quitosana.

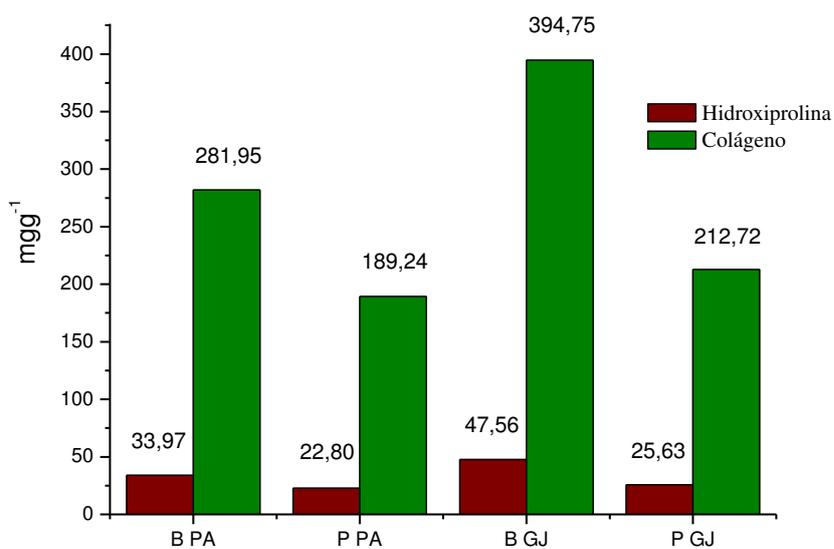


Fonte: Próprio autor

## 5.2 Determinação do teor de hidroxiprolina do Colágeno

Os teores obtidos ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de 4-Hy e estimados de colágenos, para as amostras de peles e bexigas natatórias investigadas, estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Teores de 4-hidroxiprolina e de colágeno para bexiga e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba.



Fonte: Próprio autor.

Para ambas as amostras (Pescada Amarela e Gurijuba), a bexiga natatória foi mais rica em colágeno que a pele, e para a Gurijuba foi encontrado maior teor de colágeno que para a Pescada Amarela.

O teor de 4-Hy é dependente do tecido, da espécie, do habitat, da temperatura do corpo dos animais, bem como do processo de extração do colágeno, situação em que poderá ocorrer fragmentação e perdas (PRESTES *et al.*, 2013). Entretanto, é este resultado indicativo da presença de colágeno no meio. Ademais, são valores posteriormente empregados na preparação de géis e soluções em concentrações específicas.

Teores variados de 4-Hy para diversos tecidos podem ser encontrados na literatura. Montoya *et al.*, (2010), por exemplo, relataram um teor de 6,5% em capas (peles) de lula (*Dosidicus gigas*); Ramasamy e Shanmugam (2015), de 7,55% em capas de moluscos (*Sepia*), e Prestes *et al.* (2013) de 3,53 % em colágeno bovino. Importante considerar que os percentuais relatados podem ser em relação ao total de colágeno solúvel, ou ao total de proteínas (resíduos/1000).

Em relação a massa de amostra empregada na análise, os teores percentuais de 4-Hy encontrados neste trabalho variaram de 2,3 – 4,7%. Entretanto, as amostras não estavam totalmente secas, como se verá a seguir, o que elevaria um pouco mais os valores percentuais, evidenciando a boa correlação de dados com a literatura.

Os valores de colágenos foram estimados multiplicando-se os teores de 4-Hy por 8,3 (HUSZAR *et al.*, 1980; STEGEMANN, 1967). Outros fatores de conversão são também relatados na literatura. Montoya et a. (2010), por exemplo, multiplicou os teores de 4-Hy por 21,56, enquanto Cross et al. empregaram 7,52. Neuman e Logan (1950), e mais recentemente Kliment et al. (2011), utilizaram 13,5 como conversor. Estes valores deveriam refletir o percentual de 4-Hy na estrutura do colágeno, mas, como nem sempre é possível a identificação exata deste teor para a amostra que se deseja, é aceitável a escolha de um conversor acompanhada da referência utilizada. Empregamos o valor de 8,3 por ser bastante utilizado na literatura.

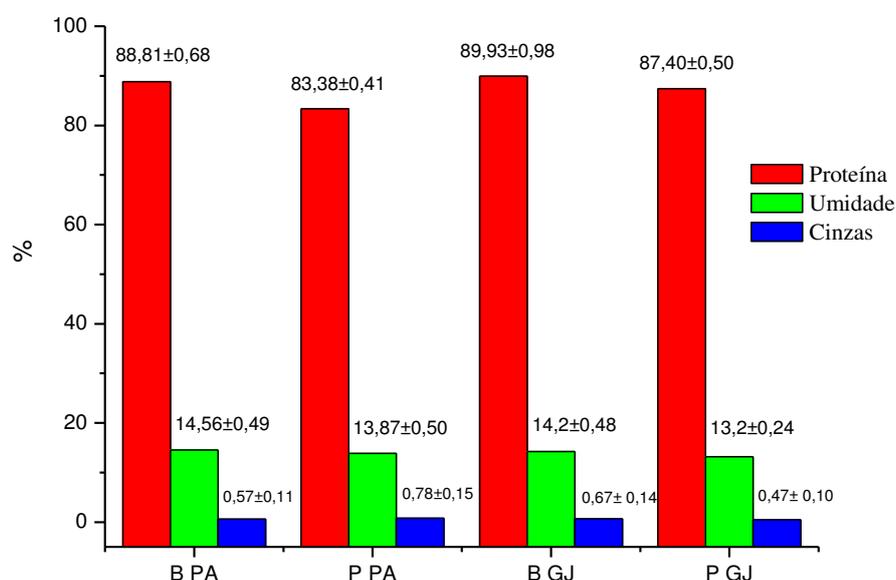
### 5.3 Análises Físico-Químicas do Colágeno

Os teores de proteína, umidade e cinzas para as amostras de colágenos extraídos da pele e da bexiga natatória da Pescada Amarela e da Gurijuba estão

apresentados na Figura 13. Como se percebe, estes materiais são constituídos basicamente por proteínas (83 – 90 %) e água (13 – 14,6 %). O teor de cinzas (<1%) reflete a natureza orgânica do material.

A somatória dos valores percentuais variou de 98,03 a 104,8, ultrapassando em pouco o total de 100%. Entretanto, o alto conteúdo protéico do material e os teores de 4-Hy confirmam a natureza colagenosa das amostras investigadas.

**Figura 13** – Análises físico-químicas (composição centesimal) dos colágenos extraídos das bexigas natatórias e peles da Pescada Amarela e da Gurijuba.



Fonte: Próprio autor.

A sequência nos teores de 4-Hy (P-PA < P-GJ < B-PA < B-GJ) foi também observada para o conteúdo de proteína. No entanto, a razão entre os conteúdos bexiga/pele (1,5 para a PA e 1,85 para a GJ, valores para 4-Hy) foi diferente (1,06 para a PA e 1,02 para a GJ, valores para proteína), sugerindo que nem toda proteína da pele é de origem colagenosa.

Em relação a teores de proteínas, Ramasamy e Shanmugam (2015) relataram 82,2 % em capas de sépia (molusco); Kittiphattanabawon et al. (2010) encontraram 89,84% em pele de tubarão, e Prestes *et al.* (2013), em fibras de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado, todos comerciais, de 84,49 a 97,34 %. Estes valores mostram a coerência dos nossos resultados.

Os valores de cinzas e umidade também estão compatíveis com a natureza da amostra (PRESTES *et al.*, 2013).

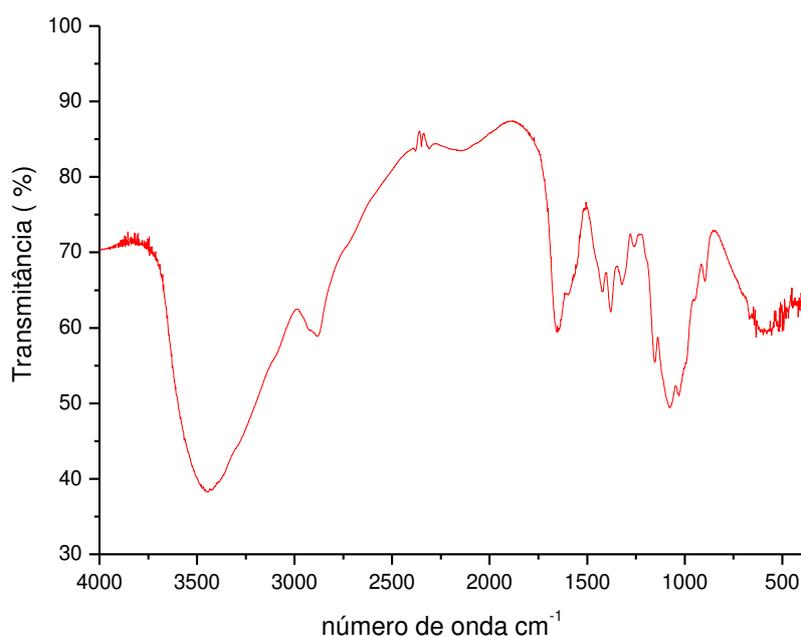
#### **5.4 Caracterizações dos polímeros precursores: Quitosana e Colágeno**

##### **5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)**

A avaliação dos grupos funcionais presentes na quitosana e nos colágenos em estudo foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, FTIR.

As Figuras 14 e 15 apresentam os espectros vibracionais para a quitosana e para os colágenos, respectivamente.

**Figura 14** - Espectro de FTIR para a quitosana.



**Fonte:** Próprio autor.

O espectro de infravermelho da quitosana foi semelhante aos reportados na literatura (MOREIRA, 2014; HORN, 2008; LIMA, 2007; AIROLDI, 2008; TONHI e PLEPIS, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; CHAVES *et al.*, 2009; LIMA; AIROLDI, 2004; WANG *et al.*, 2003).

As principais transições podem ser assim atribuídas:

- 3600-3200  $\text{cm}^{-1}$  - associada às vibrações  $\nu(\text{OH})$  e  $\nu(\text{NH})$  dos grupos C-OH, água fisicamente adsorvida e  $\text{NH}_2$ , respectivamente;
- 2970-2840  $\text{cm}^{-1}$  - correspondente às vibrações simétricas e assimétricas  $\nu(\text{CH})$ , decorrente dos grupos  $-\text{CH}_2$ ;
- 1654  $\text{cm}^{-1}$  - relativa aos grupos amidas (amida I,  $\nu(\text{C}=\text{O})$ );
- 1582  $\text{cm}^{-1}$  - correspondente a banda amida II, -NH;
- 1429  $\text{cm}^{-1}$  - relativa a deformação axial de  $-\text{CN}$  da amida;
- 1366  $\text{cm}^{-1}$  - referente à deformação axial do  $-\text{CN}$  dos grupos amino;
- 1162 – 886  $\text{cm}^{-1}$  decorrentes da estrutura polissacarídea.

A título de exemplificação, Sionkowska *et al.* (2004) relataram as principais bandas no espectro vibracional de quitosana em: 3352, 2932 e 2890  $\text{cm}^{-1}$ , as quais atribuíram, respectivamente, aos grupos -OH,  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ ; em 1635  $\text{cm}^{-1}$  indicativa do grupamento C=O (Amida I) e em 1563  $\text{cm}^{-1}$ , como as relativas ao grupo NH (Amida II).

As amostras de colágenos obtidas a partir da bexiga natatória e pele das duas espécies de peixes, Pescada Amarela e Gurijuba, apresentaram o mesmo perfil vibracional (Figura 15), também semelhante a outros colágenos apresentados na literatura (TONHI E PLEPIS, 2002; MOREIRA, 2014; VIEIRA, 2009; BENJAKUL *et al.*, 2012; SENA, 2004; WANG *et al.*, 2003).

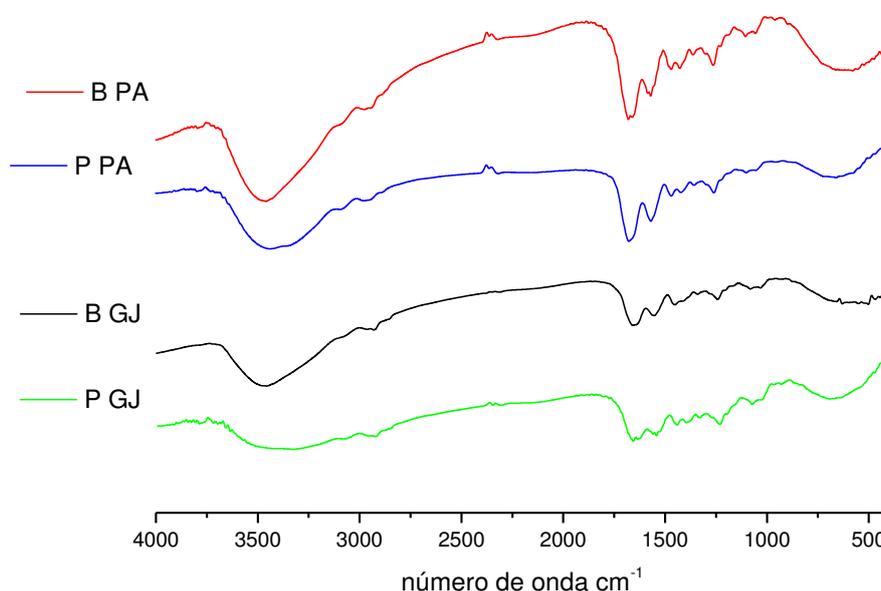
As transições características observadas para estes materiais foram:

- 3600 - 3200  $\text{cm}^{-1}$  - estiramentos O-H e N-H, provenientes das moléculas de água fisicamente adsorvidas e dos grupamentos amino;
- 2900-2840  $\text{cm}^{-1}$  - referente ao estiramento C-H;
- 1654  $\text{cm}^{-1}$  (amida I) - estiramento da carbonila (C=O);
- 1543  $\text{cm}^{-1}$  (amida II) - devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N;
- 1454  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às vibrações dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina;
- 1238  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente às vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H.

Wang *et al.* (2003) encontraram no espectro de FTIR de colágeno puro quatro bandas de amida nas frequências de 3324, 3082, 1659 e 1553  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de

amida I ( $1659\text{ cm}^{-1}$ ) originados de alongamento de C=O e vibrações acopladas a N-H. Bandas de amida II ( $1553\text{ cm}^{-1}$ ) surgiram do alongamento das vibrações N-H e vibrações no acoplamento C-N. Outras aminas, decorrentes das vibrações de alongamento do grupo N-H, de fraca intensidade, apareceram em  $3324$  e  $3082\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 15** - Espectros de FTIR para os colágenos obtidos a partir da bexiga natatória e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba.



**Fonte:** Próprio autor.

Para as bandas de amida I, II e III, nos espectros de colágenos, Chen *et al.* (2008) e Shanmugasundaram *et al.* (2001) relataram ocorrências em 1660, 1550 e  $1240\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, o que está em acordo com os resultados aqui observados. A absorção de amida I surge predominantemente das vibrações C=O, a absorção de amida II é composta de vibrações N-H e C-N. A banda de amida III é complexa, consistindo de componentes a partir de alongamento de ligações C-N e N-H, bem como absorção de grupos  $\text{CH}_2$  da glicina e da prolina. Apresenta uma transição principal, mas outros componentes também podem ser atribuídos a esta banda, a exemplo de vibrações menores em  $1340$  e  $1160\text{ cm}^{-1}$ .

Como pode ser constatado, os dois biopolímeros apresentam elevada semelhança em seus espectros vibracionais, dificultando análises posteriores na obtenção de blendas e outros derivativos. Apesar disto, FTIR foi uma técnica indispensável nestes estudos por atestar a natureza do material formado. Um outro aspecto importante e que merece especial atenção, é que esta técnica permite avaliar a integridade estrutural da tripla hélice do colágeno. Uma proteína só mantém suas biofunções enquanto permanecer com a sua estrutura íntegra. A relação entre as absorbâncias das bandas amida III e dos anéis pirrolidínicos (prolina e hidroxiprolina) é empregada para esta verificação. Valores próximos de 0,5 indicam que o colágeno foi hidrolisado, enquanto que valores próximos da unidade indicam estruturas intactas. Os resultados obtidos para as amostras em questão ficaram próximos de 0,98, indicando, portanto, que houve manutenção da tripla hélice durante todas as etapas de manipulação dos materiais (SENA, 2004; MOREIRA, 2014; TONHI; PLEPIS, 2002; SILVA *et al.*, 2009; ADHIKARIB; DHARA, 2010; CHAVES *et al.*, 2009).

### 5.4.2 Viscosidade e massa molar

Os ensaios viscosimétricos foram realizados com soluções de quitosana e das diversas amostras de colágenos, nas concentrações de 2 a 6 g L<sup>-1</sup>, bem como com o solvente utilizado (ácido acético 0,5 mol L<sup>-1</sup>). A viscosidade ( $\eta_0$ ) da solução solvente determinada foi de 0,968. Os tempos de escoamento para as amostras em função da concentração, bem como as constantes dos capilares, estão apresentados na Tabela 2. A viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) de cada amostra foi determinada a partir das razões entre os tempos de escoamento das amostras, multiplicados pela constante dos respectivos capilares, e a viscosidade da solução solvente. Em seguida, as viscosidades específicas ( $\eta_{sp}$ ) e reduzida ( $\eta_{red}$ ) foram obtidas, em conformidade com as equações 7 e 8, respectivamente. Estes valores também estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Medidas de viscosidade da quitosana e dos colágenos extraídos da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba.

	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Constante (mm <sup>2</sup> /s)	$\eta_r$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$ (L.g <sup>-1</sup> )
<b>QT</b>	2	825	0,004	3,41	2,40	1,20
	3	700	0,008	5,78	4,78	1,59
	4	992	0,008	8,19	7,19	1,80
	5	315	0,035	11,38	10,38	2,07
	6	408	0,035	14,75	13,75	2,29
<b>B PA</b>	2	286	0,004	1,1818	0,1818	0,0909
	3	321	0,004	1,3264	0,3264	0,1088
	4	350	0,004	1,4462	0,4462	0,1115
	5	384	0,004	1,5667	0,5667	0,1173
	6	420	0,004	1,7355	0,7355	0,1225
<b>P PA</b>	2	268	0,004	1,1074	0,1074	0,0537
	3	286	0,004	1,1818	0,1818	0,0606
	4	301	0,004	1,2438	0,2438	0,0609
	5	318	0,004	1,3140	0,3140	0,0628
	6	334	0,004	1,3801	0,3801	0,0633
<b>B GJ</b>	2	340	0,004	1,4049	0,4049	0,2024
	3	400	0,004	1,6528	0,6528	0,2176
	4	460	0,004	1,9008	0,9008	0,2252
	5	530	0,004	2,1900	1,1900	0,2380
	6	600	0,004	2,4793	1,4793	0,2465
<b>P GJ</b>	2	318	0,004	1,3140	0,3140	0,1570
	3	360	0,004	1,4876	0,4876	0,1625
	4	415	0,004	1,7148	0,7148	0,1787
	5	460	0,004	1,9008	0,9008	0,1801
	6	530	0,004	2,1900	1,1900	0,1983

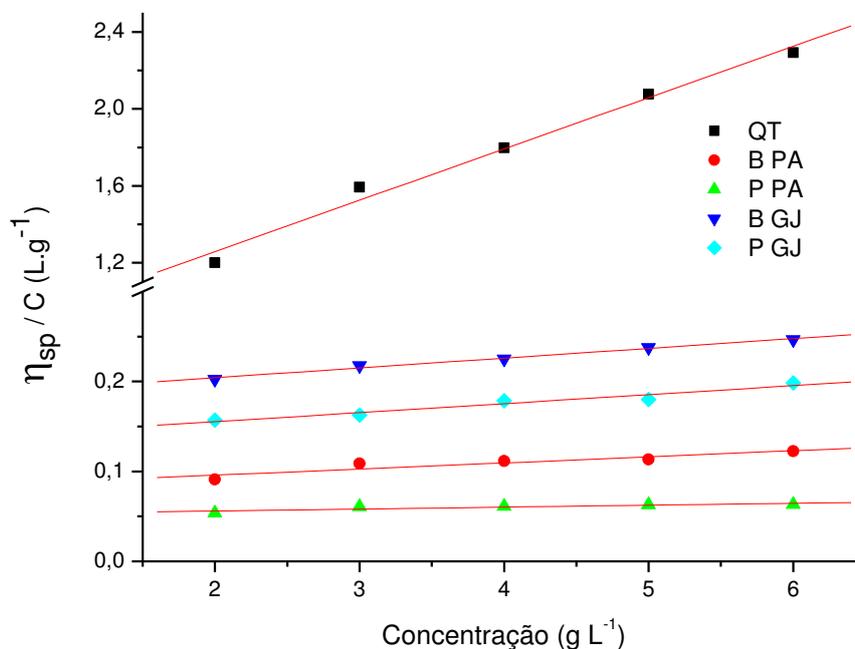
Fonte: Próprio autor.

A Figura 16 ilustra os gráficos de viscosidade reduzida ( $\eta_{sp}/c$ ) versus concentração para todos os biopolímeros puros. Estes gráficos são necessários para que se obtenha, por extrapolação, as respectivas viscosidades intrínsecas (Eq. 9). Os valores obtidos foram: quitosana (0,7253 L g<sup>-1</sup>), colágeno da bexiga natatória da Pescada

Amarela, B-PA (0,08227 L g<sup>-1</sup>), colágeno da pele da Pescada Amarela, P-PA (0,05168 L g<sup>-1</sup>), colágeno da bexiga natatória da Gurijuba, B-GJ (0,18252 L g<sup>-1</sup>) e colágeno da pele da Gurijuba, P-GJ (0,13523 L g<sup>-1</sup>). Para os colágenos, a ordem observada nos valores das viscosidades foi: P-PA < B-PA < P-GJ < B-GJ, um pouco diferente da ordem observada para os teores de 4-Hy e de proteína, em que a B-PA foi levemente superior a P-GJ. Explicações para este fato talvez fossem encontradas pela determinação do pI (ponto isoelétrico) das respectivas proteínas (6,5 – 8,5), uma vez que em determinado pH irão produzir mais ou menos cargas e interagir de modo diferenciado com o solvente (SILVA e PENNA, 2012).

As soluções de quitosana mostraram-se mais viscosas que as respectivas de colágeno. Ye et al. (2007), trabalhando com quitosana com 85% GD e com colágeno extraído de pele de porco, obtiveram resultados semelhantes. Os menores valores de viscosidade apresentados pelas soluções dos colágenos em relação a da quitosana, pode ser explicada pela disposição de cargas positivas e negativas do colágeno, uma vez que o colágeno é carregado positivamente em solução de ácido acético. Neste caso, as interações eletrostáticas entre o grupo funcional amina carregado positivamente tem um efeito importante sobre a agregação e conformação estrutural das moléculas de colágeno (LI, Y *et al.*, 2014). Em relação aos coeficientes de variação, mesmo os menores valores observados estão de acordo com a literatura (LOCILENTO, 2012).

**Figura 16** – Curvas da viscosidade reduzida em função da concentração das soluções dos biopolímeros ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Valores de regressão: Quitosana ( $y = 0,7253 + 0,2666C$ ,  $R = 0,993$ ), B-PA ( $y = 0,08227 + 0,00679C$ ,  $R = 0,927$ ), P-PA ( $y = 0,05168 + 0,00215C$ ,  $R = 0,881$ ), B-GJ ( $y = 0,18252 + 0,01086C$ ,  $R = 0,995$ ), P-GJ ( $y = 0,13523 + 0,01003C$ ,  $R = 0,973$ ).



Fonte: Próprio autor.

Estudos de viscosidade de polímeros têm sido reportados na literatura. Brodowski *et al* (1996), por exemplo, sintetizaram polieletrólitos, como o poli(fenileno) (PPP), e encontraram um aumento da viscosidade reduzida em função da concentração para soluções aquosas diluídas. Song *et al* (2009) estudaram a viscosidade de soluções aquosas de celulose, em diferentes temperaturas, e para concentrações extremamente diluídas observaram que a curva de viscosidade reduzida versus a concentração mostrou uma ascendente tendência com a diminuição da concentração.

Domenek *et al* (2008) encontraram um aumento da viscosidade reduzida em função da concentração, para soluções aquosas diluídas de gelatina, que é a forma hidrolisada do colágeno. Estes e outros autores (SHOULDERS *et al.*, 2009) ressaltam a importância de se trabalhar os ensaios de viscosidade de colágeno em soluções diluídas, uma vez que as moléculas de colágeno são propensas a agregação em soluções com alta concentração.

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado por uma macromolécula, o qual está relacionado com o tamanho e conformação das cadeias macromoleculares em um solvente. Quanto maior for o volume hidrodinâmico, maior será  $[\eta]$ . Portanto,  $[\eta]$  depende da massa molar e da interação entre os segmentos do polímero e das moléculas do solvente. Quanto maior for esta interação, maior será a estrutura do polímero. Assim, medidas de viscosidade intrínseca têm sido usadas para a caracterização de macromoléculas, bem como para a determinação da sua massa molar.

A relação entre viscosidade intrínseca e a massa molar do polímero, equação de Staudinger- Mark- Houwink, foi apresentada na Eq. 10. As constantes  $k$  e  $a$  são estabelecidos experimentalmente, para uma determinada temperatura. Portanto, a partir da Eq. 10 e dos valores das viscosidades intrínsecas, as massas molares da quitosana e dos colágenos foram estimadas.

Para a quitosana, considerando o grau de desacetilação encontrado, solvente e temperatura utilizados,  $K$  de  $7,4 \times 10^{-5} \text{ L.g}^{-1}$  e  $a$  de 0,76 (LOCILENTO, 2012; RINAUDO, 2006), a massa molar média calculada foi de  $3,7 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ . Este valor é dependente da natureza e preparação do material. Entretanto, a título de comparação, citamos os trabalhos de Santos (2014), que prepararam quitosana (GD % 93,19) a partir da extração de  $\beta$ -quitina de gládios de lula, que encontraram um valor de  $2,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , assim como Locilento (2012) para uma quitosana com GD % de 91, obteve um valor de  $2,31 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ .

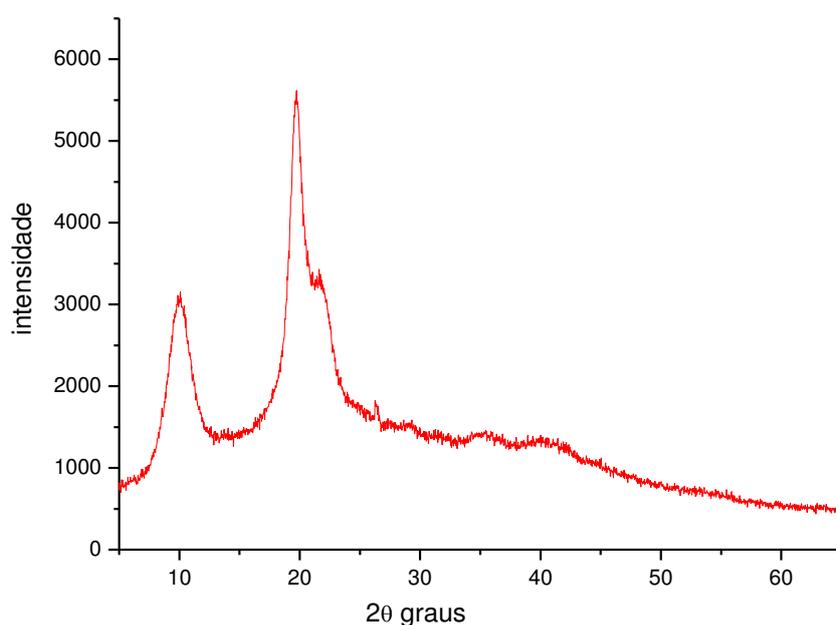
Para as amostras de colágeno, os valores dos parâmetros empregados foram  $K = 1,66 \times 10^{-8} \text{ L.g}^{-1}$  e  $a = 0,885$  (VORON'KO, 2016; MARK, 1999). As massas molares calculadas foram: B-PA =  $3,6 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ ; P-PA =  $2,2 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ ; B-GJ =  $9,0 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$  e P-GJ =  $6,4 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ .

Poucos estudos são encontrados na literatura para determinação da massa molar do colágeno por viscosimetria, dificultando comparações. Citamos aqui o trabalho de Porto (2007), o qual envolveu colágeno desnaturado. O valor da massa molar calculada por ele foi de  $1,8 \times 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$ , coerente com os resultados aqui apresentados.

## 5.4.3 Difractometria de Raios-X - DRX

Para avaliar a cristalinidade dos materiais, os colágenos e a quitosana foram submetidos à análise por difração de Raios X (DRX). As Figura 17 e 18 mostram os difratogramas obtidos para os polímeros puros, a quitosana e colágenos, respectivamente.

**Figura 17** - Difratoograma de Raios-X da Quitosana.

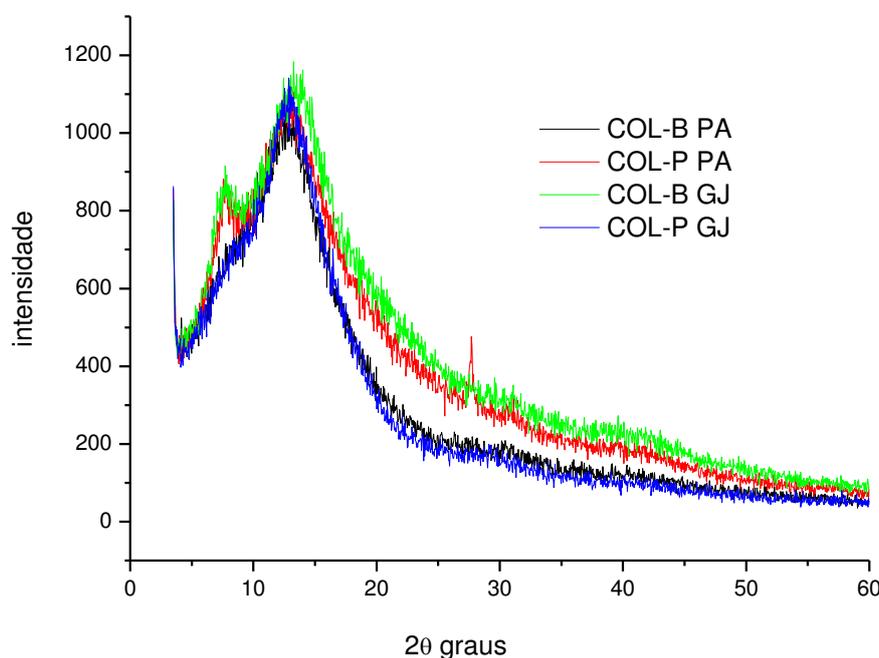


**Fonte:** Próprio autor.

O difratograma da amostra de quitosana apresentou um perfil típico, característico de material semicristalino. Foram observados picos em  $2\theta = 10^\circ$ ,  $20^\circ$ , com um ombro em  $21,6^\circ$ , em concordância com o padrão de difração descrito por Liu *et al.* (2013), Moreira (2014), Nery (2014) e Chen *et al.* (2008).

Os colágenos também apresentaram perfis típicos, característicos de materiais colagenosos, com fases amorfas e baixos domínios cristalinos. Observou-se, para todos os difratogramas, um pico largo na faixa de  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $25^\circ$ , com máximo em  $12,9^\circ$  e um ombro em  $2\theta = 7,6^\circ$ . Estas observações estão de acordo com os resultados observados na literatura (SENA, 2004; CHEN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2006).

**Figura 18** - Difratoograma do colágeno a partir da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba.



**Fonte:** Próprio autor.

#### 5.4.4 Análises Térmicas - Análise Termogravimétrica (TG/DTG) / Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) / Análise Térmica Diferencial (DTA)

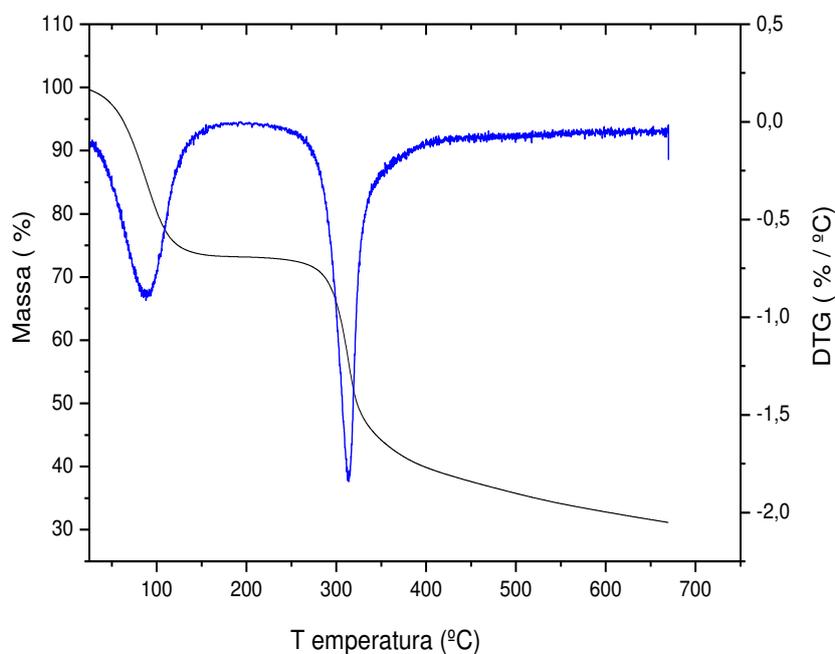
As características térmicas dos biopolímeros foram avaliadas por TG/DTG, DTA e DSC. Estas análises podem fornecer importantes parâmetros para a diferenciação entre os polímeros puros e as possíveis blendas formadas, além de informações quanto a estabilidade e aplicação dos materiais, em função das alterações promovidas pela temperatura.

As curvas TG/DTG, DTA e DSC da quitosana e dos colágenos (bexiga e pele da Pescada Amarela) estão apresentados nas Figuras 19-23.

Para a quitosana, o perfil térmico observado foi característico do material, com dois eventos bem definidos: o primeiro, referente à desidratação do material, apresentou um máximo em 87 °C e perda de massa de 25 %; o segundo, atribuído à degradação das cadeias poliméricas da quitosana e liberação do residual de umidade presente, entre 250 e 350 °C apresentou um pico máximo em 310 °C e uma perda de

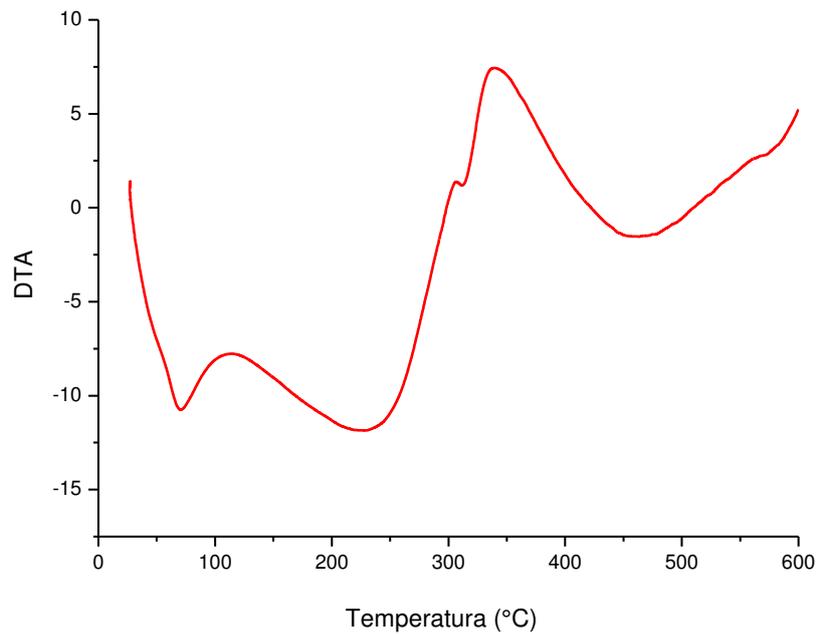
massa de 55 % (MOREIRA, 2014; BRITO; CAMPANA FILHO, 2007; CHAVES et al., 2009).

**Figura 19** - Curvas de TG/DTG para a quitosana em atmosfera de N<sub>2</sub>.

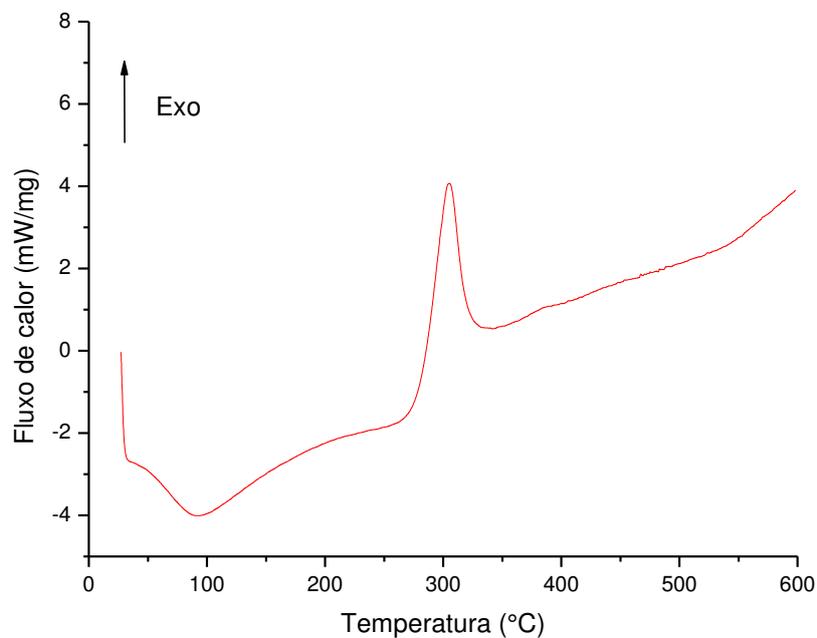


**Fonte:** Próprio autor.

As curvas de DTA e DSC para a quitosana estão apresentadas nas Figuras 20 e 21, respectivamente. A perda de água por aquecimento (1º. Evento) está indicada em ambas as curvas como um processo endotérmico e nas temperaturas máximas de 82 e 92 °C, respectivamente. O segundo evento de perda de massa está claramente indicado na curva de DSC como um processo exotérmico, com máximo em 305 °C. Estes resultados estão em perfeito acordo com o perfil do TG e coerentes com a literatura (PEREIRA, 2013; SANTOS *et al.*, 2003; MOREIRA, 2014; SIONKOWSKA *et al.*, 2006; SHANMUGASUNDARAM *et al.*, 2001). Entretanto, o segundo evento não está claramente contemplado na curva de DTA, o qual apresentou dois picos exotérmicos, centrados em 350 °C e 550 °C, aproximadamente. Na curva de TG nota-se um pequeno decaimento por volta de 550 °C, coincidindo com segundo pico exotérmico do DTA.

**Figura 20** - Curva de DTA da quitosana, em atmosfera de N<sub>2</sub>.

**Fonte:** Próprio autor.

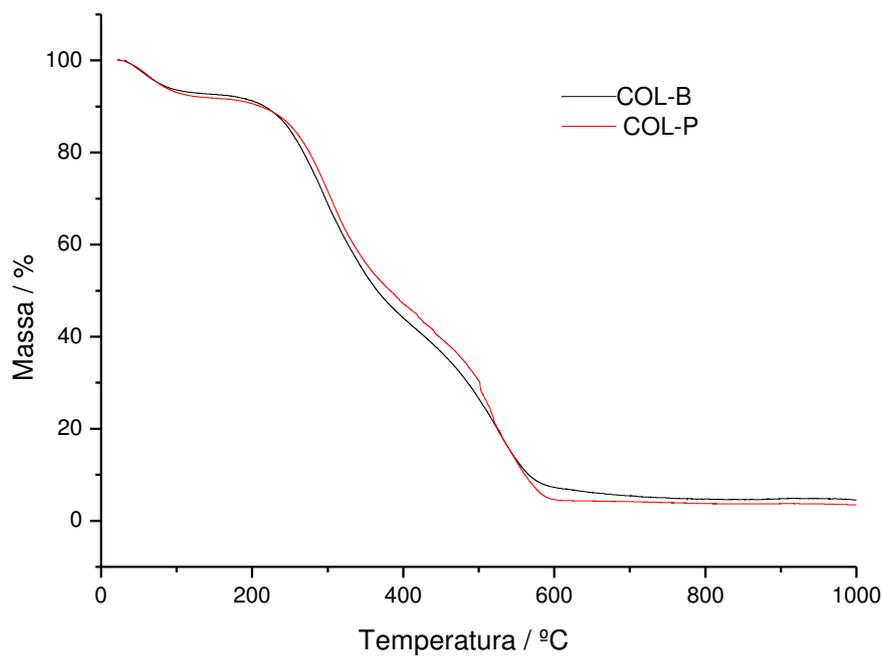
**Figura 21** - Curva DSC para a quitosana, em atmosfera de N<sub>2</sub>.

**Fonte:** Próprio autor.

A Figura 22 mostra as curvas de TG obtidas para os colágenos da bexiga e pele da Pescada Amarela. Podem-se observar três estágios com perdas de massa. O primeiro, na faixa de 25 °C a 100 °C, com uma perda relativa a 8 %, correspondente à saída da água estrutural e adsorvida, observada com um pico endotérmico em 60 °C na curva de DTA (Figura 23). O segundo estágio, entre as temperaturas de 200 °C e 350 °C, com aproximadamente 40 % de perda de massa, é atribuído a perda da água fortemente ligada no material, bem como o início da degradação pirolítica da cadeia polimérica, a qual é finalizada no último estágio, até a temperatura de 600 °C e com perda de massa de, aproximadamente, 40 %. (MOREIRA, 2014; BRITO; CAMPANA FILHO, 2007; CHAVES et al., 2009; CUCOS, 2014; HORN *et al*, 2009). A curva de DTA para todos os colágenos (Figura 23) apresentou um discreto pico exotérmico entre as temperaturas 350 °C e 550 °C, indicando degradação das amostras, confirmando o resultado de TG (Figura 23).

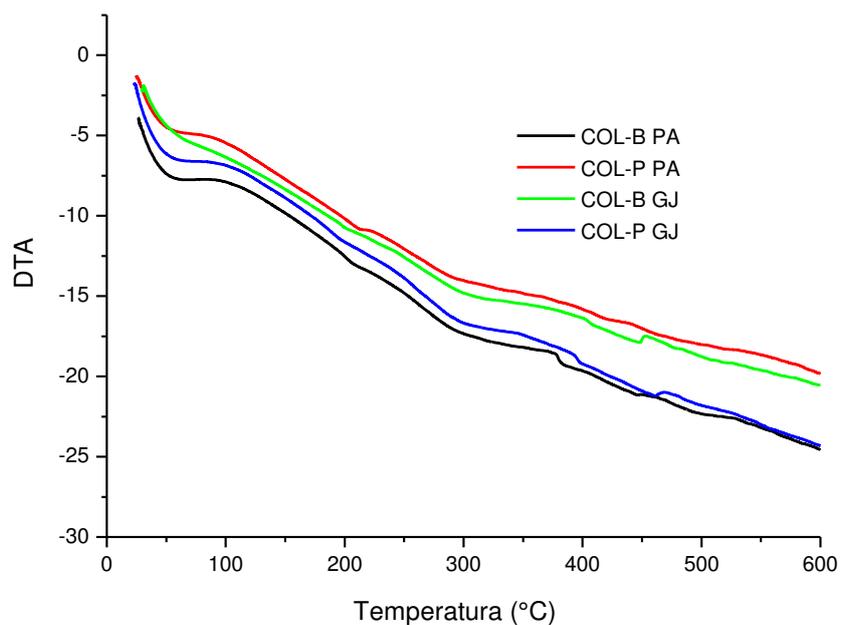
Shanmugasundaram *et al.* (2001) e Sionkowska (2003) também realizaram medidas de colágeno por DSC e encontraram dois picos nas mesmas faixas de temperatura aqui apresentadas, entre 63°- 166 °C e 270-290 °C. Estes eventos foram também associados à perda de moléculas de água e decomposição da molécula de colágeno, respectivamente. Este resultado pode-se comparar com a temperatura de desidratação e degradação do colágeno que utilizamos neste trabalho, que foi de 25-100 °C e 200-600 °C, respectivamente, que encontramos por TG. Montoya et al (2010) relataram apenas um pico endotérmico (DSC) na faixa de temperatura investigada (20 – 150 °C), com máximo em 117,7 °C, que foi atribuído a quebra de ligações cruzadas no material.

**Figura 22** - Curvas de TG para a bexiga e pele da Pescada Amarela em atmosfera de N<sub>2</sub>.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 23** - Curva de DTA do colágeno a partir da bexiga e pele da Pescada Amarela e Gurijuba em atmosfera de N<sub>2</sub>.



Fonte: Próprio autor.

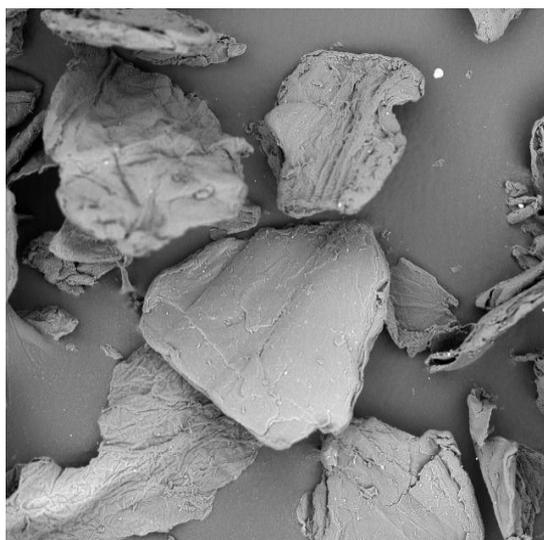
#### 5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica dos materiais é de fundamental importância para definir sua forma, organização e tamanho das partículas. Sendo assim, a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem se demonstrado essencial na observação e análise da microestrutura de superfícies (SENA, 2004).

A morfologia da quitosana e das amostras de colágeno de bexiga e pele da Pescada Amarela e da Gurijuba pode ser observada nas Figuras 24 a 26.

A quitosana (Figura 24) apresentou-se com estrutura organizada e esponjosa e com relativa homogeneidade (CHAVES et al., 2009; DING *et al.*, 2008). Diferentemente, as amostras de colágeno (Figuras 25 e 26) apresentaram-se com morfologia rugosa, irregular e com bastante heterogeneidade (PEDROSO, 2009; MOREIRA, 2014; LOCILENTO, 2012).

**Figura 24** - Micrografia da quitosana. Aumento de 400x.



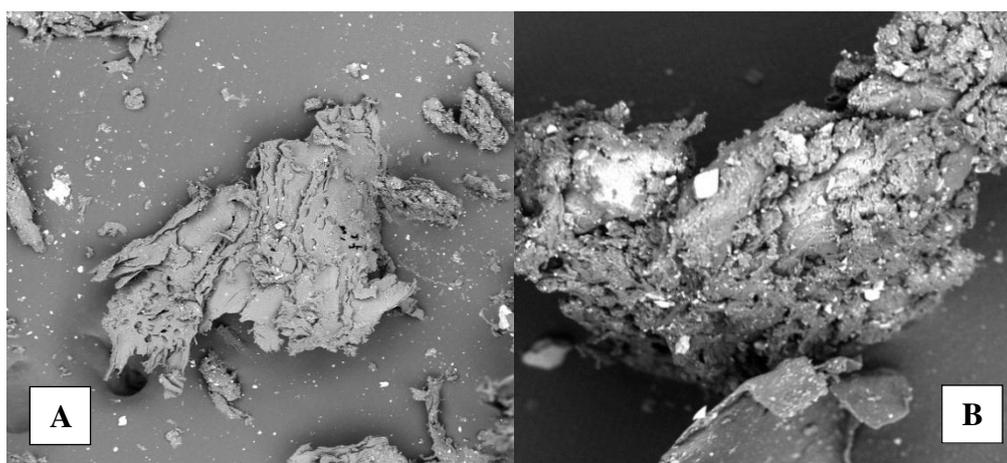
**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 25** - Micrografias de colágeno da bexiga (A) e pele (B) da Pescada Amarela. Aumento de 400x.



**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 26** - Micrografias de colágeno da bexiga (A) e pele (B) da Gurijuba. Aumento de 400x



**Fonte:** Próprio autor.

### **5.5 Caracterização das Blendas Quitosana:Colágeno**

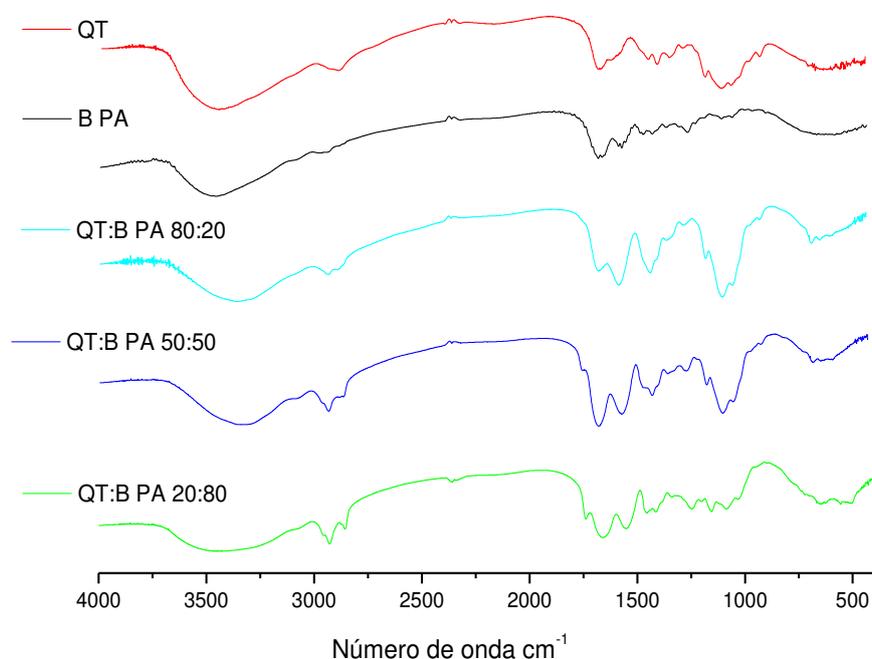
As rotas experimentais elaboradas para a obtenção das blendas biopoliméricas envolveram a mistura de QT:COL em proporções pré-estabelecidas (80:20, 50:50 e 20:80) e a obtenção dos produtos a partir destas misturas. Duas técnicas foram empregadas, uma por eliminação do solvente (liofilização) e outra por precipitação do produto. A técnica de precipitação foi elaborada consoante as

propriedades dos polímeros precursores: o colágeno precipita de suas soluções ácidas por adição de NaCl, enquanto que a quitosana separa-se da solução por adição de NaOH. Assim, alguns conjuntos de blendas poliméricas foram obtidos: por liofilização, por precipitação salina, por precipitação alcalina e por precipitação mista. Para cada conjunto, blendas provenientes de colágeno de pele e da bexiga natatória de dois peixes comerciais e de grande interesse regional, com o objetivo de investigar a diferença entre as duas fontes de colágeno. Todos os conjuntos de blendas foram caracterizados pelas mesmas técnicas previamente discutidas para os polímeros precursores.

### 5.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

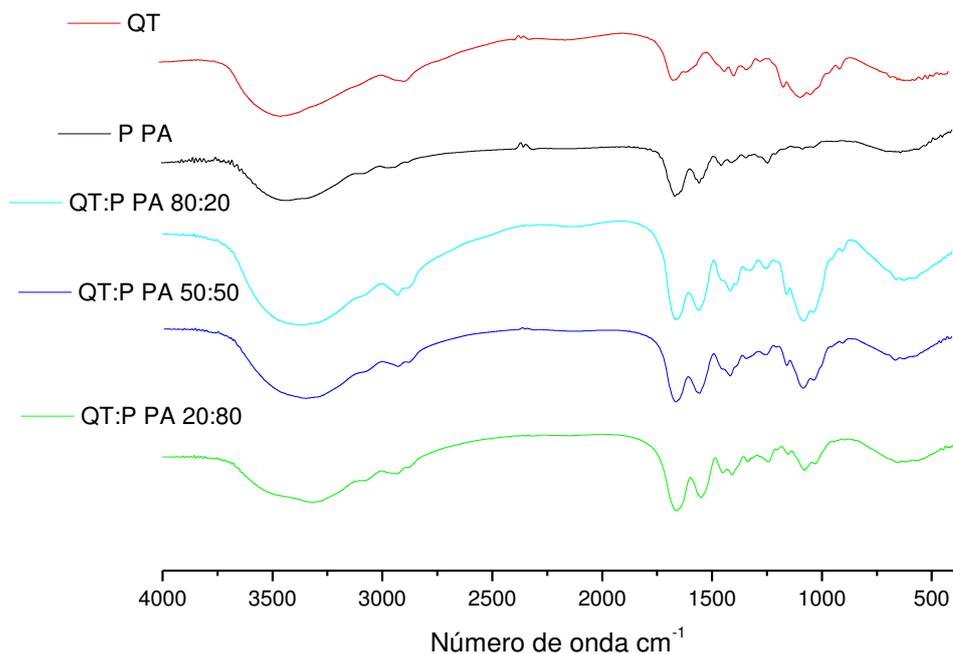
Os espectros vibracionais para as amostras obtidas pelo procedimento com liofilização estão apresentados nas Figuras 27-30. Para facilitar as análises, nas Figuras foram acrescentados os espectros da quitosana e dos respectivos colágenos, ambos previamente comentados.

**Figura 27** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.



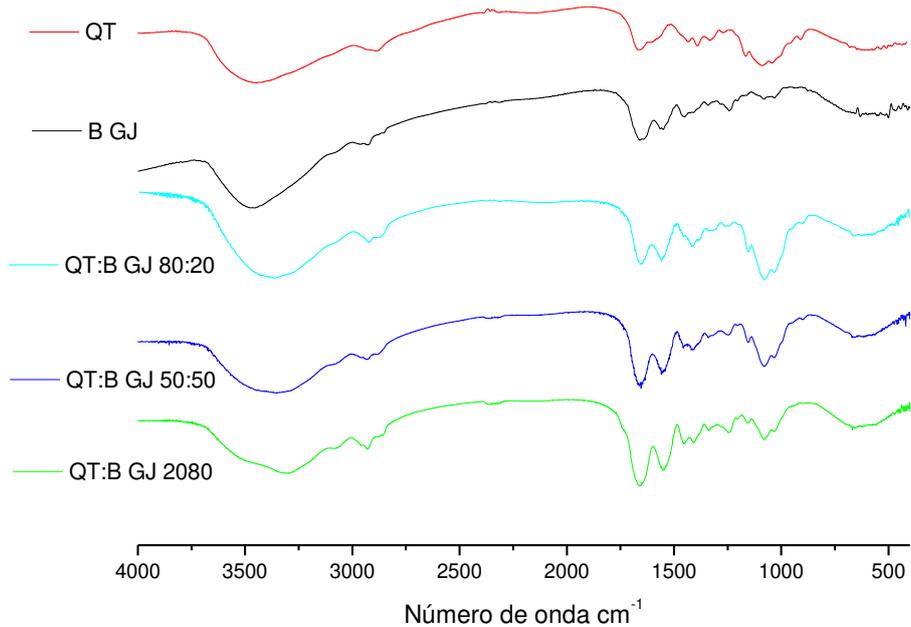
**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 28** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.



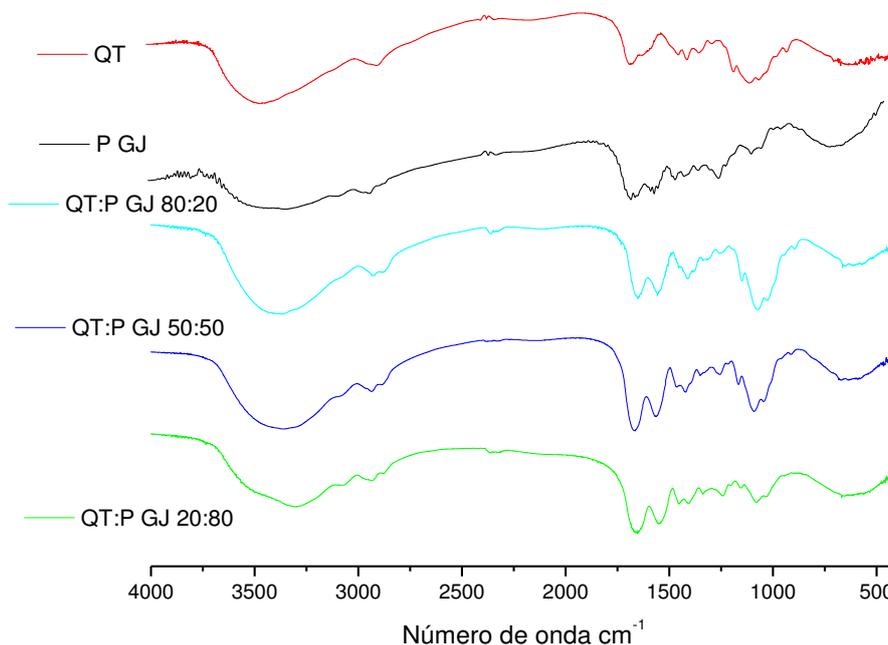
Fonte: Próprio autor.

**Figura 29** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 30** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por liofilização.



**Fonte:** Próprio autor.

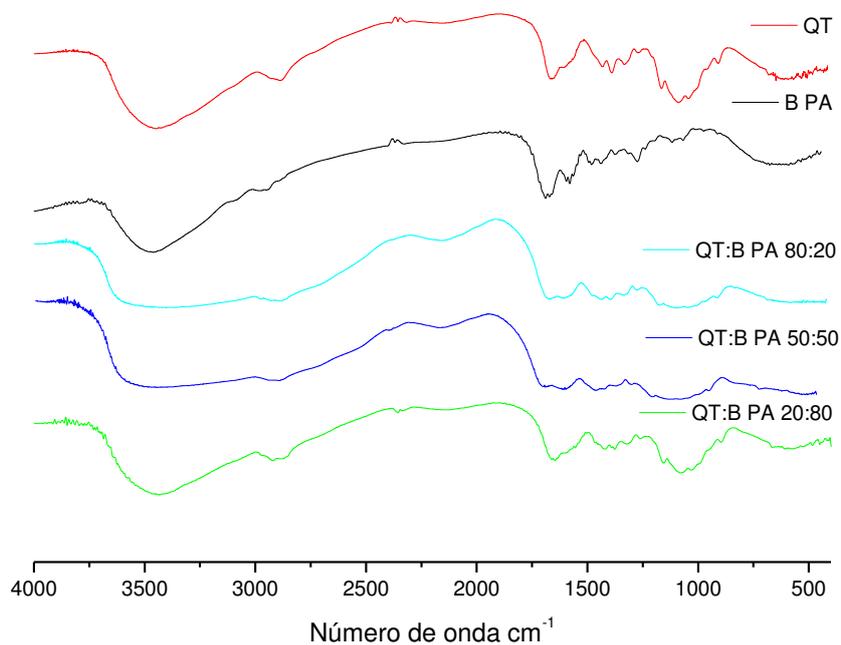
Conforme comentado anteriormente, os perfis vibracionais dos biopolímeros puros são bastante semelhantes, dificultando observações mais conclusivas. Entretanto, ressalta-se que em todas as blendas obtidas por liofilização foram observados os picos característicos dos materiais precursores, sem aumento no número de bandas, a exemplo de outros trabalhos na literatura (PEREDA et al., 2011; MONTOYA et al., 2010). Entretanto, observaram-se bandas em  $1654\text{ cm}^{-1}$  e  $1553\text{ cm}^{-1}$ , característico de amida I (C=O) e amida II (ligação N-H e C-N), respectivamente, encontrado frequentemente com mais intensidade em moléculas de colágeno, percebeu-se ainda um aumento na intensidade destas bandas nos materiais produzidos quando a proporção de colágeno foi maior que a de quitosana. Isso ocorre principalmente com a banda da amida II. Notou-se também uma banda intensa em  $1082\text{-}1025\text{ cm}^{-1}$ , decorrentes da estrutura polissacarídea, referente ao estiramento de grupos C-H e ao estiramento cíclico C-O. Bandas nestes comprimentos de onda são frequentes em compostos de quitosana, conseqüentemente os compostos com proporções maiores de quitosana em relação ao colágeno esta banda aparece com maior intensidade. Isto indica que ocorreu interação entre os biopolímeros colágeno e quitosana quando as blendas foram formadas.

Outra observação é com relação a banda de maior intensidade na região 1412-1454  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às vibrações dos anéis pirrolidínicos da prolina e da hidroxiprolina para o colágeno, e à deformação axial de C-N da amida para a quitosana. Esta banda reflete o conteúdo de colágeno no meio, indicando miscibilidade do material e sugerindo, portanto, interações entre as matrizes poliméricas (MONTROYA et al., 2010).

Entretanto, pelo procedimento da liofilização os precursores sempre estarão juntos, mediados ou não por interações de qualquer natureza. O não surgimento de uma banda nova, ou o não desaparecimento de uma vibração específica, bem como o aumento na amplitude de algumas transições, têm sido utilizados pelos investigadores como indicativo de interação eletrostática entre ambos, bem como justificativa para a miscibilidade observada em filmes e membranas (LOCILENTO, 2012; TONHI e PEPLIS, 2002; HORN, 2010; FAIKRUA et al., 2009; TANGSADTHAKNN et al., 2006). Caso haja interação entre as matrizes em solução, a precipitação do material poderia revelar algo desta interação, daí a escolha da adição de diferentes precipitantes ao meio.

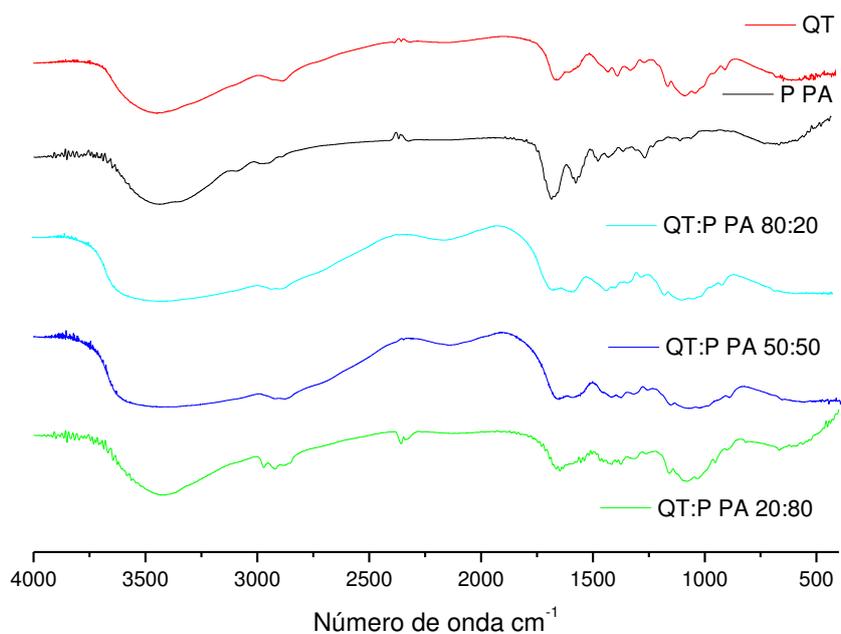
Nas Figuras 31-42 estão apresentados os espectros vibracionais para as blendas obtidos por precipitação. Os espectros das amostras precipitadas com NaOH/NaCl estão apresentadas nas Figuras 31-34, os espectros das amostras precipitadas com NaOH estão apresentadas nas Figuras 35-38 e os espectros das amostras precipitadas com NaCl estão apresentadas nas Figuras 39-42.

**Figura 31** – Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.



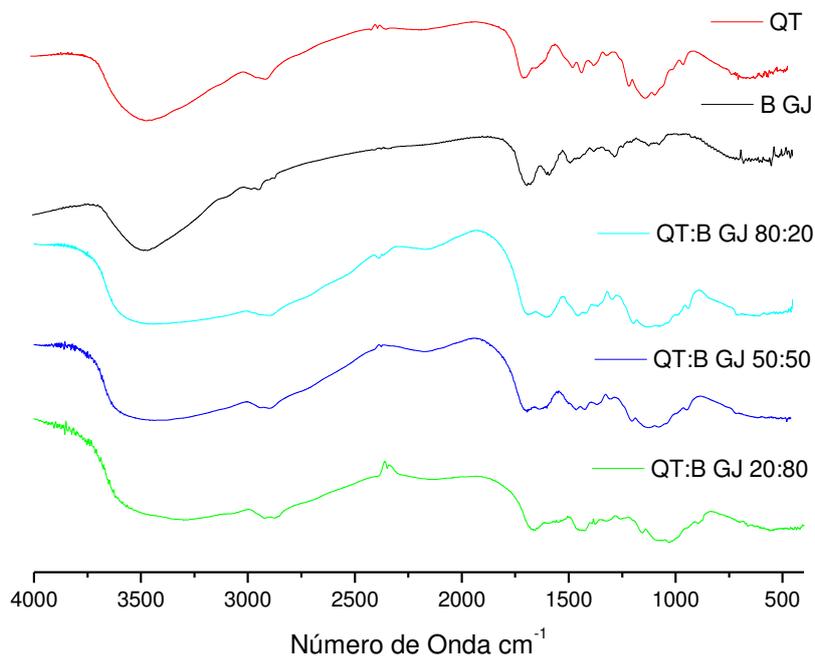
Fonte: Próprio autor.

**Figura 32** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.



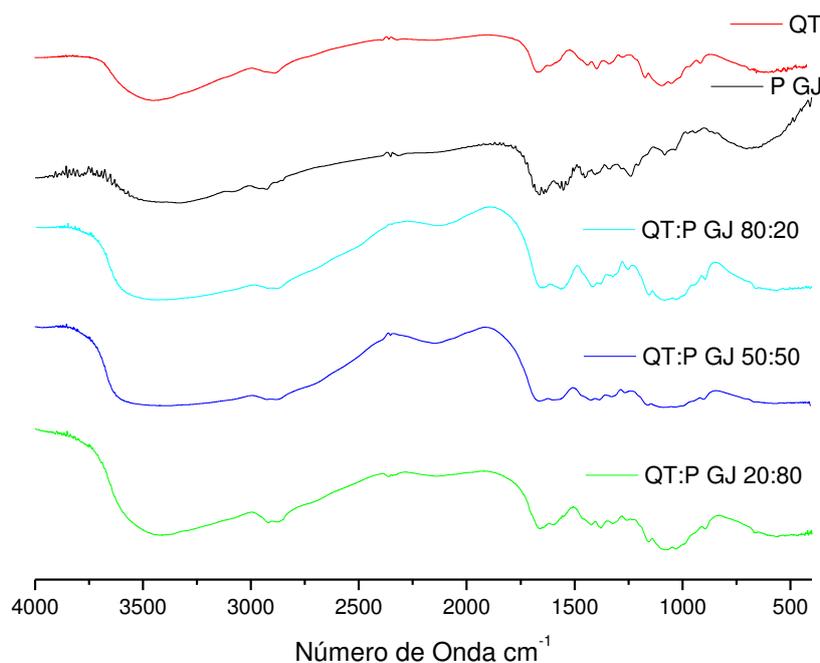
Fonte: Próprio autor.

**Figura 33** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.



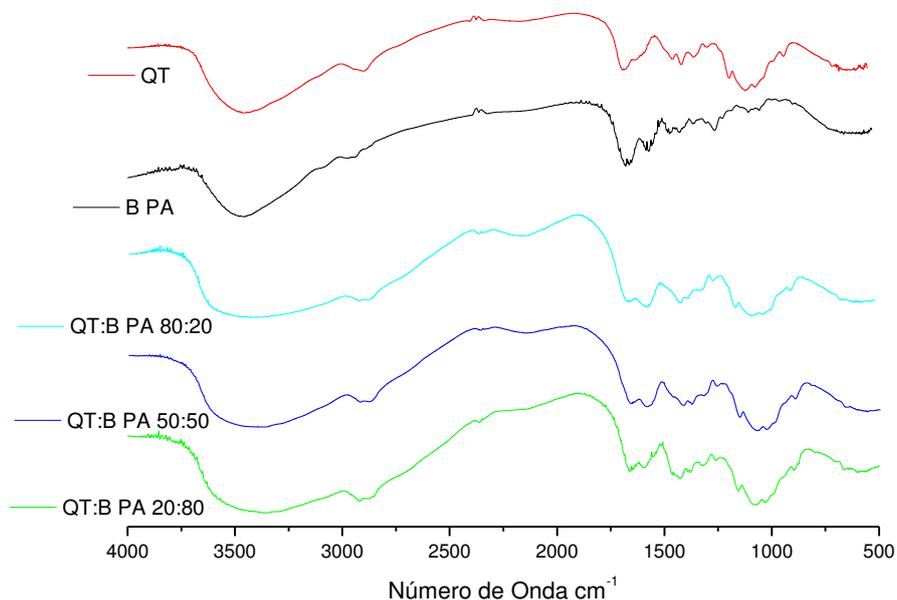
Fonte: Próprio autor.

**Figura 34** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.



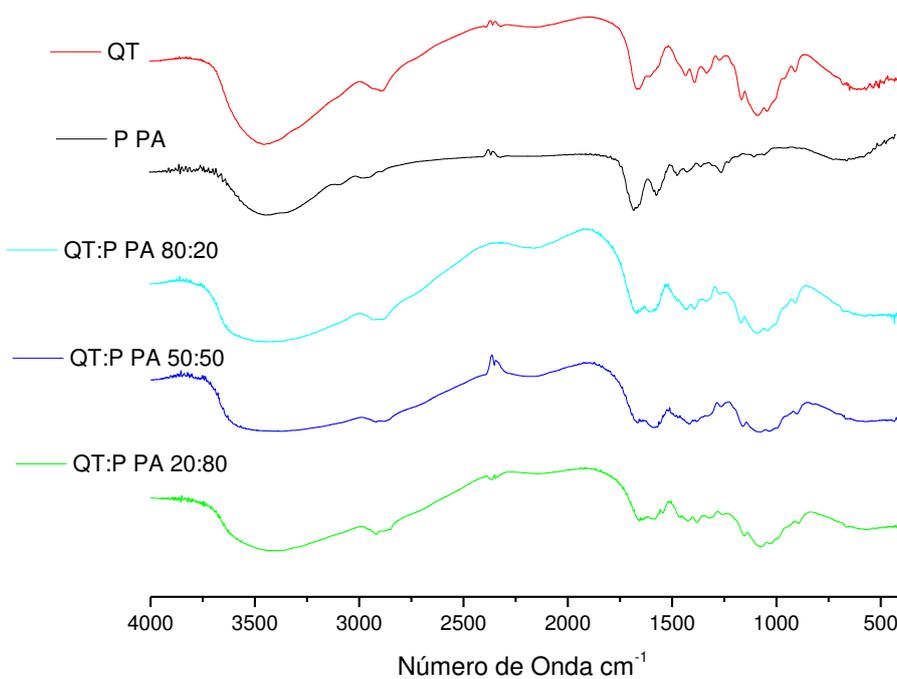
Fonte: Próprio autor.

**Figura 35** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.



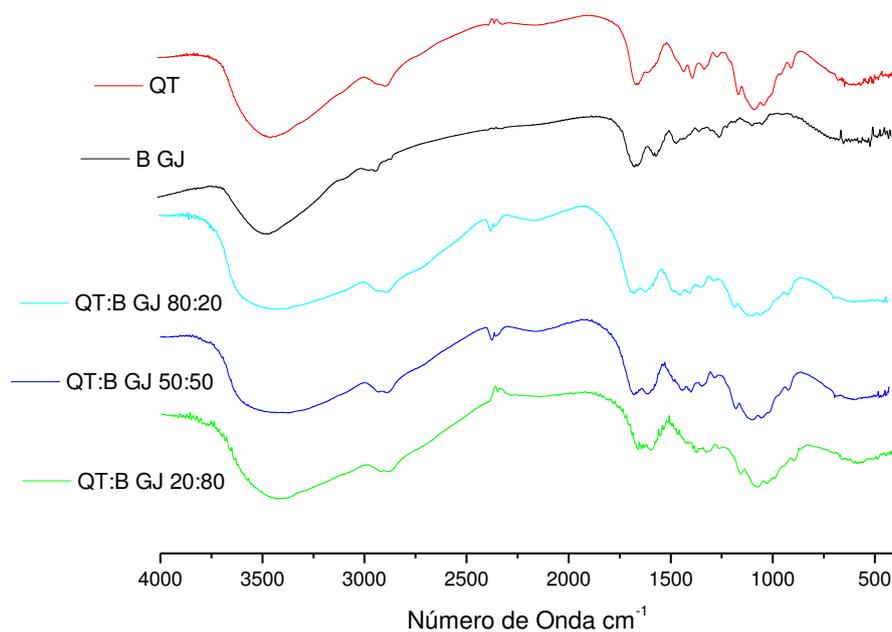
Fonte: Próprio Autor

**Figura 36** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.



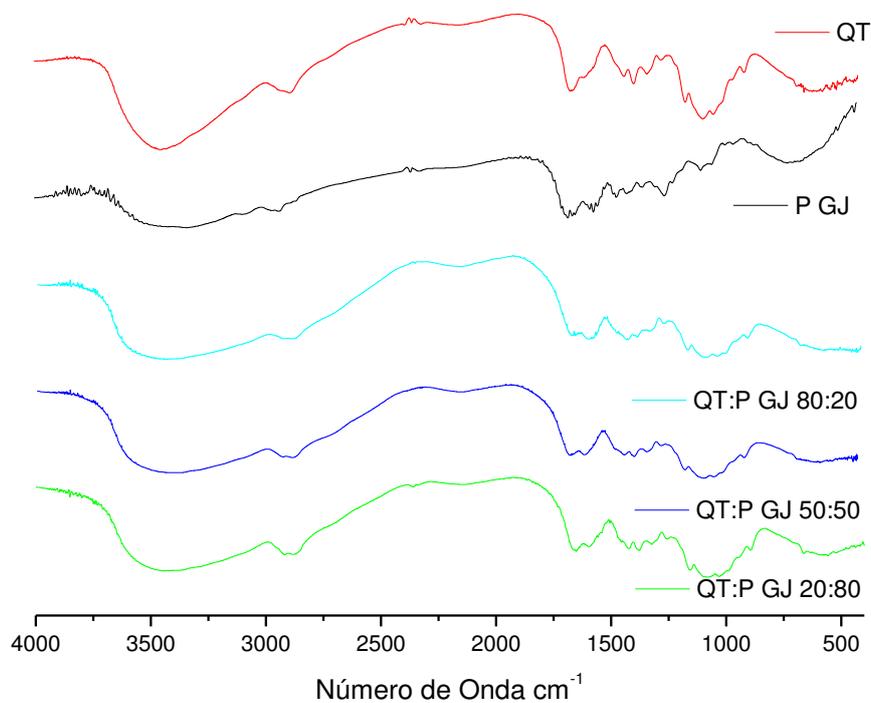
Fonte: Próprio autor.

**Figura 37** – Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.



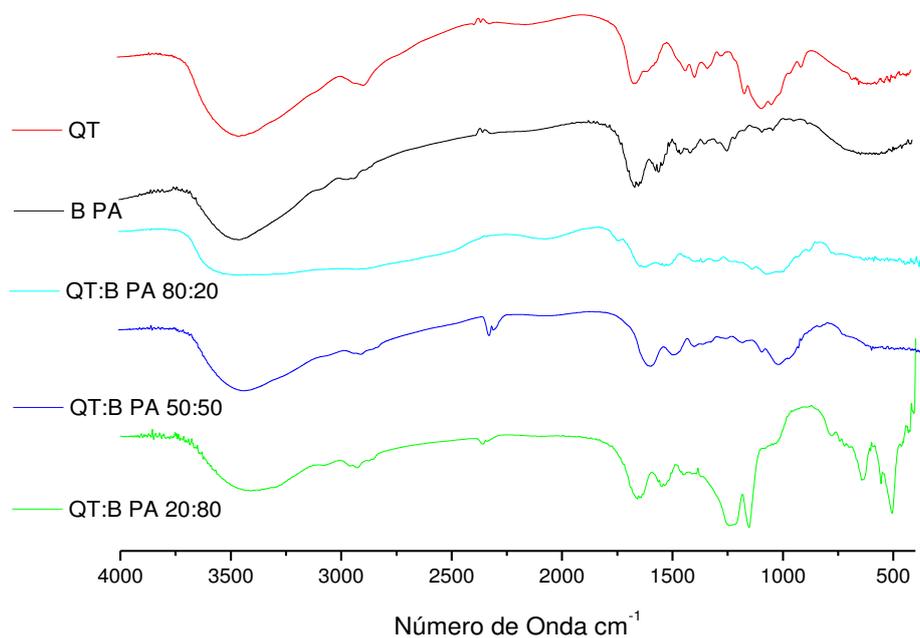
**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 38** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaOH.



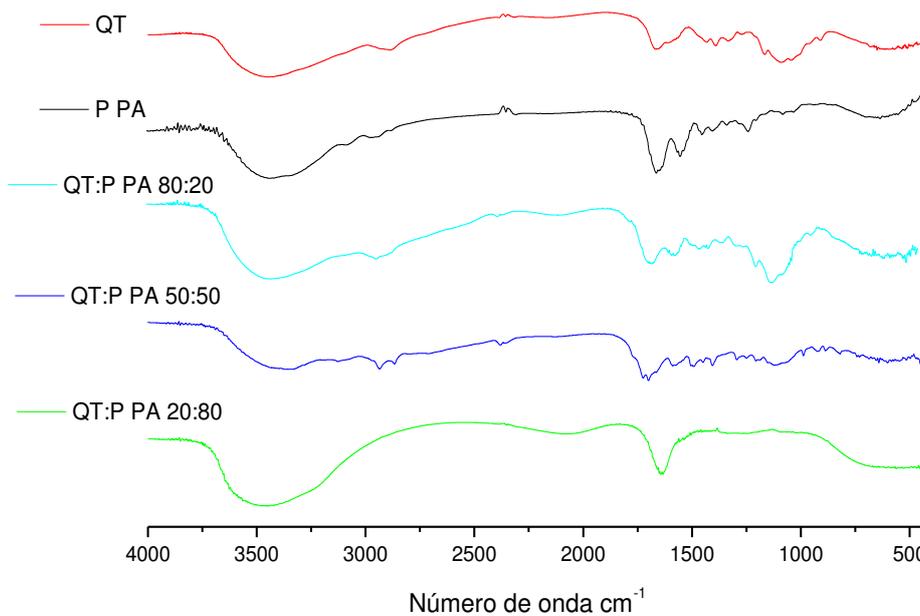
**Fonte:** Próprio autor

**Figura 39** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.



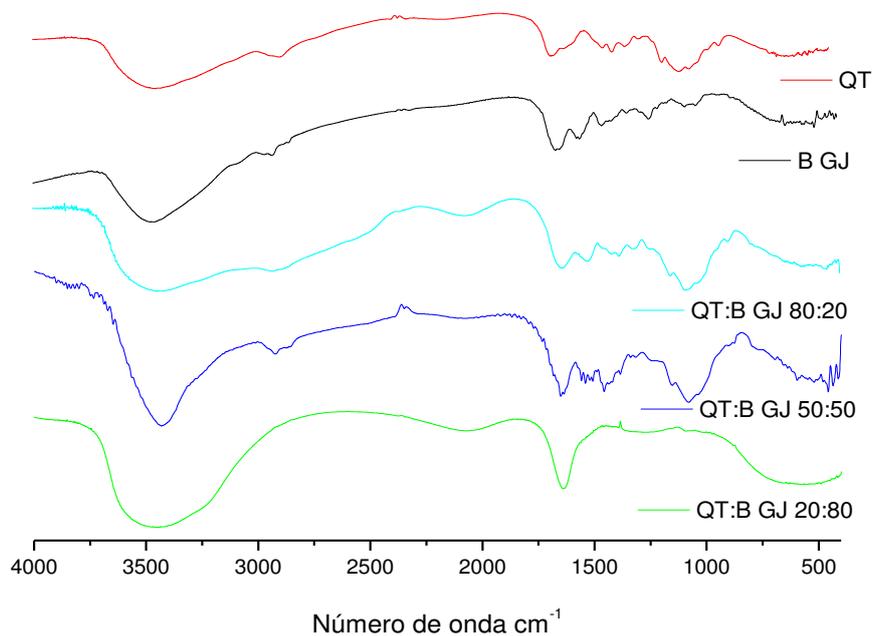
Fonte: Próprio autor.

**Figura 40** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-PA 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.



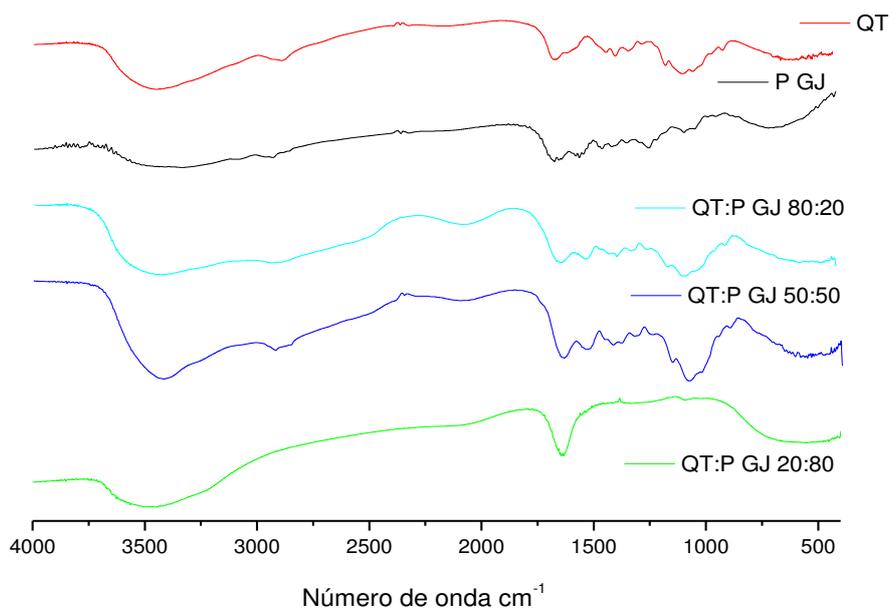
Fonte: Próprio autor.

**Figura 41** - Espectros de FTIR para as blendas QT:B-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 42** - Espectros de FTIR para as blendas QT:P-GJ 80:20, 50:50 e 20:80, obtidas por precipitação com NaCl.



Fonte: Próprio autor.

A adição de NaOH/NaCl foi para favorecer a precipitação simultânea dos precursores. Espera-se, portanto, que os produtos obtidos, contendo ambos os biopolímeros, apresentem semelhanças com os originados por liofilização. De fato, em linhas gerais, podem-se observar estas semelhanças, notadamente em número e posição das vibrações. Dividindo-se o espectro vibracional em quatro regiões ( $\text{cm}^{-1}$ ), por exemplo, entre 4000 e 2800; 2800 – 1800; 1800 – 800 e abaixo de 800, os números de transições observadas nos precursores são em média: 3; 0; 9; 1. Este perfil é observado em todas as precipitações mistas. Entretanto, há um alargamento da transição  $\nu(\text{OH})$  em virtude da forte interação entre os polímeros e moléculas do solvente.

É possível a observação da proporcionalidade dos precursores nas blendas. Por exemplo, nota-se que com a maior proporção de quitosana houve diminuição dos picos de amida I e amida II ( $1662 \text{ cm}^{-1}$  e  $1555 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente), os quais são observados no colágeno em maior intensidade. Essa observação condiz com os resultados encontrados por Sionkowska *et al.* (2004).

Interessante, entretanto, os resultados observados para os materiais obtidos a partir da precipitação com NaOH (Figuras 35 – 38). O meio alcalino favorece a precipitação da quitosana, em virtude da neutralização dos grupos aminos protonados e menor interação do biopolímero com o solvente. Entretanto, percebe-se que, para as três composições de misturas, os espectros foram semelhantes aos precursores, indicando precipitação de ambos polímeros. Este aspecto reforça a interação entre eles e a formação da blenda. A intensidade do pico da amida I pico, em torno de  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , diminui gradualmente quando aumenta a proporção de quitosana. Por outro lado, um pico intenso em  $1082\text{-}1025 \text{ cm}^{-1}$  característico de quitosana, referente ao estiramento de grupos C-H e ao estiramento cíclico C-O, apareceram mais claramente quando a composição de quitosana foi aumentada. Os resultados, portanto, reforçam a interação entre os biopolímeros. Os resultados foram similares aos relatados por Fernandes *et al.* (2011). A exemplo das blendas NaOH/NaCl, os materiais apresentaram larga banda relativa a vibração  $\nu(\text{OH})$ .

A adição de NaCl favorece a precipitação do colágeno. Os solventes, por maior afinidade com os íons adicionados, saem da esfera de hidratação do biopolímero, facilitando a precipitação dos mesmos (efeito salting out). Pode-se observar que os espectros das blendas (Figuras 39 - 42) diferiram um tanto dos apresentados anteriormente, notadamente com relação aos materiais obtidos a partir da composição

QT:COL 20:80, onde se esperaria maior semelhança com o espectro do colágeno precursor. As demais proporções apresentaram-se semelhantes as outras blendas não liofilizadas. Em relação a banda da amida I, suas intensidades pareceram proporcionais à composição de colágeno na mistura, entretanto, não foi observada a banda correspondente a amida II, aproximadamente em  $1542\text{ cm}^{-1}$ , para os casos da QT:P-PA, QT:P-GJ e QT:B-GJ. Outra banda bem característica do colágeno é a em  $1230\text{ cm}^{-1}$ , correspondente às vibrações no plano da amida III. Esta banda está presente no espectro com maior proporção de colágeno (QT:B-PA, Figura 39), entretanto, não foi observada nos espectro da QT:P-PA, QT:P-GJ e QT:B-GJ (80:20). A banda característica da estrutura polissacarídea da quitosana, observada em  $1050\text{ cm}^{-1}$ , diminui também em conformidade com a proporção deste polímero na blenda, não sendo observada em algumas blendas na proporção 20:80.

Chen *et al.* (2007) prepararam fibras de colágeno:quitosana, caracterizando-os por FTIR. Além das frequências normais, observaram da possibilidade de desacetilação da quitosana, a julgar pelo desaparecimento da banda de amida II e a diminuição da banda de amida III. Entretanto, usaram outro meio solvente (hexafluorisopropanol e ácido trifluoracético).

As análises por FTIR, portanto, permitem observar que as blendas obtidas, a exceção de algumas por precipitação salina, guardam relação com os polímeros precursores, a exemplo do que é observado na literatura. Indicam ainda interações entre os biopolímeros, o que justificaria a precipitação simultânea a partir da adição de precipitantes específicos.

### 5.5.2 Rendimento e Teor de hidroxiprolina e Colágeno

Observado que as rotas podem propiciar a formação de blendas, procurou-se avaliar os rendimentos relativos de cada forma de preparação. De antemão, indica-se que as condições não foram otimizadas (definição ideal de concentração dos agentes precipitantes, tempo de mistura, etc) e que há possibilidades, portanto, de se aumentar as eficiências dos processos.

As rotas de preparação das blendas analisadas mostraram rendimentos variáveis. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Interessante observar, no entanto, que nem sempre o procedimento de liofilização conduziu a maiores rendimentos (valores em **negrito**), como era de se esperar. A precipitação salina, não se

destacou em nenhum momento, embora também não tenha sido sempre a de menor rendimento (valores em itálico).

**Tabela 3** - Rendimento (%) das blendas obtida QT:COL para as proporções 80:20, 50:50 e 20:80. Valores em negrito e em itálico indicam, respectivamente, o maior e o menor rendimento observado.

Blendas	Proporção	Liofilização	Precipitação		
			NaOH/NaCl	NaOH	NaCl
QT:B-PA	80:20	27	22,3	<b>36,3</b>	6,3
	50:50	<b>36</b>	35,5	10,5	11,0
	20:80	<b>34</b>	3,3	8,0	12,0
QT:P-PA	80:20	<b>36</b>	33,2	22,7	4,3
	50:50	<b>29</b>	18,2	8,0	9,0
	20:80	<b>32</b>	4,0	7,0	10,0
QT:B-GJ	80:20	17	<b>44</b>	18,2	5,5
	50:50	3,3	13,3	<b>14,0</b>	10,0
	20:80	<b>44</b>	4,3	8,3	12,0
QT:P-GJ	80:20	34	<b>43,3</b>	8,0	3,3
	50:50	<b>29</b>	20,5	12,2	8,0
	20:80	<b>27</b>	5,0	9,0	10

Fonte: Próprio autor.

Considerando a possibilidade de água adsorvida no processo, bem como o fato de ser bastante semelhante os espectros vibracionais dos polímeros puros, gerando possíveis dúvidas quanto a presença de ambos precursores, as blendas obtidas por precipitação foram também analisadas com relação aos teores de 4-Hy. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

A primeira observação importante é que, em todas as formas de precipitação, o colágeno está presente, sugerindo interação entre os polímeros. Poderíamos imaginar o seu maior conteúdo nas duas primeiras formas de precipitação, mista e alcalina, entretanto, para algumas blendas, a rota com NaCl permitiu a obtenção de um maior conteúdo de colágeno no material.

**Tabela 4** - Teor de Hidroxiprolina e de Colágeno dos blendas obtidos nas três proporções (80:20, 50:50 e 20:80) de quitosana/colágeno de bexiga e pele da Pescada Amarela e de Gurijuba com as três rotas de preparação (precipitação com NaOH/NaCl, NaOH e NaCl).

Blendas	Proporção	Precipitação					
		NaOH/NaCl		NaOH		NaCl	
		4-Hy (mg g <sup>-1</sup> )	Colágeno (mg g <sup>-1</sup> )	4-Hy (mg g <sup>-1</sup> )	Colágeno (mg g <sup>-1</sup> )	4-Hy (mg g <sup>-1</sup> )	Colágeno (mg g <sup>-1</sup> )
QT:B-PA	80:20	<b>4,18</b>	33,44	3,64	29,12	3,85	30,80
	50:50	3,74	29,92	3,03	24,24	<b>3,80</b>	30,40
	20:80	<b>4,73</b>	37,84	4,47	35,76	1,21	9,68
QT:P-PA	80:20	3,55	28,40	3,63	29,04	<b>4,63</b>	37,04
	50:50	3,00	24,00	<b>3,70</b>	29,60	3,63	29,04
	20:80	3,80	30,40	<b>4,54</b>	36,32	3,22	25,76
QT:B-GJ	80:20	3,57	28,56	<b>3,62</b>	28,96	2,95	23,68
	50:50	2,70	21,60	<b>3,80</b>	30,40	0,15	1,20
	20:80	3,63	29,04	<b>6,02</b>	48,16	4,99	39,92
QT:P-GJ	80:20	3,50	28,00	5,23	41,84	<b>5,88</b>	47,04
	50:50	3,85	30,80	3,64	29,12	<b>5,80</b>	46,40
	20:80	<b>4,15</b>	33,20	3,93	31,44	2,95	23,60

Fonte: Próprio autor.

Outro aspecto que pode ressaltar a natureza física da interação entre os biopolímeros, é que não foi observada uma relação estequiométrica entre os conteúdos de 4-Hy e as proporções empregadas para a constituição das blendas. A faixa observada de concentração de 4-Hy foi de 0,15 a 6,02 mg g<sup>-1</sup>, rotas salina e alcalina, respectivamente.

### 5.5.3 Medidas de Viscosidade

Para reduzir o número de amostras e por o colágeno da bexiga da gurijuba apresentar maiores valores de viscosidade, os testes de viscosimetria para verificar a interação QT:COL foram realizados apenas com este colágeno.

O procedimento foi semelhante ao apresentado anteriormente para os polímeros puros e os resultados estão resumidos na Tabela 5.

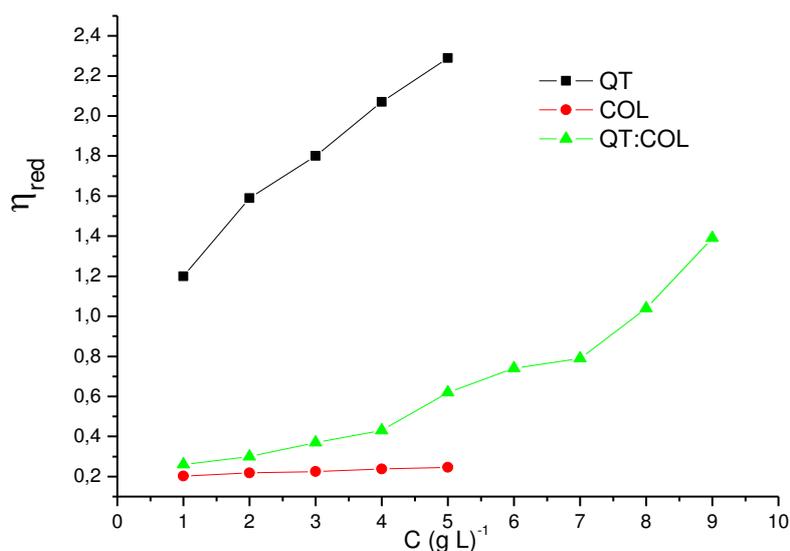
Tabela 5 - Medidas de viscosidade de QT:B GJ

QT:B-GJ	Tempo (s)	Constante ( $\text{mm}^2\text{s}^{-1}$ )	$\eta_r$	$\eta_{sp}$	$\eta_{red}$
10:90	246	0,008	2,03	1,03	0,26
20:80	267	0,008	2,20	1,20	0,30
30:70	301	0,008	2,48	1,48	0,37
40:60	326	0,008	2,70	1,70	0,43
50:50	420	0,008	3,47	2,47	0,62
60:40	479	0,008	3,96	2,96	0,74
70:30	501	0,008	4,14	3,14	0,79
80:20	624	0,008	5,16	4,16	1,04
90:10	793	0,008	6,55	5,55	1,39

Fonte: Próprio autor.

A Figura 43 mostra o comportamento da viscosidade reduzida das soluções de quitosana, colágeno da bexiga da Gurijuba e misturas de QT:B GJ a pH= 3,5 em função das concentrações de 2 a 6  $\text{g.L}^{-1}$  de quitosana e colágeno separadamente (dados mostrados na tabela 2) e misturas destes em diversas proporções (concentração 4  $\text{g.L}^{-1}$ ), partindo da menor proporção de quitosana e maior de colágeno, de acordo com a tabela 5.

Figura 43 - Viscosidade da quitosana, do colágeno e das blendas produzidas.



Fonte: Próprio autor.

A quitosana apresentou viscosidade aproximadamente oito vezes maior que a do colágeno, com a mesma concentração em massa por volume. Como pode ser observado a partir do gráfico, as soluções das misturas aumentaram a viscosidade à medida que aumentou a quantidade de quitosana no material. Os valores das viscosidades foram, portanto, intermediários entre os dos polímeros precursores.

Resultados semelhantes foram apresentados por Ye *et al.* (2007). Os autores, estudando a miscibilidade de blendas de colágeno/quitosana em soluções diluídas, relataram a maior viscosidade da quitosana em relação às soluções de colágeno, bem como valores intermediários para as viscosidades das blendas produzidas em diferentes composições colágeno/quitosana (2/8, 4/6, 5/5, 6/4, 8/2). Concluem os autores que as interações intermoleculares são responsáveis pela miscibilidade de ambos os polímeros, em qualquer concentração e mesmo no estado sólido.

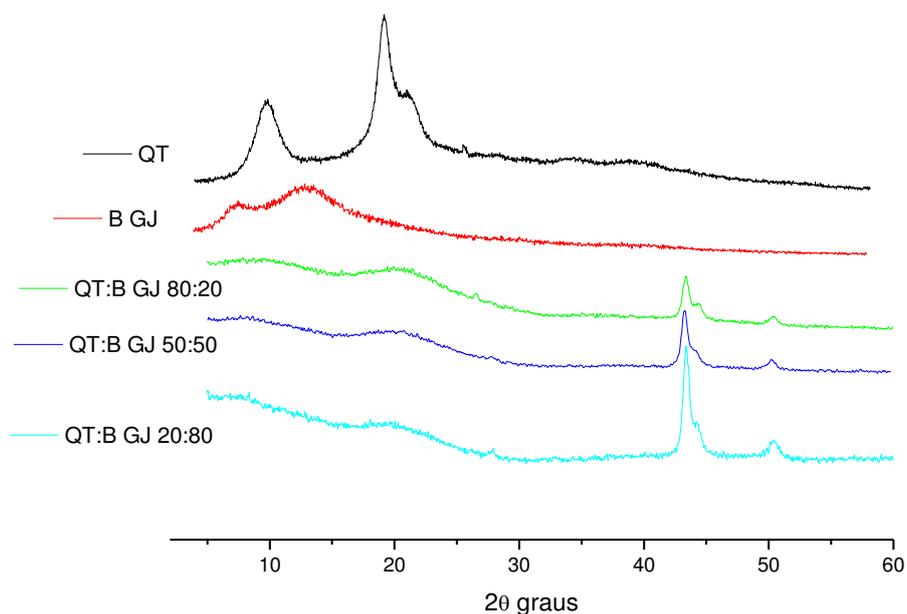
Tonhi e Plepis (2002) mostraram o comportamento da viscosidade específica de soluções de colágeno, quitosana (GD 76 %) e de blendas entre ambos, em função da temperatura. Embora os valores das viscosidades das blendas tenham sido intermediários dos polímeros puros, os autores observaram que soluções de colágenos foram mais viscosas que as respectivas de quitosana.

Sionkowska *et al.* (2004) estudaram a viscosidade *intrínseca* do colágeno proveniente de tendões de ratos e quitosana comercial, bem como de misturas dos dois biopolímeros. Embora não detalhem cálculo, observaram que para esta viscosidade, as blendas exibiram valores ligeiramente mais elevados que para o colágeno e a quitosana individuais. O resultado foi interpretado considerando, apesar da miscibilidade dos polímeros, a existência de um sistema trifásico, com uma fase no estado gelatinoso e que daria este aumento à viscosidade.

#### 5.5.4 Difractometria de Raios-X - DRX

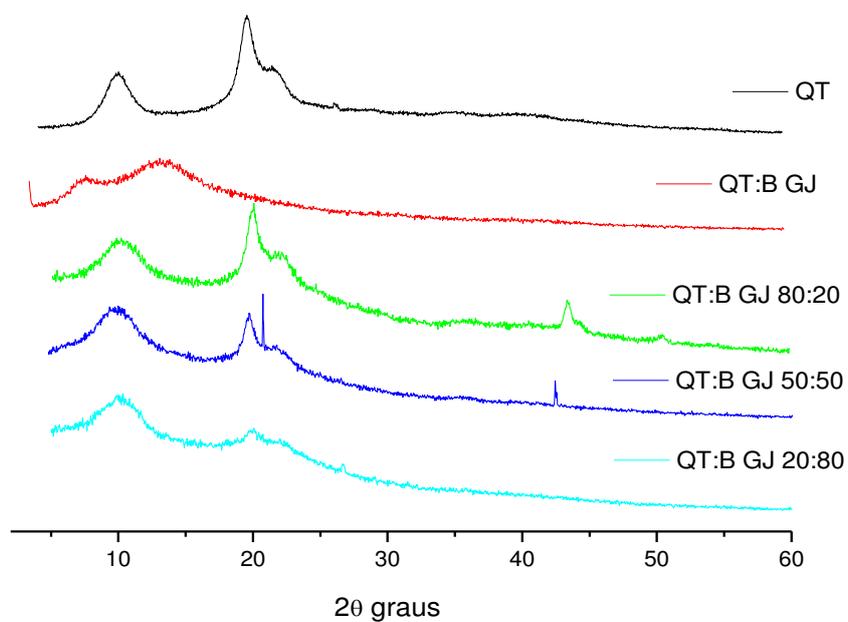
Os difratogramas dos polímeros puros e das blendas QT:COL estão apresentados nas Figuras 44-47.

**Figura 44** - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por liofilização.



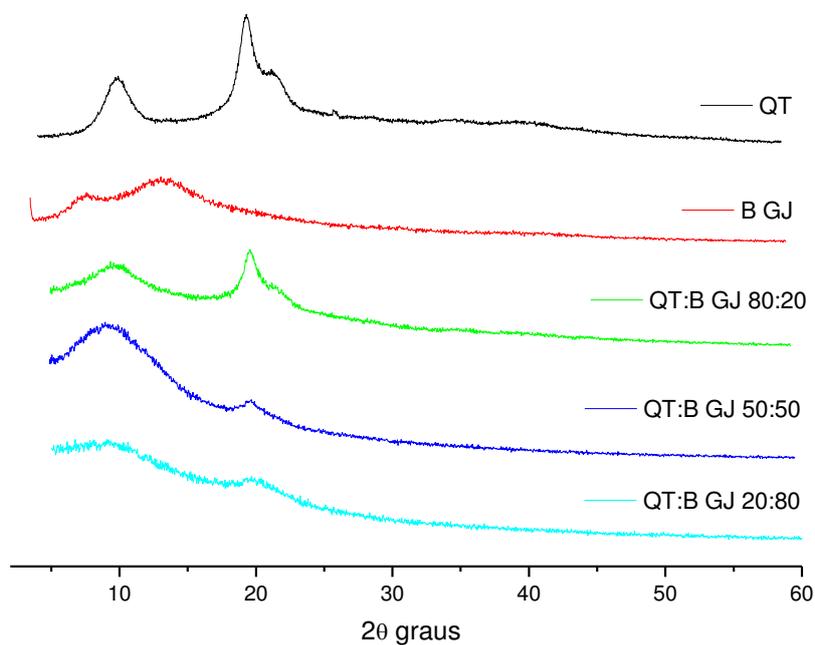
Fonte: Próprio autor.

**Figura 45** - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaOH/NaCl.



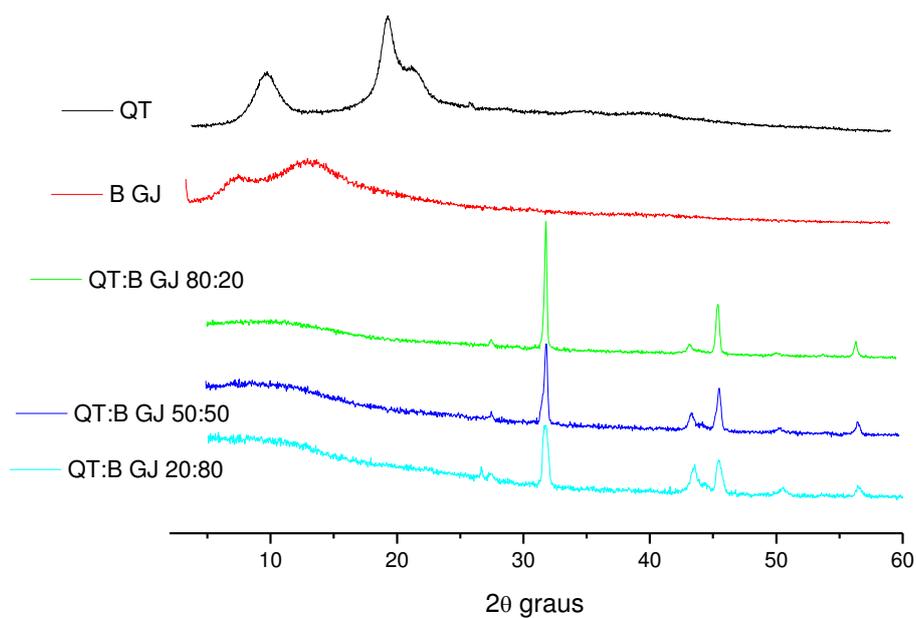
Fonte: Próprio autor.

**Figura 46** - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaOH.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 47** - Difratoograma da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) preparadas por precipitação com NaCl.



Fonte: Próprio autor.

Como verificado anteriormente, a amostra de quitosana apresentou dois picos em  $2\theta = 10^\circ$  e  $20^\circ$ , confirmando, assim, a presença de domínios cristalinos na sua estrutura (020 e 110, respectivamente), enquanto que o colágeno se mostrou mais amorfo (CHEN et al., 2008).

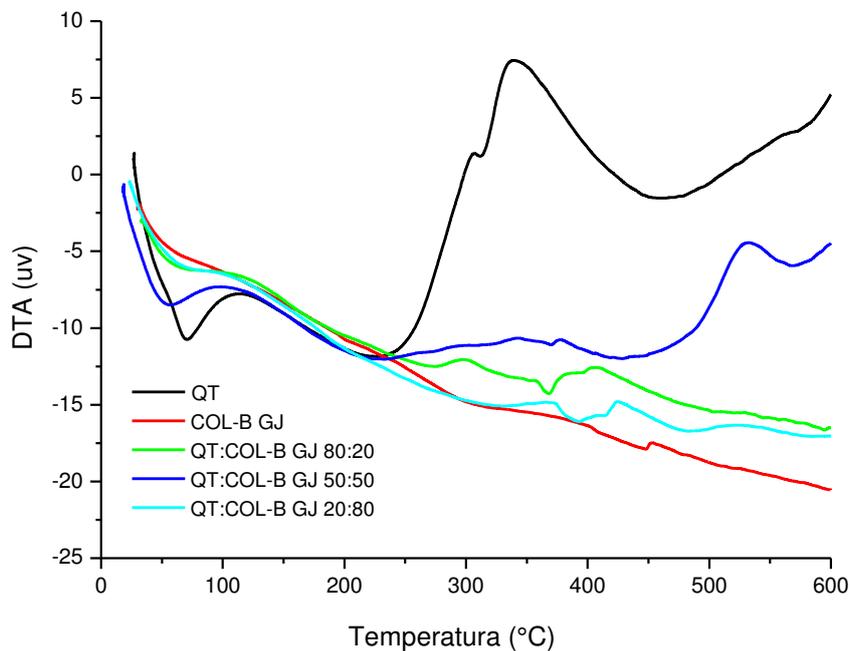
Em linhas gerais, as blendas produzidas apresentaram-se com características intermediárias dos precursores. À medida que o teor de quitosana aumentou, as respectivas reflexões passaram a ser mais perceptíveis. Este padrão pode ser melhor apreciado nas blendas obtidas por precipitação mista e alcalina (CHEN et al., 2008). Pereda et al. (2011) atribuíram a menor cristalinidade das blendas em relação aos precursores, notadamente a quitosana, a fortes interações com o colágeno, as quais destruíam o empacotamento da quitosana. Observação semelhante foi relatada por Sionkowska et al. (2004), ao observar a atenuação dos sinais dos precursores, nas blendas. Abugoch et al. (2011) referiram-se a este fato, bem como ao alargamento das bandas nas blendas em relações aos precursores puros, como indicativo da compatibilidade entre os biopolímeros, com a consequente interação entre eles.

Exceto para as precipitações alcalinas, os demais meios produziram reflexões típicas de sais, provavelmente  $\text{CH}_3\text{COONa}$  para as amostras liofilizadas e  $\text{NaCl}$  para as demais.

### 5.5.5 Análise Térmica Diferencial – DTA

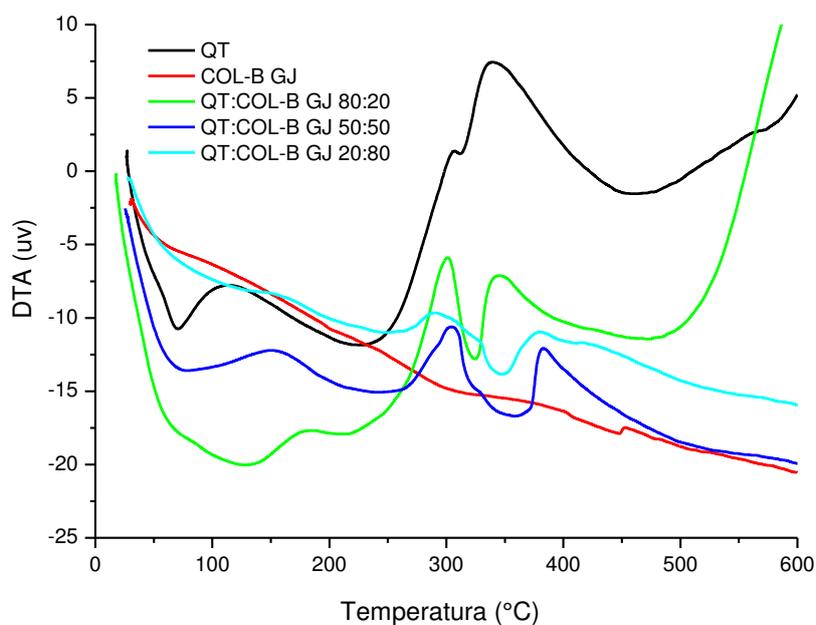
Nas Figuras 48-51 apresentam-se as curvas de análise térmica diferencial (DTA) das blendas a partir de quitosana e colágeno da bexiga da Gurijuba em diferentes proporções (80:20; 50:50; 20:80) obtidos por liofilização e precipitação com  $\text{NaOH}/\text{NaCl}$ ;  $\text{NaOH}$  e  $\text{NaCl}$ .

**Figura 48** - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por liofilização.



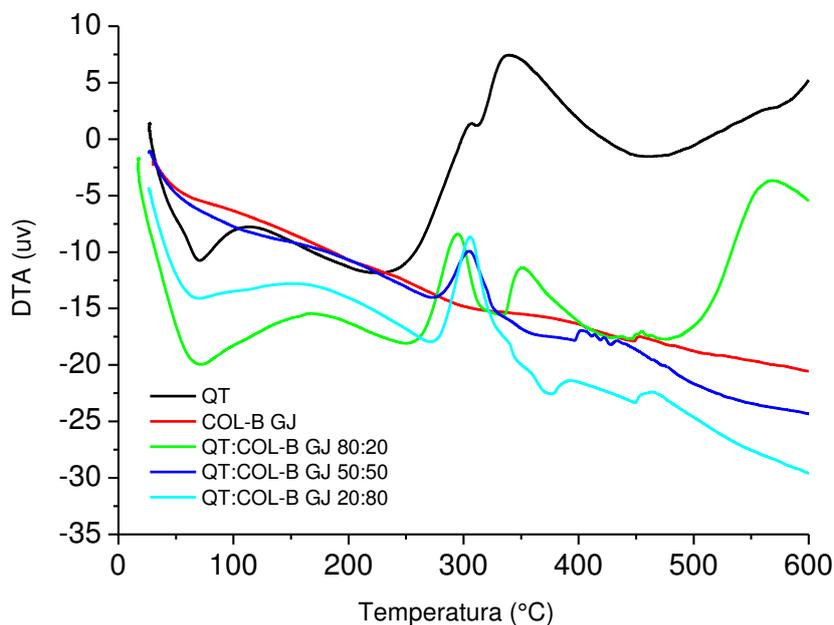
Fonte: Próprio autor.

**Figura 49** - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaOH/NaCl.



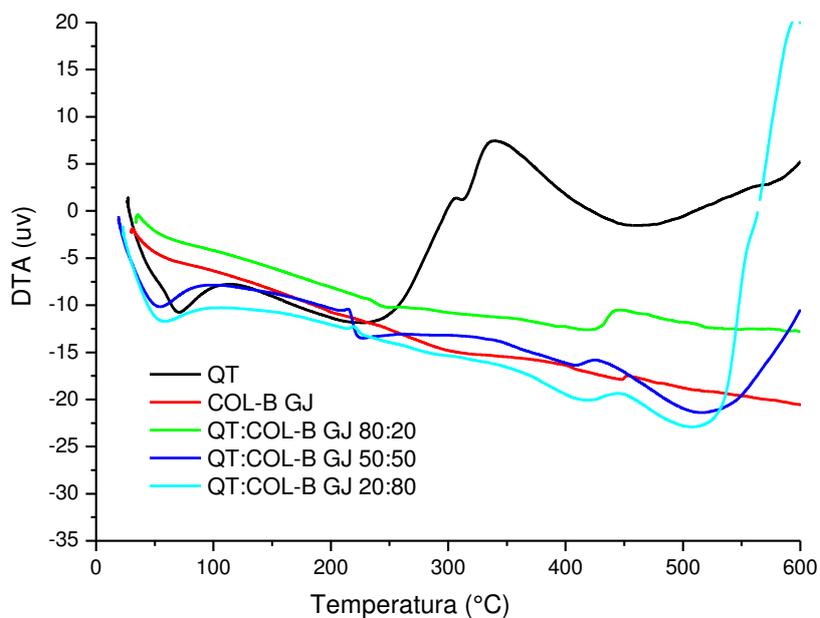
Fonte: Próprio autor.

**Figura 50** - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaOH.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 51** - Curva de DTA da quitosana, do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (80:20, 50:50 e 20:80) obtidas por precipitação com NaCl.



Fonte: Próprio autor.

As características dos componentes individuais também se apresentaram nos resultados de DTA para as blendas. Sionkowska (2003) observou comportamento semelhante nas curvas de DSC para o colágeno e blenda.

Em acordo com os resultados de DTA, praticamente todas as amostras apresentaram um processo endotérmico, por volta de 50 a 100 °C, e que pode ser atribuído a desidratação dos materiais.

As interações entre os biopolímeros nas blendas podem ser responsáveis pela relativa variação no perfil dos termogramas, relatando diferentes estabilidades térmicas em relação aos precursores. Neste caso, a rota de preparação teve efeito sobre a estabilidade térmica do material. Como exemplo citamos a blenda 50:50. O material liofilizado apresentou um pico exotérmico na temperatura de 525 °C. Entretanto, para a blenda respectiva obtida por precipitação com NaOH/NaCl, a degradação aconteceu a menor faixa de temperatura, a 300 °C e 390 °C. As demais precipitações também apresentaram diferenças quanto a estabilidade do material, sendo que o liofilizado e o precipitado com NaCl parecem conduzir a formação de blendas termicamente mais estáveis. Esta estabilidade pode estar associada a formação de um complexo polication-poliânion, envolvendo grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana, com grupos  $\text{COO}^-$  do colágeno (LIMA *et al.*, 2006).

### 5.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das blendas preparadas pelas diversas rotas com o colágeno B-GJ estão ilustradas nas Figuras 52-55. Para facilitar a comparação, novamente os resultados obtidos para os polímeros precursores foram acrescentados às Figuras.

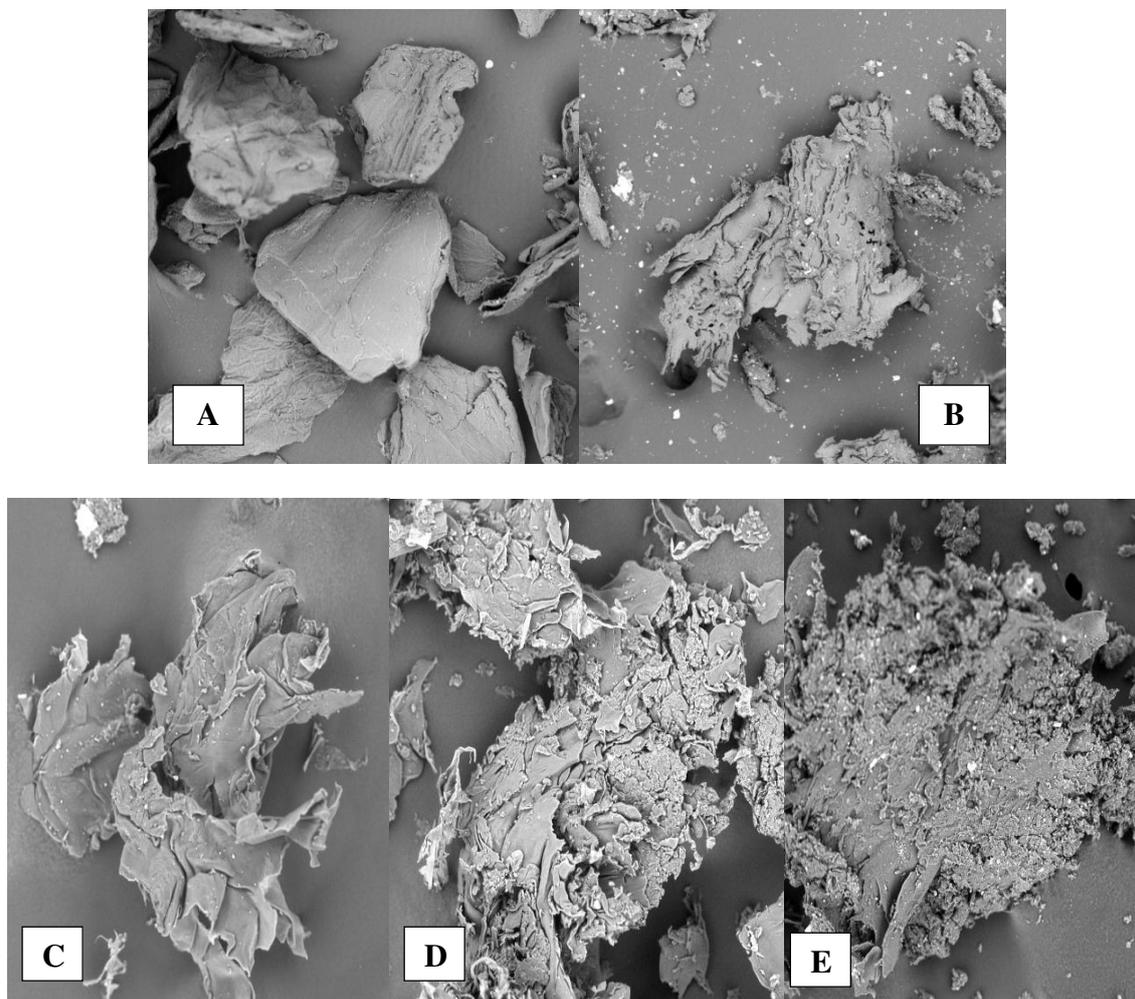
A morfologia dos materiais é aspecto importante para o entendimento de suas propriedades e aplicações e atesta peculiaridades da sua forma de preparo. Em alguns casos permite também uma avaliação da composição do material, a identificação de fases, etc. O estudo da interação entre dois polímeros em uma mistura se torna necessário, pois pode afetar as características morfológicas do material formado e de forma indireta outras propriedades.

Por exemplo, as técnicas anteriores, e de um modo geral, as imagens das blendas apresentaram aspectos intermediários entre os precursores. Perceberam-se perfis entre as formas mais lisa, homogênea e foliar observadas para a quitosana, e mais rugosa e irregular do colágeno.

Ainda que haja uma dificuldade de comparação mais direta com dados da literatura, principalmente porque a maioria dos trabalhos preparou blendas na forma de filmes, fibras e membranas, foi possível observar que outros pesquisadores também observaram esta relação entre blendas e precursores. Wang e Stegemann (2011), por exemplo, caracterizaram hidrogéis de quitosana/colágeno reticulado com glicol. Relataram variações na estrutura rugosa e fibrilar das blendas em função dos teores dos polímeros, diminuindo estas características com o aumento do teor da quitosana. Sionkowska (2003), na tentativa de explicar o fato, e percebendo o aumento da rugosidade com o teor de colágeno, propôs que os componentes deste polímero se concentrassem na superfície da blenda. Lin *et al.* (2009) sintetizaram e caracterizaram esponjas compostas de colágeno/hialuronano/quitosana e observaram que a porosidade nas blendas diminuía na medida em que a proporção de quitosana aumentava.

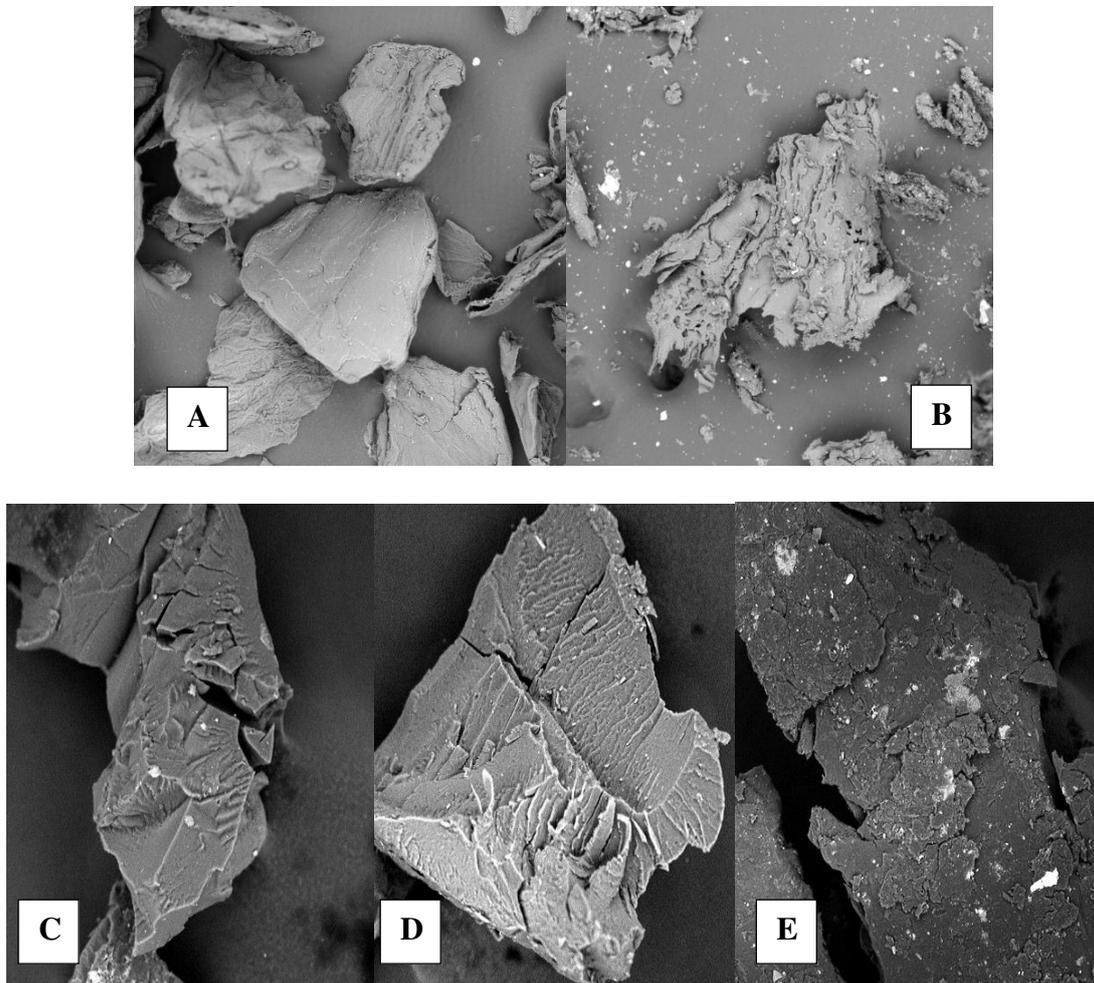
É generalidade, portanto, que tais blendas reflitam a origem dos materiais precursores e as suas proporções, sugerindo interações entre as partes. Em nossos resultados foi possível também a observação de uma fase esbranquiçada sobre os materiais. Trata-se, provavelmente, do sal observado em alguns difratogramas. Em termos de procedimento de síntese, alerta para cuidados maiores com a lavagem e controles de pH e presença de íons no meio.

**Figura 52** - Micrografias da (A) quitosana, (B) do colágeno B-GJ e das blends QT:B-GJ (C) 80:20, (D) 50:50 e (E) 20:80, obtidas por liofilização. Aumento de 400x



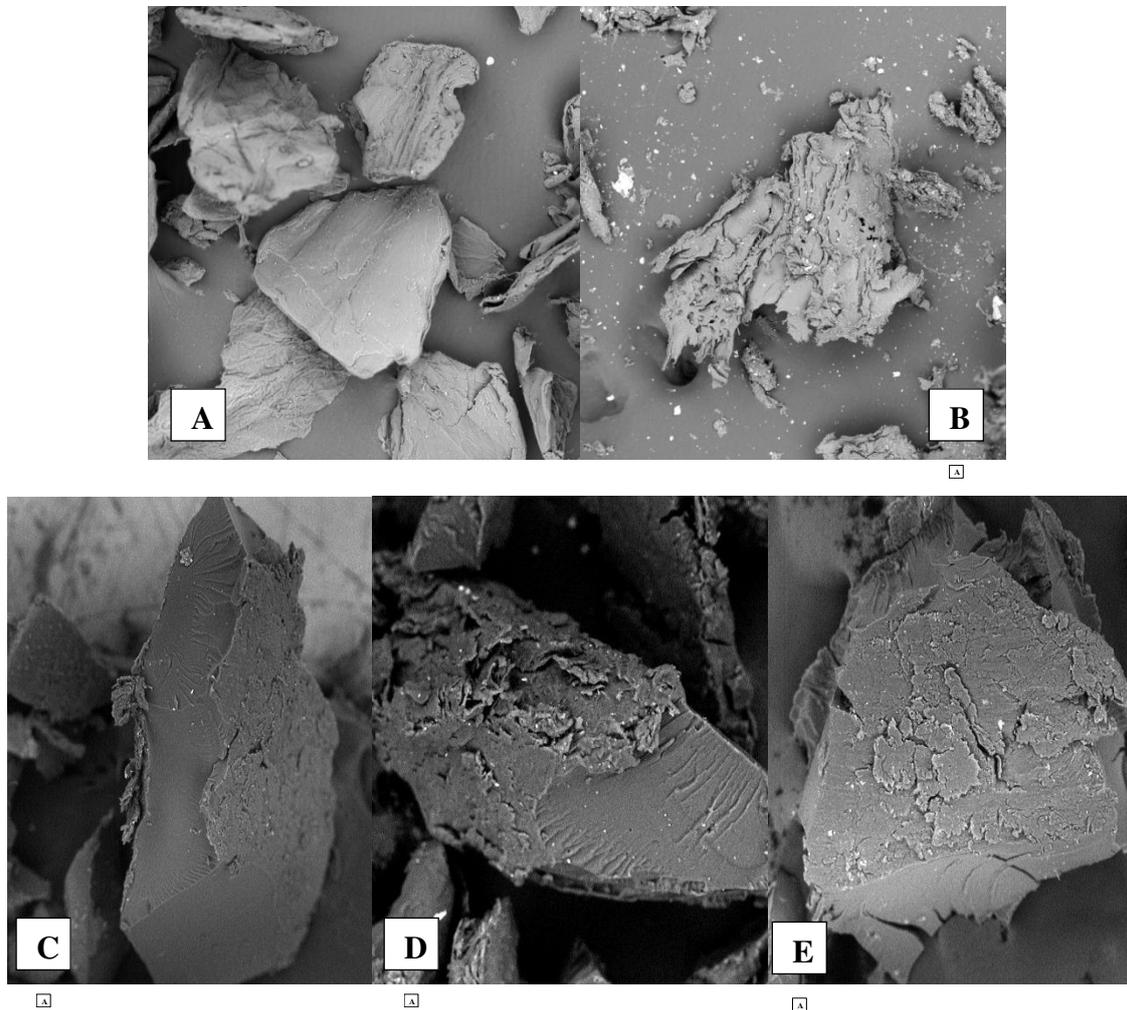
**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 53** - Micrografias da (A) quitosana, (B) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (C) 80:20, (D) 50:50 e (E) 20:80, obtidas por precipitação com NaOH/NaCl. Aumento de 400x



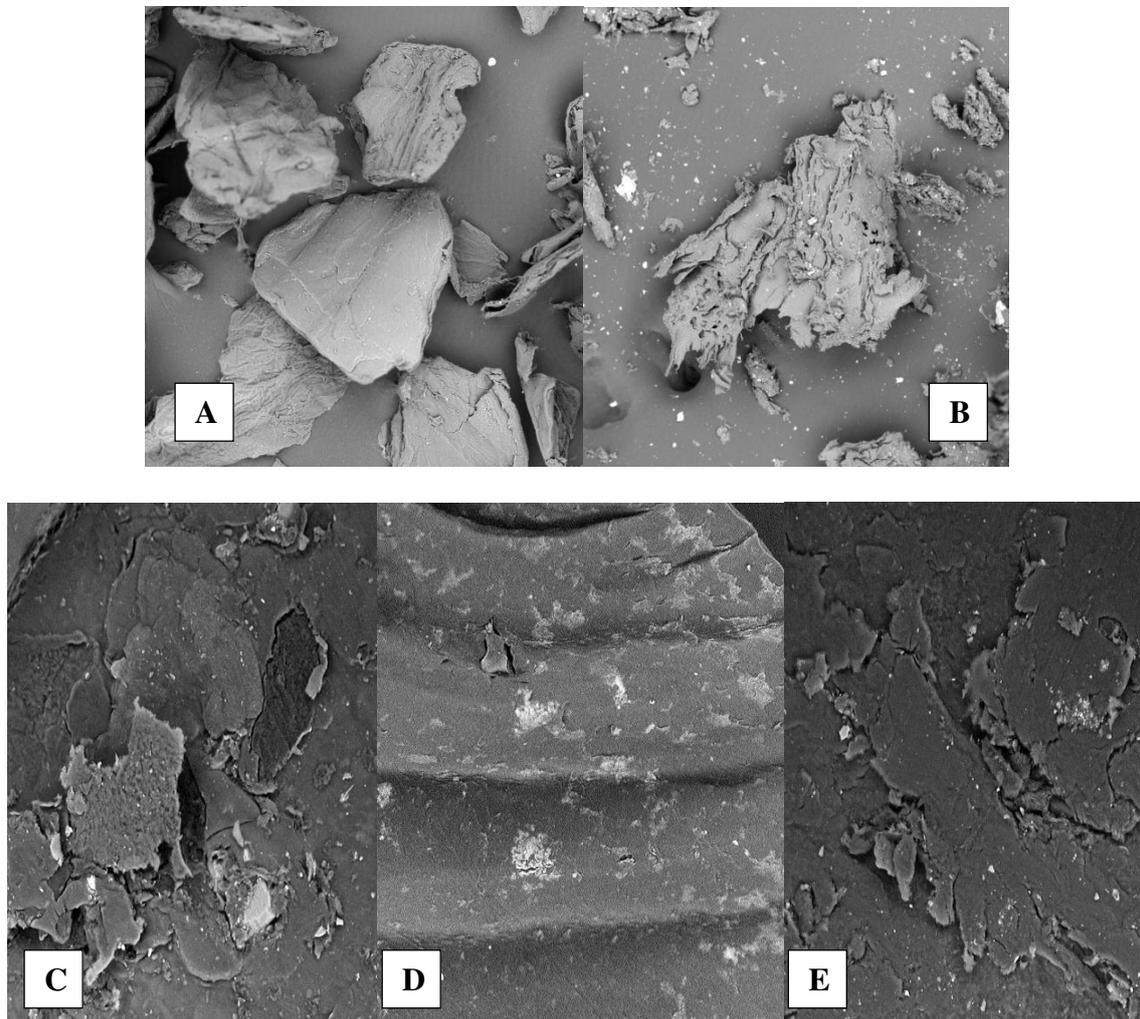
Fonte: Próprio autor.

**Figura 54** - Micrografias da (A) quitosana, (B) do colágeno B-GJ e das blends QT:B-GJ (C) 80:20, (D) 50:50 e (E) 20:80, obtidas por precipitação com NaOH. Aumento de 400x



Fonte: Próprio autor.

**Figura 55** - Micrografias da (A) quitosana, (B) do colágeno B-GJ e das blendas QT:B-GJ (C) 80:20, (D) 50:50 e (E) 20:80, obtidas por precipitação com NaCl. Aumento de 1000x



**Fonte:** Próprio autor.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- As fontes investigadas de colágeno, bexigas natatórias e peles, são indistintas com relação a formação de blendas com a quitosana;
- As novas rotas de preparação de blendas conduzem a rendimentos compatíveis com o procedimento de liofilização;
- Que as blendas obtidas, por todas as rotas, segundo espectros de FTIR, apresentaram bandas características dos dois biopolímeros e evidências de interações entre ambos;
- Que as demais técnicas (teores de 4-Hy, viscosimetria, DRX, DTA, MEV) corroboraram com as observações do FTIR e da literatura de que as rotas aqui desenvolvidas conduziram a formação de blendas em que os biopolímeros estão presentes e são miscíveis.

Estas considerações acima são importantes por vários aspectos. Enquanto a bexiga natatória de alguns peixes são alvo de exploração comercial, pirataria, etc, as peles são comumente desprezadas e descartadas. Embora não se tenha caracterizado exatamente os tipos de colágenos existentes em ambas as amostras, o trabalho evidencia que podem ser empregadas indistintamente enquanto matérias primas para a produção destas blendas.

As rotas idealizadas conduziram todas, em maior ou menor extensão, a formação de biomateriais entre quitosana e colágeno. Mesmo em procedimentos que priorizavam a precipitação de um deles, o outro se fez presente, sugerindo interações entre ambos e a formação das blendas, conforme os ensaios de caracterização. Além de ressaltar a interação entre os biopolímeros, o que interessante do ponto de vista acadêmico, resultado mostra alternativas de produção destes biomateriais por meios mais acessíveis, viáveis, empregando procedimentos de fácil execução e baixo custo operacional.

### 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a possibilidade de aplicação de biomateriais na área biomédica Este trabalho nos permitiu sugerir algumas aplicações para os novos biomateriais obtidos, a fim de verificar a eficiência das rotas de preparação propostas.

Dentre eles, citamos:

- Testes microbiológicos para verificar a capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e/ou Gram-positivas;
- Estudos biológicos *in vitro*, utilizando cultura de células para verificar a citotoxicidade e biocompatibilidade do material;
- Testes *in vivo* para avaliação da atividade cicatrizante de lesões na derme.

## REFERÊNCIAS

- AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 144-153, 2008.
- ALMEIDA, Z. S. *et al.* Avaliação do potencial de produção pesqueira do sistema da pescada-amarela (*Cynoscion acoupa*) capturada pela frota comercial do Araçagi, Raposa, Maranhão. *Boletim do Laboratório de Hidrologia*, v. 24, n. 2, p. 35-42, 2011.
- ALSARRA, I. A. *et al.* Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*, v.23, p.3637-3644, 2002.
- ANGELINI, A. P. R. *Quantificação do colágeno, da composição centesimal e estudo do balanço de massa dos nutrientes declarados, na avaliação da qualidade de salsichas.* 92f. Dissertação (Magister Scientiae) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos, Belo Horizonte, 2011.
- ASHOKKUMAR, M. *et al.* Collagen–chitosan biocomposites produced using nanocarbons derived from goatskin waste. *Carbon*, v. 50, n. 15, p. 5574-5582, 2012.
- BRANGEL, L. M. *Desenvolvimento de hidrogéis a base de quitosana e ácido lactobiônico com adição de nanoelementos.* 46f. Conclusão de curso (Química Industrial) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- BRITTO, D.; CAMPANA FILHO, S. P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochimica Acta*, v. 465, 1-2, p. 73-82, 2007.
- BRODOWSKI, G. *et al.* Synthesis and intrinsic viscosity in saltfree solution of a stiff-chain cationic poly (p-phenylene) polyelectrolyte. *Macromolecules*, v. 29, p. 6962 – 6965, 1996.
- CAETANO JÚNIOR, P. C.; LOBO, A. O. *Quitosana como biomaterial: revisão de literatura.* Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brasil. Encontro Latino Americano.
- CHAVES, J. A. P. *et al.* Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. *Cadernos de Pesquisa*, v.16, n. 2, p.36-43, 2009.
- CHEN, X-G. *et al.* Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Journal of Biomechanical Engineering*, v. 27, p. 269-274, 2006.
- CHEN, Z. *et al.* Intermolecular interactions in electrospun collagen chitosan complex nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, v.72, n. 3, p.410-418, 2008.

- CHEN, Z. G. *et al.* Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 2, p. 372-382, 2010.
- CHEN, Z. *et al.* Electrospinning of collagen–chitosan complex. *Materials Letters*, v. 61, p. 3490-3494, 2007.
- CHIRITA, M. Mechanical properties of collagen biomimetic films formed in the presence of calcium, silica and chitosan. *Journal of Bionic Engineering*, v. 5, n. 2, p. 149-158, 2008.
- CLAUZET, M.; RAMIRES, M. *Pesca artesanal e conhecimento local de duas populações caiçaras (enseadas do Mar Virado e Barra do Una) no litoral de São Paulo, Brasil*. W. Multiciência: A linguagem da Ciência, 4 de Maio, 2005.
- COSTA, O. M.; SADER, M. S.; SOARES, G. A. *Produção e caracterização de membranas de colágeno-quitosana para aplicações biomédicas*. Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), Brasil. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 22 a 25 de agosto de 2012, Natal-RN, 2012.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.
- CROSS, H. R.; CARPENTER, Z. L.; SMITH, G. C. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle, tenderness. *Journal of Food Science*, v. 38, p. 998-1003, 1973.
- CUCOS, A.; BUDRUGEAC, P. Simultaneous TG/DTG-DSC-FTIR characterization of collagen in inert and oxidative atmospheres. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 2079-2087, 2014.
- DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, de A. *et al.* Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.
- DASH, M. *et al.* Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.
- DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. *Princípios e Aplicações de Análises Térmicas*. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2012.
- DING, C. M. *et al.* Perfusion seeding of collagen–chitosan sponges for dermal tissue engineering. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 287-296, 2008.
- DOMENEK, S. *et al.* Influence of concentration and ionic strength on the adsorption kinetics of gelatin at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, p. 48-55, 2008.

- FAIKRUA, A. *et al.* Properties of  $\beta$ -glycerol phosphate/collagen/chitosan blend scaffolds for application in skin tissue engineering. *Science Asia*, v. 35, p. 247–254, 2009.
- FAUSTO, D. A. *Contribuição do tecido conjuntivo intramuscular na textura da carne de fêmeas zebuínas adultas submetidas a diferentes sistemas de manejo*. 94f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- FERNANDES, R. M. T. *et al.* Collagen films from swim bladders: Preparation method and properties. *Colloids and Surfaces B.: Biointerfaces*, v. 15, p. 17-21, 2008.
- FERREIRA, A. M. *et al.* Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*, v. 8, n. 9, p. 3191-3200. 2012.
- GALO, L. A. *Aminoácidos e proteínas*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ, Universidade de São Paulo.
- GOISSIS, A. P. A. *Análise estrutural do colágeno tipo 1: Correlação, estrutura e atividade biológica*. 98f. Dissertação de Mestrado (Bioengenharia) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- GOISSIS, G.; GÓES, J. C. Géis de colágeno aniônico: Ransana como biomateriais. Preparação e caracterização físico-química. *Polímeros*, v. 7, n. 3, 1997.
- GUPTA, K. C.; JABRIAL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 43-54, 2006.
- HORN, M. M. *Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico*. 73f. Dissertação de Mestrado (Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. de G. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. *Polímeros*, v. 20, n. 3, p. 201-204, 2010.
- HORN, M. M.; MARTINS, V. C.S.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.
- HUSZAR, G.; MAIOCCO, J.; NAFTOLIN, F. Monitoring of Collagen and Collagen Fragments in Chromatography of Protein Mixtures. *Analytical Biochemistry*, v. 105, n. 1, p. 424-429, 1980.
- JANEGITZ, B. C. *et al.* Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 879- 884, 2007.

- JEEVITHAN, E. *et al.* Type II collagen and gelatin from silvertip shark (*Carchartinus albimarginatus*) cartilage: isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties. *Marine Drugs*, v. 12, p. 3852-3873, 2014.
- JIANKANG, H. *et al.* Fabrication and characterization of chitosan/gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures. *Polymers*, v. 48, n. 15, p. 4578-4588, 2007.
- KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SHARIDI, F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Food Science and Technology*, v. 43, p. 792-800, 2010.
- KLIMENT, C. R.; ENGLERT, J. M.; CRUM, L.P.; OURY, T. D. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. *Internacional Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 30, p. 349-355, 2011.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LI, Y. *et al.* Viscosity of Collagen Solutions: Influence of Concentration, Temperature, Adsorption, and Role of Intermolecular Interactions. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, v. 53, p.893-901, 2014.
- LIMA, C. G. A.; DE OLIVEIRA, R. S.; FIGUEIRO, S. D. *et al.* DC conductivity and dielectric permittivity of collagen–chitosan films. *Materials Chemistry and Physics*, v.99, n. 2-3, p. 284–288, 2006.
- LIMA, I. S.; AIROLDI, C. A thermodynamic investigation on chitosan-divalent cation interactions. *Thermochimica Acta*, v. 421, n. 2, p. 133-139, 2004.
- LIMA, M. S P. *Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico)*. 89f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- LIN, Y; TAN, F. J.; MARRA, K. G. *et al.* Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. *Acta Biomaterials*. v. 5, n. 7, p. 2591–2600, 2009.
- LIU, M.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y. *et al.* Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocolloids*, v. 33, n. 2, p. 186–191, 2013.
- LOCILENTO, D. A. *Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva*. 94f. Dissertação de Mestrado (Bioengenharia) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LOPES, I. S.; FERREIRA, E. M.; PEREIRA, D. M. *et al.* Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade de gelo utilizado na sua conservação. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 4, p. 677-684, 2012.

MACIEL, P. M. C. *Preparação da mistura cumbaru-PVP-colágeno e caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido*. 104f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) - Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MARK, J. E. *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press, Inc. 1999.

Montoya, M. H. *et al.* Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4212-4219, 2010.

MOREIRA, C. D F. *Avaliação da adição de colágeno tipo I e nanopartículas de vidro bioativo a hidrogéis termossensíveis de quitosana para uso na engenharia de tecido*. 75f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia dos Materiais) - Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MOURÃO, K. R. M.; FRÉDOU, F. L.; ESPÍRITO-SANTO, R. V. Sistema de produção pesqueira Pescada Amarela – *Cynoscion acoupa* Lacèpede (1802): um estudo de caso no litoral nordeste do Pará-Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 3, p. 497-511, 2009.

MOURÃO, K. R. M. *et al.* Sistema de Produção Pesqueira Pescada Amarela – Pará-Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 3, p. 497-511, 2011.

NERY, J. C. *Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas*. 79f. Dissertação (Mestrado) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de pós-graduação em engenharia de materiais, Belo Horizonte, 2014.

NEUMAN, R. E.; LOGAN, M. A. The determination of hydroxyproline. *Journal of Biological Chemistry*, v. 184, 299-306, 1950.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterisation of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 10, p. 3737-3742, 2010.

PEDROSO, M. G. V. *Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA*. 70f. Dissertação de Mestrado (Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E. *et al.* Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.

- PEREIRA, T. M. M. *Caracterização térmica TG/DTG, DTA, DSC-fotovisual de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)*. 104f. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- PORTO, L. C. *Filmes formados por gelatina e poli (acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água*. 81f. Dissertação de Mestrado (mestre em Química) – Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Carneos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 65-74, 2013.
- PRESTES, R. C. *et al.* Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*, v.15, n.4, p.375-382, 2013.
- RAFAT, M.; LI, F.; FAGERHOLM, P. *et al.* PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen–chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, n. 29, p. 3960-3972, 2008.
- RAMACHANDRAN, G. N. *et al.* A hypothesis on the role of hydroxyproline in stabilizing collagen structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 3, p. 166-171, 1973.
- RAMASAMY, P e SHANMUGAM, A. Characterization and wound healing property of collagen–chitosanfilm from *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 93-102, 2015.
- RAO, V. R. S.; VENKAPPAYYA, D.; ARAVAMUDAN, G. Stability characteristics of aqueous chloramine-T solutions. *Talanta*, v. 17, p. 770-772, 1970.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603–632, 2006.
- ROBERTS, A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscosimetric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 4, p. 374-377, 1982.
- SAMOUILLAN, V.; DELAUNAY, F.; DANDURAND, J. *et al.* The use of thermal technique for the characterization and selection of natural biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 2, p. 230-248, 2011.
- SANTOS, A. P. B. *Índices químicos, sensoriais e microbiológicos para avaliação do frescor da Pescada Amarela (Cynoscion acoupa) armazenada em gelo*. Dissertação (Mestre em Ciências, em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R. *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

- SANTOS, C. D. S. Mineralização biomimética de hidrogéis quitosana/gelatina. Dissertação (Mestre em Ciências, área de concentração-Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- SANTOS, R. B.; CARVALHO NETA, R. N. F.; ALMEIDA, Z. F. Características da Pesca Artesanal em três comunidades da Ilha de São Luís, Maranhão. *Boletim do Laboratório de Hidrologia, Universidade Federal do Maranhão – UFMA*, p. 55-65, 2003.
- SENA, L. A. Produção e caracterização de blendas hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas. 95f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências) - Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE, Rio de Janeiro, 2004.
- SHANMUGASUNDARAM, N. *et al.* Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, v. 22, 1943-1951, 2001.
- SHI, C.; ZHU, Y.; RAN, X. *et al.* Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*, v. 15, n. 133, p. 185–192, 2006.
- SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemical*, v. 78, p. 929-958, 2009,
- SILVA, E. E.; COLLETA, H. H. M. D.; FERLAUTO, A. S. *et al.* Nanostructured 3-D Collagen/ Nanotube Biocomposites for Future Bone Regeneration Scaffolds. *Nano Research*, v. 2, p. 462-473, 2009.
- SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.
- SINGH, P.; BENJAKUL, S.; MAQSOOD, S. *et al.* Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, v. 124, n.1, p. 97-105, 2011.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, G. F. *et al.* Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, n. 12, p. 3026-3032, 2006.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J. *et al.* Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*. v. 25, n.5, p. 795,801, 2004.
- SONG, Y. B. *et al.* Solution properties of the acrylamide modified cellulose polyelectrolytes in aqueous solutions. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 1332-1339, 2009.

- SOUSA, M. A. *Colágenos de Cynoscion Acoupa (Pescada Amarela): identificação, produção de membranas e estudo da atividade biológica*. 20f. Monografia, Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2008.
- SOUZA, G. R.; BEZERRA, R. S. *Extração de colágeno a partir de resíduos do processamento do peixe bijupirá (Rachycentron canadum)*. CONIC, 2010.
- SOUZA, I. C. L. *Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas*. 106f. Dissertação de Mestrado (Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.
- STEGEMANN, H.; STALDLER, K. Determination of Hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta*, v. 18, n.2, p. 267-273, 1967.
- STOCCO, L.; STOLBERG, J. Avaliação da qualidade de linguças frescas mediante determinação de hidroxiprolina. *B. CEPPA*, v. 26, n. 1, p. 87-92, 2008.
- TANGSADTHAKUN, C. *et al.* Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, v. 16, n. 1, p. 37-44, 2006.
- TARAVEL, M. N.; DOMARD, A. Relation between the physicochemical chactestics of collagen and its interactions with chitosan: I. *Biomaterials*, v. 14, n. 12, p. 930-938, 1993.
- THACHARODI, D.; RAO, K. P. Collagen–chitosan composite membranes for controlled release of propranolol hydrochloride. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 120, n. 1, p. 115-118, 1995.
- TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
- TORRE, J. C. M. D.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, p. 35-42, 2004.
- VAZ, K. *Decifrando Biologia*. 2013. Disponível na página: <http://kellybiologia.blogspot.com.br/2013/03/caracteristicas-dos-seresvivos.html>. Acesso 20 de maio de 2015.
- VORON'KO, N. G. *et al.* Formation of k-carrageenan–gelatin polyelectrolyte complexes studied by <sup>1</sup>HNMR, UV spectroscopy and kinematic viscosity measurements. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 1152-1161, 2016.
- WANG, L.; STEGEMANN, J. P. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β-glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 14, p. 3976-3985, 2010.

WANG, L.; STEGEMANN, J. P. Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration. *Acta Biomaterials*, v. 7, n. 6, p. 2410-2417, 2011.

WANG, X. H. *et al.* Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, v. 24, n. 19, p. 3213-3220, 2003.

WESKA, R. F. *et al.* Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 749-753, 2007.

YE, Y. *et al.* Miscibility studies on the blends of collagen/chitosan by dilute solution viscometry. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 2066-2071, 2007.