

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS DE
COLÁGENO E GELATINA COM ADIÇÃO DE RESINA DE
JATOBÁ**

Daniel Luis do Nascimento

São Carlos, 2016

Daniel Luis do Nascimento

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS DE COLÁGENO
E GELATINA COM ADIÇÃO DE RESINA DE JATOBÁ**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Química como requisito para obtenção do grau de bacharel em química.

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

São Carlos, 2016

Dedicatória

Dedico esta monografia ao meu querido avô Luiz Recchia que sempre foi meu amigo e voz da experiência e que nunca media esforços para me dar o suporte necessário para que eu pudesse chegar a este momento. Tenho certeza de que ele estaria orgulhoso de mim e de todo seu trabalho ter sido recompensado.

Agradecimentos

À minha família pelo apoio e suporte que nunca me faltaram durante todos esses anos. Sem a ajuda e conselho deles minha caminhada até aqui não seria possível.

À minha orientadora Ana Maria de Guzzi Plepis primeiramente por me acolher em seu laboratório, mas também por ser uma pessoa tão boa de coração e uma fonte de inspiração para que eu possa um dia ser como ela.

Aos meus amigos de infância Caio, Rachid, Gabriel, Felipe e Kaisuky e também ultimamente ao grande amigo Guilherme por terem feito parte de minha vida até então, não somente passando bons momentos, mas também ajudando- me a me formar como indivíduo.

À sempre prestativa e energética Virgínia Martins pela sabedoria e paciência ao me ensinar diariamente todas as artimanhas de como é ser um químico responsável e pelos sábios conselhos nas horas em que eu necessitava.

Ao professor Sérgio Akinobu Yoshioka por todo positivismo e momentos de conversa sobre seus interessantes pensamentos a respeito de seus projetos.

À professora Eny Maria Vieira por ministrar minha primeira aula no instituto e por estar presente nesta última etapa de minha graduação.

A todos do laboratório 08 pelos momentos de companheirismo e descontração e pelas inúmeras xícaras de café oferecidas durante todos esses anos.

Ao Keith, Kyle, Massa, Koposto e Daniel Mindiola pela fonte inesgotável de sabedoria e amizade que eles representam a mim desde o dia em que comecei a trabalhar ao lado deles no laboratório na Filadélfia.

À minha companheira inseparável Ariane Sanchez por fazer parte desta conquista, sempre me acolhendo e apoiando em todos os momentos difíceis.

Aos professores, estudantes e funcionários que disponibilizaram seus espaços, equipamentos e materiais para que eu pudesse realizar esse trabalho. Estes são: Agnieszka Maule, Osvaldo Novaes, Aloísio Vulcani, Márcio de Paula e Débora Gonçalvez.

A todos os professores que estiveram presentes nesta minha jornada e que tentaram ao máximo passar um pouco de seus enormes conhecimentos.

Ao IQSC pela infraestrutura que tornou possível eu concluir meu curso com a certeza de que sou um químico completo.

Ao PIBIC/CNPq pelo auxílio financeiro e confiança em meu trabalho como químico.

A Deus por ter me colocado neste caminho tão bonito que é a química e tenho certeza de que vou poder contribuir muito para a humanidade através desta profissão maravilhosa.

Epígrafe

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

RESUMO

A pele, o maior órgão do corpo humano, é uma membrana fibroelástica que apresenta uma gama muito grande de funcionalidades indispensáveis para os seres vivos. Frente a seu papel essencial para a manutenção da vida, faz-se necessário o desenvolvimento de novos produtos capazes de regenerá-la de modo rápido e eficiente diante dos mais diversos tipos de ferimentos sofridos pela mesma. Tendo isto em vista, a engenharia de tecidos vem como uma área estratégica na confecção de novos métodos e produtos que visam a melhor forma de se desenvolver matrizes biocompatíveis para tal finalidade. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma membrana provinda da mistura de colágeno e gelatina, com a combinação de resina de jatobá em diferentes concentrações. O colágeno foi obtido por hidrólise alcalina de serosa porcina por 72h a 25°C, seguido da estabilização e extração em solução de ácido acético pH 3,5. O gel de gelatina foi preparado por dissolução de gelatina comercial (Sigma®, Tipo A) em água, sendo gelatinizada a 60 °C durante 30 min, seguido por resfriamento. As misturas foram caracterizadas por estudo reológico, e as membranas por espectroscopia no infravermelho (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica (TGA, DSC), ângulo de contato e absorção de água. A reologia revelou um aumento da viscosidade, mas mais ainda da elasticidade das misturas com o aumento da concentração da resina. O espectro FT-IR apresentou bandas que geralmente estão presentes em resinas naturais contendo terpenos e compostos ácidos. MEV mostrou que para as diferentes concentrações de resina, a membrana muda de uma superfície homogênea para rugosa e que tal rugosidade aumenta com o aumento de concentração de resina. As curvas DSC mostram que a estrutura do colágeno sofre alterações com a adição da resina havendo o aparecimento de uma transição de desnaturação em torno de 40°C. As curvas termogravimétricas mostraram que a adição da resina junto ao colágeno não altera a temperatura de decomposição, mas diminui a quantidade de água perdida no primeiro estágio (25-200°C). Em relação à absorção de água, observou-se que todas as amostras hidratou-se com menos de 1 minuto e que a presença da resina diminuiu a quantidade de água absorvida, como constatado também no experimento de ângulo de contato, que mostrou que elas são mais hidrofóbicas.

ABSTRACT

The skin is the biggest organ in human body and is a fibroelastic membrane which has a wide variety of indispensable functionalities for every human being. Giving its vital role of maintaining life, it is necessary the development of new products capable of repairing it in a quick and efficient way. With that in mind, tissue engineering shows up as a strategic area in the confection of new methods and products that aim a better approach for promoting biocompatible membranes for this purpose. This project had the objective of developing a new membrane derived from a mixture of collagen and gelatin with the addition of Jatobá resin in different concentrations. Collagen has been obtained by alkaline hydrolysis of porcine serosa (72h) at 25°C, followed up by stabilization and extraction in acetic acid solution pH 3.5. Gelatin gel has been prepared by dissolution of commercial gelatin (Sigma®, Tipo A) in water, being gelatinized at 60°C for 30 minutes followed by cooling. The mixtures were characterized by their rheological study, whereas membranes were characterized by infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis (TGA, DSC), contact angle, and water absorption. Rheological study revealed an elevation in viscosity and an even higher elevation in elasticity of mixtures as the resin concentration is increased. FT-IR spectrum showed peaks that are generally present in natural resins which contain terpenes and acid components. SEM images revealed that for different resin concentrations the membranes surface change from a homogenous characteristic to a rugose one and rugosity increases as the resin concentration goes up. The DSC curves exhibited that the collagen-gelatin structure goes through modification as resin is added because it displayed the increment of a new denaturation transition at 40°C in those cases. TG curves showed that the addition of resin in the mixture does not alter the decomposition temperature, but it decreases the amount of water lost in the first stage (25- 200 °C). Regarding the water absorption, it has been observed that all samples hydrated in less than a minute and that the presence of resin in the mixture contributed in a way that decreased the amount of water absorbed, as also observed at the contact angle experiment, which showed them as being more hydrofobic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele humana²	14
Figura 2 - Processo de formação das fibrilas de colágeno¹⁰	18
Figura 3- Fibras de colágeno de tecidos conectores compostos por unidades de fibrilas⁵	18
Figura 4- Extração de gelatina de tecidos contendo colágeno¹⁴	19
Figura 5 - Árvore e resina de Jatobá^{19, 20}	20
Figura 6 - Misturas de colágeno e gelatina CG11 (sem resina), CG11R48 (com resina de concentração 48 mg mL⁻¹) e CG11R96 (com resina de concentração 96 mg mL⁻¹)	28
Figura 7 - Coloração da solução de resina de Jatobá (RES)	28
Figura 08 - G' (sólido) e G'' (vazio) em função da % de deformação para (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.....	30
Figura 9 - Módulos G' (sólido) e G'' (vazio) em função da frequência angular para (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.	31
Figura 10 - Curvas de viscosidade complexa em função da frequência angular para as misturas: (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.	32
Figura 11 - G' (sólido) e G'' (vazio) em função da temperatura para (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.....	33
Figura 12 - Curvas de η^* vs. Temperatura para as misturas (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.	34
Figura 13 – Foto digital das membranas.....	35
Figura 14- Curvas TG para as várias amostras analisadas, sendo (—) CG11, (—) RES, (—) CG11R48, (—) CG11R96.	35
Figura 15 - Curvas DSC para (—) CG11, (—) CG11R48, (—) CG11R96.	37
Figura 16 - Fotomicrografias por MEV para: (A) CG11, (B) CG11R48 e (C) CG11R96. Aumento de 200x.	38
Figura 17 – Fotomicrografias por MEV para (B') CG11R48 e (C') CG11R96. Aumento de 20000x	39
Figura 18 - Espectro de absorção no IV para a resina de Jatobá (RES).	39
Figura 19 - Espectro de absorção no IV para a CG11.	40
Figura 20 - Espectros de absorção no IV de todas as amostras estudadas, sendo (—) RES, (—) CG11, (—) CG11R48, (—) CG11R96.	41
Figura 21 - Esquema do ângulo de contato de uma gota em uma superfície sólida³⁴.	42
Figura 22 - Imagens da gota na superfície das membranas, sendo: (A): CG11, (B): CG11R48 e (C): CG11R96.	43
Figura 23 - Fotos de membranas antes (A) e após (B) o intumescimento.	44
Figura 24 - Curvas de intumescimento para as membranas: (★) CG11; (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aminoácidos presentes na proteína de colágeno ⁵	17
Tabela 2 - Valores de G' e G'' para as misturas na frequência de 5,0 rad s ⁻¹	31
Tabela 3 - Porcentagem de perda de massa nas diferentes fases para cada uma das membranas e para a resina.....	36
Tabela 4 - Temperaturas de transições térmicas das amostras analisadas.....	37
Tabela 5 - Valores dos ângulos de contato e suas médias para as membranas.....	43
Tabela 6 - % de absorção para as membranas no tempo de 10 minutos.....	46

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

CG11 – Mistura de colágeno 1% e gelatina 1% (1:1).

RES – Solução de resina de Jatobá e etanol.

CG11R48 – Mistura de colágeno 1% e gelatina 1% (1:1) + 48 mg de resina de Jatobá.

CG11R96 – Mistura de colágeno 1% e gelatina 1% (1:1) + 96 mg de resina de Jatobá.

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho.

TG – Termogravimetria.

DSC – Calorimetria exploratória diferencial.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	11
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PELE.....	14
1.2 BIOMATERIAIS.....	15
1.3 COLÁGENO.....	16
1.4 GELATINA	18
1.5 RESINA DE JATOBÁ	20
2 OBJETIVOS.....	22
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.2 PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS.....	23
3.2.1. Obtenção do colágeno	23
3.2.2 Preparação do gel de gelatina 1%	24
3.2.3 Mistura de colágeno e gelatina 1% (CG11).....	24
3.2.4 Resina (RES)	24
3.2.5 Mistura de colágeno/gelatina/resina.....	24
3.3 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS	25
3.4 CARACTERIZAÇÃO	25
3.4.1 Estudo reológico	25
3.4.2 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR).....	25
3.4.3 Termogravimetria (TG).....	26
3.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	26
3.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
3.4.6 Ângulo de contato	26
3.4.7 Absorção de água.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS	28
4.1.1 Estudo reológico	29
4.1.1.1 Varredura de Deformação	29
4.1.1.2 Varredura de Frequência.....	30
4.1.1.3 Varredura de Temperatura	33
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	34

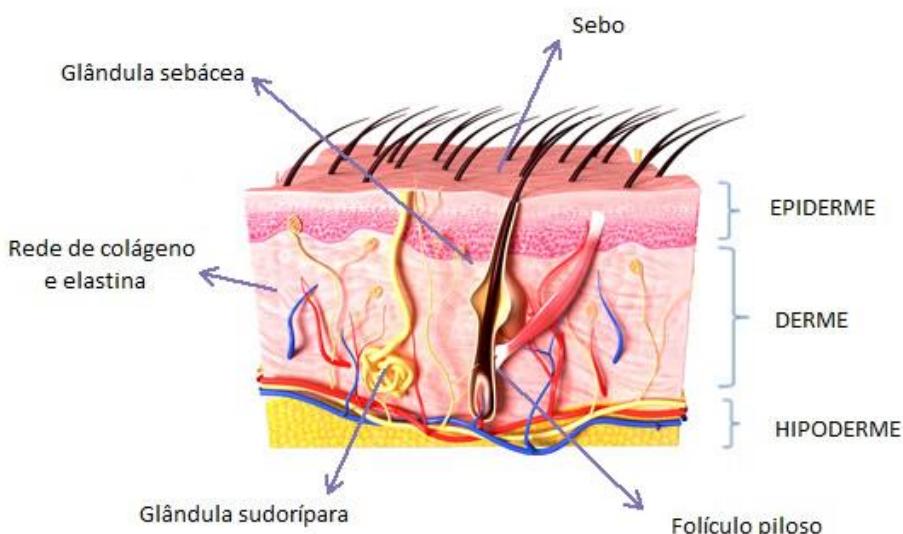
4.2.1 ANÁLISE TÉRMICA.....	35
4.2.1.1 Termogravimetria (TG)	35
4.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	37
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
4.2.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FITR).....	39
4.2.4 Ângulo de contato	42
4.2.5 Absorção de água.....	44
5 CONCLUSÕES.....	47
6 REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, constituindo aproximadamente 16% de seu peso total e apresentando em média $1,8\text{ m}^2$ de área. Ela apresenta diversas funções, sendo que dentre elas a mais importante é a de proteção física contra meio ambiente, ou seja, microorganismos, radiação UV e choques mecânicos. Além do mais, ela também serve para controle de agentes tóxicos e permite e limita a passagem de água, eletrólitos e várias outras substâncias¹. A Figura 1 mostra a estrutura da pele de um ser humano.

Figura 1 - Estrutura da pele humana².



Fonte: Site - sendicosmeticos.com.br

Existem três camadas estruturais na pele: a epiderme, a derme e a hipoderme. As principais células da epiderme são os queratinócitos, que produzem a queratina e são interconectados por uma rede de proteínas chamadas desmossomos. Nesta camada há uma subdivisão de quatro partes dependendo da maturação da queratina, que se encontra em constante movimento para a camada mais externa da pele para substituir células velhas. Esta camada pode variar de 0,05 a 1,50 mm de espessura. A derme se encontra debaixo da epiderme e pode variar de espessura de 0,6 a 3 mm e é

Introdução

composta por uma matriz celular rígida que serve como base. Ela é subdividida em duas camadas, sendo que a mais exterior se conecta com a epiderme e contém fibras de colágeno frouxamente organizadas, enquanto que a camada mais interna apresenta grossos aglomerados de colágeno. A derme é composta por fibroblastos que dão origem ao colágeno, que compõe 70 % de sua camada e promove força e rigidez, a elastina, que confere flexibilidade, e os proteoglicanos, que provêm viscosidade e hidratação. Por fim, tem-se a hipoderme, que é composta por tecidos frouxamente conectados e gordura e pode chegar a até 3 cm de espessura no abdômen. Nesta camada estão presentes vasos sanguíneos e nervos maiores do que na derme³.

1.2 BIOMATERIAIS

Uma revolução em cuidados médicos começou com a substituição bem sucedida de tecidos. Afortunadamente, tal revolução coincidiu com o aumento na expectativa de vida dos seres humanos. Para esta operação, duas alternativas eram possíveis, o implante ou o transplante. A primeira opção na maioria dos casos era encontrar um tecido do paciente de um local doador e transplantá-lo para um local alvo tornou-se o objetivo da maioria dos procedimentos cirúrgicos. Este tipo de enxerto, chamado *autograft*, apresentava diversas limitações, especialmente referente à sua disponibilidade, morbidez do tecido alvo, tendência de reabsorção e algumas vezes comprometimento de propriedades biomecânicas. Uma solução parcial para algumas dessas limitações era utilizar-se tecidos transplantados de doadores humanos (*homograft*) vivo, ou morto. Disponibilidade, necessidade de fármacos imunossupressores, preocupação com contaminações prévias e embates éticos e religiosos tornaram-se constantes para este tipo de procedimento⁴.

Uma segunda opção na revolução de substituição de tecidos foi o desenvolvimento, ou em muitos casos a modificação de materiais elaborados para implante a partir de biomateriais. As vantagens significativas de implantes sobre transplantes são disponibilidade, reproduzibilidade e confiabilidade⁴.

Segundo a *Clemson University Advisory Board for Biomaterials*, um biomaterial pode ser definido como “uma substância sistematicamente e farmacologicamente inerte, criada para implantação ou incorporação em organismos vivos”, ou seja, além de suas características desejadas, como

Introdução

resistência à corrosão e propriedades mecânicas destinadas ao seu uso, ela ainda deve ser biocompatível com o organismo em questão, o que significa não poder provocar qualquer tipo de irritação no tecido ao redor, não provocar nenhuma resposta inflamatória anormal, não incitar resposta alérgica ou imunológica e, finalmente, não causar câncer⁵.

Hoje em dia, biomateriais são rotineiramente utilizados em aplicações médicas com diversas finalidades como liberação de fármacos, engenharia de tecidos, terapias com base em dispositivos e estudo de imagem médica. A muito se tem reconhecido que as propriedades dos materiais afetam os resultados biológicos, incluindo meia-vida de fármacos, biocompatibilidade de dispositivos implantados e taxas de liberação de carreadores de fármacos. De mesmo modo, as propriedades dos biomateriais podem ter profundo impacto na proliferação de células e remodelação de tecidos⁶.

Atualmente existe uma grande variedade de biomateriais e estes podem ser divididos em dois grupos, os sintéticos, que se entende pelos polímeros sintéticos, metais, cerâmicos e compósitos, e os naturais, nos quais fazem parte o colágeno, a elastina, a seda dentre outros⁷.

Para um biomaterial ser bem sucedido quando aplicado a um possível reparo tecidual, ele deve contar com certas características, como promover o crescimento celular, ser bem vascularizado e promover um suporte elástico estrutural para a pele. Essas características fazem do colágeno o material ideal para ser utilizado⁸.

1.3 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante encontrada no corpo humano com diversas funções biomecânicas nos ossos, tendões e ligamentos e controlando a expressão de gene celular em seus desenvolvimentos⁵.

Atualmente, 29 moléculas se classificam como moléculas de colágeno, sendo que dentre elas o colágeno tipo I é o mais abundante e o componente principal do tecido conjuntivo, dos ossos, tendões e ligamentos⁹. Seu peso é de aproximadamente 283.000 Dalton e ele é composto por três cadeias polipeptídicas que formam a hélice tripla, sendo que duas delas são iguais e uma diferente ($2\alpha_1$ e $1\alpha_2$). Mais de 95% de seus aminoácidos apresentam a conformação Gly-Pro-Hyp e os 5% restantes não, o que faz com

Introdução

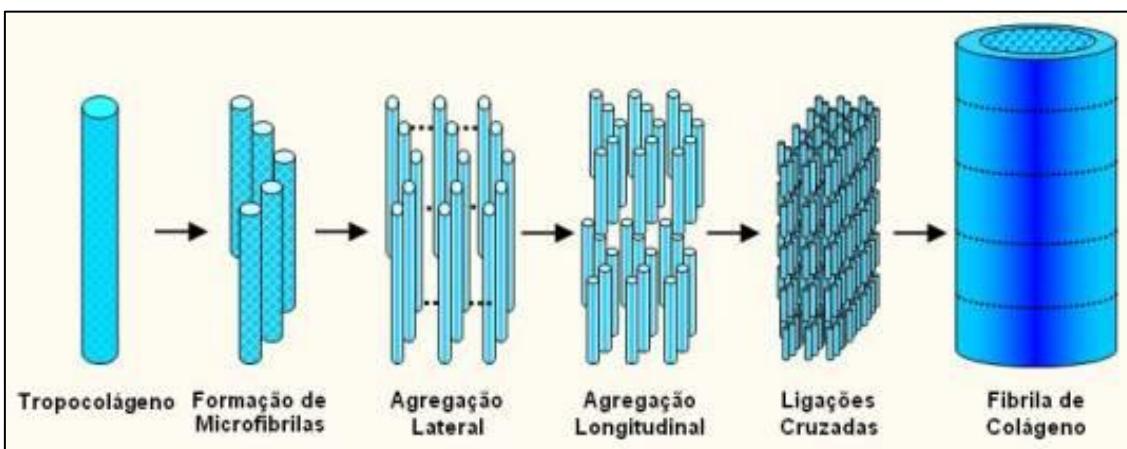
que esta parte não se apresente com o mesmo formato de tripla hélice que o restante, sendo conhecida por telopeptídeos. Sua estrutura helicoidal é estabilizada por fatores como a presença de ligações de hidrogênio entre os hidrogênios ligados ao nitrogênio e oxigênio de resíduos de aminoácido distintos; um conciso arranjo dos aminoácidos na hélice tripla e finalmente a contribuição das moléculas de água para a formação das ligações de hidrogênio. A Tabela 1 lista a composição dos principais aminoácidos encontrados na molécula de colágeno⁵.

Tabela 1- Aminoácidos presentes na proteína de colágeno⁵.

Aminoácido	Conteúdo (Resíduos/1000 Resíduos)
Glicina	334
Prolina	122
Hidroxiprolina	96
Ácido Polar (Asp, Glu, Asn)	124
Básico Polar (Lys, Arg, His)	91
Outros	233

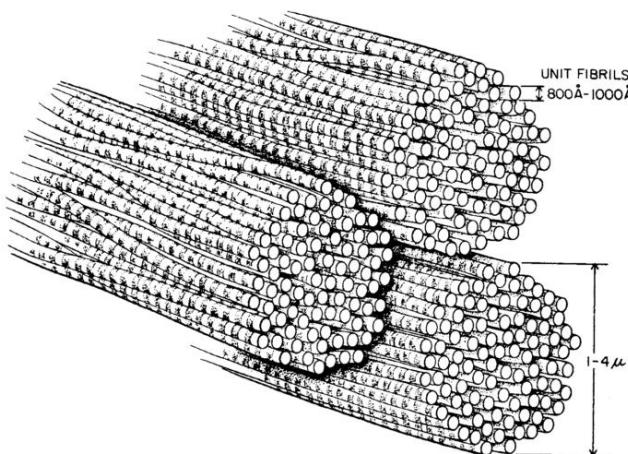
A região de telopeptídeos é onde comumente se explora técnicas de clivagem do colágeno para formação de derivados por rompimento das ligações de reticulação por enzimas proteolíticas como a pepsina. O tropocolágeno é importante construtor estrutural agregando-se para formar estruturas maiores, as fibrilas (Figura 2 e 3). A organização das moléculas de colágeno nas fibrilas é específica de cada tecido⁵.

Figura 2 - Processo de formação das fibrilas de colágeno¹⁰.



Fonte: BATISTA, 2008, p.26.

Figura 3- Fibras de colágeno de tecidos conectores compostos por unidades de fibrilas⁵.



Fonte: BRONZINO, 2003, p. 122.

A agregação das fibrilas forma as fibras que possuem as funções de desenvolvimento e orientação dos tecidos que estão se formando, além de apresentar alta capacidade de tensão elástica e ser também bastante flexível, o que torna a utilização do colágeno como biomaterial muito atraente¹¹.

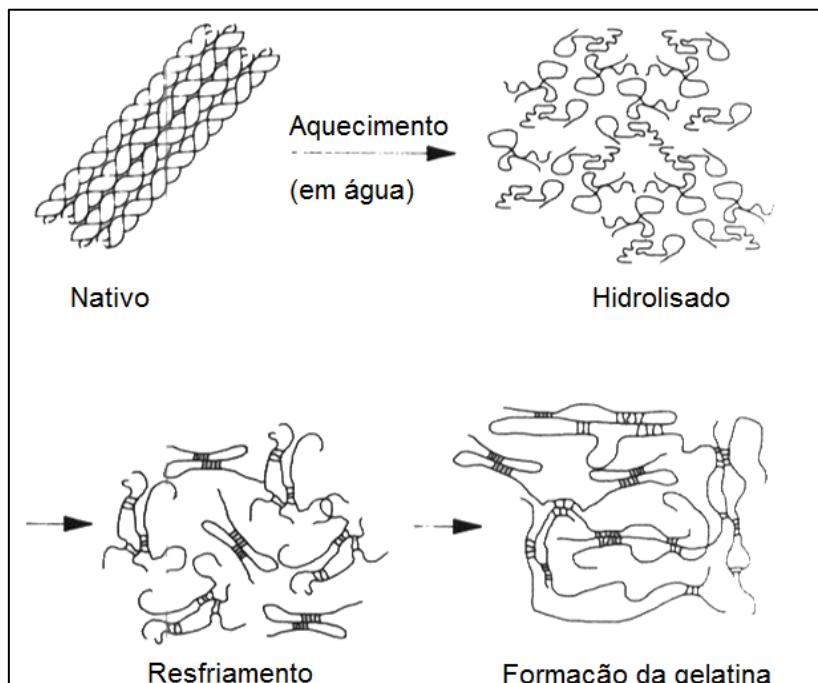
1.4 GELATINA

A gelatina é um biopolímero natural derivado do colágeno que contém um alto teor de glicina, prolina e hidroxiprolina. Sua fibra é um polímero biodegradável com excelente biocompatibilidade, adesividade, adesão celular e além do mais ela tem a capacidade de promover o crescimento celular¹².

Introdução

Geralmente têm-se dois tipos de gelatina, a tipo A, extraída e processada a partir de um pré-tratamento ácido do colágeno, e a tipo B, na qual é obtida ao passo que o colágeno é submetido a um pré-tratamento alcalino, convertendo os resíduos de glutamina e asparagina em ácido glutâmico e aspártico¹³. A Figura 4 apresenta o processo de obtenção da gelatina.

Figura 4- Extração de gelatina de tecidos contendo colágeno¹⁴.



Fonte: Site- albumen.conservation-us.org.

Durante o processo de desnaturação do colágeno para a obtenção da gelatina, sua hélice tripla é hidrolisada nos locais onde os *crosslinks* covalentes unem os três peptídeos.

A gelatina forma géis em solventes que possam formar ligações de hidrogênio. Sua formação, acompanhada por um rearranjo ordenado-desordenado nos quais as cadeias da gelatina recuperam parcialmente a estrutura de hélice tripla do colágeno levam à formação de uma gelatina com regiões principais amorfas de cadeias enroladas randomicamente, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre a ligação N-H da Glicina e C=O da Prolina¹⁵.

Existem estudos que apontam a gelatina como sendo uma grande aliada na área de engenharia de tecidos por auxiliar no suporte e fixação além

Introdução

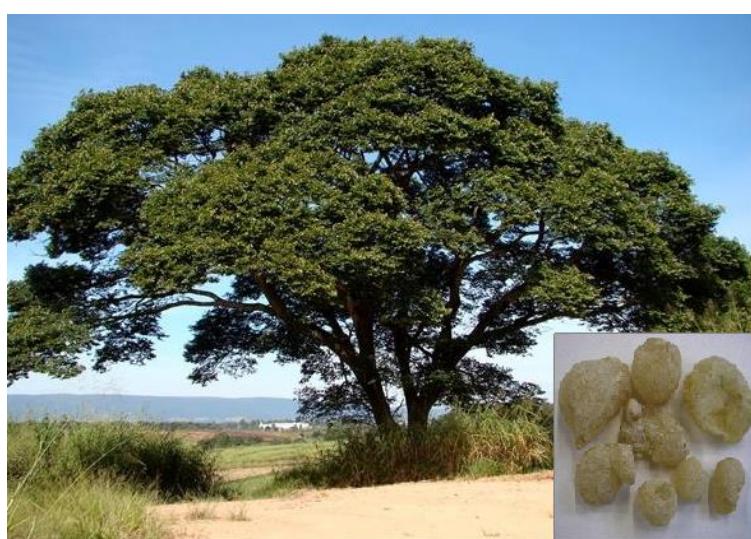
do crescimento celular, como as células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e osteoblastos¹⁶.

1.5 RESINA DE JATOBÁ

O cerrado é um conjunto de ecossistemas compostos por florestas, gramíneas, savanas e florestas ribeirinhas. Ele chega a ocupar um quarto de todo o território brasileiro e é o segundo maior bioma da América do Sul, apenas atrás da Amazônia.

No cerrado, muitas plantas foram reconhecidas pela ação bioativa de suas resinas, sementes e frutos¹⁷. As resinas vegetais podem ser definidas funcionalmente como “uma mistura lipossolúvel de compostos fenólicos ou terpenóides secundários que são usualmente secretados por estruturas especializadas localizadas tanto internamente quanto na superfície da planta e de potencial significado em interações ecológicas”¹⁸. Dentre as plantas presentes no cerrado que podem apresentar os compostos bioativos está o Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), uma árvore típica desta região que pode alcançar de 15 a 20 metros de altura e ter um tronco que pode ultrapassar 1 metro de diâmetro¹⁸. Sua resina apresenta um aspecto opaco (e algumas vezes translúcido) de fragmentos amarelos-pálidos e é composta principalmente por sesquiterpenos, tendo como principal constituinte o óxido de cariofileno, e diterpenos, constituídos majoritariamente por ácidos labdanóicos¹⁹. A Figura 5 mostra a árvore de Jatobá e sua resina.

Figura 5 - Árvore e resina de Jatobá^{19, 20}.



Fonte: Site- onordeste.com; DOMÉNECH-CARBÓ, 2008, p.82.

Introdução

A resina é obtida através de talhos em seu tronco²¹ e estudos recentes mostram que o uso de Jatobá exibe diversas propriedades interessantes para o emprego junto à biomateriais, como atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivos e vírus da dengue tipo 2, além de ser usada na prevenção e terapia contra câncer por ser uma substância menos tóxica que os outros agentes quimioterápicos. Adicionalmente, seus metabólitos secundários como a fisetina, têm ações anti-inflamatórias e anti-oxidantes²².

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o preparo e a caracterização de membranas de colágeno e gelatina com a adição de resina de jatobá para estudar-se sua influência na mistura, visando atingir qualidades que proporcionariam tais membranas serem atrativas como biomateriais para utilização em regeneração de pele.

Secundariamente, visou-se analisar o efeito de diferentes concentrações da resina no meio a fim de investigar se este parâmetro era suficiente para alterar suas propriedades físicas e dentre elas apontar supostamente qual seria a mais interessante frente a suas características apresentadas.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes foram de grau PA e utilizados como tal.

3.2 PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS

3.2.1. Obtenção do colágeno

A serosa bruta foi comprada em casa de carnes, lavada interna e externamente com bastante água e água desionizada para se retirar o excesso de sal sendo então cortada longitudinalmente e depois em pedaços de 5,0 cm. Em seguida se fez um tratamento com solução de ácido acético (HAc) 0,5 mol L⁻¹ por 30 minutos e após esse período novamente lavou-se com água desionizada para posteriormente tratá-la com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol L⁻¹ por 30 minutos a temperatura de 5°C. Após esse procedimento, a serosa foi lavada alternadamente, por 1 hora de intervalo, com água desionizada e NaOH 0,1 mol L⁻¹ à temperatura ambiente até o momento em que ela adquiriu uma coloração creme/branca com posterior lavagens com água desionizada até pH de 6,84. Retirou-se o excesso de água da mesma escorrendo-se em uma peneira e secando-se com um papel absorvente e então a serosa foi cortada em pedaços menores de cerca de 1,0 cm cada.

Preparou-se uma solução básica contendo os sais de cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio na qual ela foi imersa por um período de 72 horas²³. O sistema foi mantido a temperatura ambiente durante esse tempo, agitando- o por volta de 4 vezes ao dia. Após esse processo, ela foi removida, lavada com de água desionizada e adicionada a uma solução aquosa dos mesmos cloretos e sulfatos anteriores por um período de 6 horas, também a temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento de escorrer e lavar com de água desionizada e então se colocou em uma solução de ácido bórico 3%. Lavou-se a serosa com água desionizada por 3 vezes, esperando-se 1 hora entre cada lavagem e então ela foi tratada com uma solução de EDTA 0,3% (m/m) com pH 11,0. O colágeno foi extraído com uma solução de HAc pH 3,5 sendo homogeneizado e desareado. Pelo processo de liofilização

Procedimento Experimental

determinou-se que sua concentração foi de 2,1 %. A partir de uma solução estoque preparou-se uma solução de 1 % por diluição com HAc pH 3,5.

3.2.2 Preparação do gel de gelatina 1%

Para se preparar a gelatina (Sigma, tipo A, pele porcina) 1%, pesou-se 2,0 g da mesma adicionando-se 198 mL de água desionizada. Aqueceu-se o sistema a 60°C por 30 minutos para sua gelatinização.

3.2.3 Mistura de colágeno 1% e gelatina 1% (CG11)

Para se fazer esta mistura, prosseguiu-se do seguinte modo: pesou-se 15 g de cada um dos componentes e homogeneizou-se por agitação mecânica a 1500 rpm por 30 minutos.

3.2.4 Resina (RES)

A resina utilizada nos experimentos é oriunda de árvores adultas da espécie *Hymenaea courbaril*, obtida no município de Jataí-GO e cedida pelo Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani da Universidade Federal de Goiás.

Primeiramente a resina bruta foi triturada e peneirada. Para purificá-la testaram-se diversos solventes nos quais a resina poderia, porventura, dissolver-se, como água, dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio e etanol. O que apresentou melhor resultado dentre eles foi o etanol e desta maneira foi o escolhido para se continuar o experimento.

Uma massa de 250 mg de resina foi colocada em 5mL de etanol, sob agitação e aquecimento a 75°C. A seguir ela foi filtrada em placa porosa e seus resíduos insolúveis foram aferidos para se calcular a concentração final da resina na solução. A resina solubilizada teve a concentração de sua solução ajustada para 48 mg mL⁻¹ e desta uma segunda solução de concentração de 96 mg mL⁻¹ obtida por concentração da anterior sob evaporação do etanol por ar comprimido.

3.2.5 Mistura de colágeno/gelatina/resina

À 20 g da CG11 foi adicionado uma solução de resina com concentração de 48 mg mL⁻¹ sob agitação mecânica (1500 rpm) e temperatura ambiente. Essa mistura foi denominada de CG11R48.

De maneira similar foi feita a mistura utilizando-se uma solução de resina com concentração de 96 mg mL⁻¹ que foi denominada de CG11R96.

3.3 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

Com as soluções descritas no item 3.2.5 fizeram-se 20 membranas circulares de 0,8 g de solução em moldes de teflon. Deixaram-se as membranas secarem em uma câmara sob fluxo de ar constante.

3.4 CARACTERIZAÇÃO

3.4.1 Estudo reológico

As misturas formadas tiveram suas propriedades reológicas determinadas em um reômetro de tensão controlada (AR-1000N - TA Instruments), com geometria cone-placa de 60 mm e ângulo 30' com gap de 15 µm em um sistema termostatizado por um banho circulatório modelo FS18 da Julabo.

A região viscoelástica foi determinada por varredura de 0,05 a 100 Pa, com $\nu = 1$ Hz e $T = 25^\circ\text{C}$ para obter os módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da deformação. Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram obtidos em função da temperatura e frequência angular dentro da região viscoelástica. A determinação da temperatura de desnaturação do colágeno foi feita com variação de temperatura de 20 a 65°C, razão de aquecimento de 5°C min⁻¹, $\nu = 1$ Hz e deformação 1,0%. Os ensaios de varredura de frequência foram feitos de 0,1 a 100 rad s⁻¹ com deformação de 1,0%, a temperatura de 25 °C.

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

O espectro de absorção no infravermelho foi feito a partir das misturas diluídas (aproximadamente 0,5 mg delas em 1 mL de HAc pH 3,5). A solução foi colocada em um molde de teflon para se formar filme sob um fluxo de ar constante. No caso da resina, sua solução foi seca em fluxo de ar, acondicionada em dessecador à vácuo na presença de parafina e posteriormente triturada. O espectro foi feito a partir do pó em pastilha de KBr.

Para ambos os casos o intervalo estudado foi entre 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, utilizando um espectrofotômetro de infravermelho

com transformada de Fourier (FTIR), modelo IRAffinity-1 Shimadzu, software IR solution.

3.4.3 Termogravimetria (TG)

Para a determinação da estabilidade térmica das membranas, foram obtidas as curvas termogravimétricas utilizando-se amostras de aproximadamente 10 mg em atmosfera de ar sintético, com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ em um equipamento TGA Q-50 (TA Instruments). Este procedimento foi realizado no laboratório da Profª Dra. Agnieszka Joanna Pawlicka Maule, no Instituto de Química de São Carlos-USP.

3.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para se conduzir o experimento de DSC, pesou-se por volta de 20 mg das amostras que foram colocadas em suporte hermético de alumínio. A medida foi iniciada em 25°C, com razão de 10 °C min⁻¹, até 120°C. Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 80 mL min⁻¹. Utilizou-se o equipamento da TA – Instruments, modelo DSC 2010.

3.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias das superfícies membranas foram obtidas após serem coladas em *stubs* por fita condutora de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de 2,00 x10⁻² mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV.

3.4.6 Ângulo de contato

Os ensaios de ângulo de contato foram feitos no Laboratório de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos-USP, sob a supervisão da técnica responsável, Dra. Débora Gonçalves e sob orientação do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior. As membranas tiveram seu ângulo de contato medido em temperatura ambiente com o uso do equipamento CAM 200 KSV Instruments – Helsinki. Foram escolhidos três pontos para teste em cada

Procedimento Experimental

membrana e uma gota de água de 3 µL foi depositada sobre sua superfície, sendo feitas cinco medidas, uma a cada minuto, com as quais foi calculado o valor médio. A forma assumida pela gota foi registrada por câmera digital CCD (LG) com aquisição de imagens pelo software KSV, o qual determinou a evolução do ângulo de contato.

3.4.7 Absorção de água

Para se analisar a absorção de água pelas membranas, amostras de massa conhecida que variaram de 2 a 5 mg foram mergulhadas em água desionizada a temperatura de 25°C. Em tempos pré-determinados foram removidas da água com o excesso de água retirado com papel de filtro e pesadas. Esse procedimento foi realizado até se obter uma massa absorvida constante em cada amostra. A equação (1) utilizada para o estudo foi:

$$Abs. (\%) = \frac{(massa\ membrana\ hidratada) - (massa\ membrana\ seca)}{(massa\ membrana\ seca)} \times 100 \quad (1)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

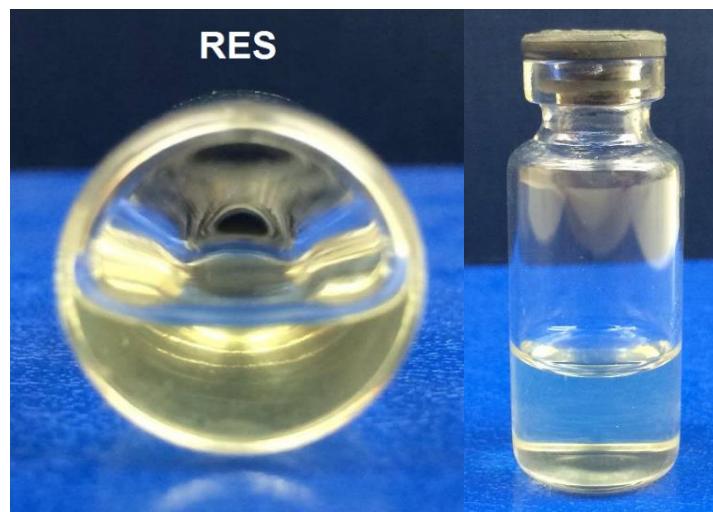
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS

Pôde-se observar que as misturas que continham resina apresentavam um aspecto mais líquido quando comparadas com a sem resina (Figura 6). Adicionalmente, suas colorações se tornaram mais esbranquiçado-amareladas, sendo esta última cor típica da solução de resina (Figura 7).

Figura 6 - Misturas de colágeno e gelatina CG11 (sem resina), CG11R48 (com resina de concentração 48 mg mL⁻¹) e CG11R96 (com resina de concentração 96 mg mL⁻¹).



Figura 7 - Coloração da solução de resina de Jatobá (RES).



As misturas foram caracterizadas por ensaios reológicos.

4.1.1 Estudo reológico

A palavra “viscoelástica” significa a existência simultânea de propriedades viscosas e elásticas no material. Pode-se pensar que todos os materiais reais são viscoelásticos; quando o experimento for relativamente devagar, a amostra tenderá a parecer mais viscosa que elástica, enquanto que se o experimento for relativamente rápido, ela apresentará ser mais elástica que viscosa. Em situações intermediárias, uma mistura viscoelástica é observada.

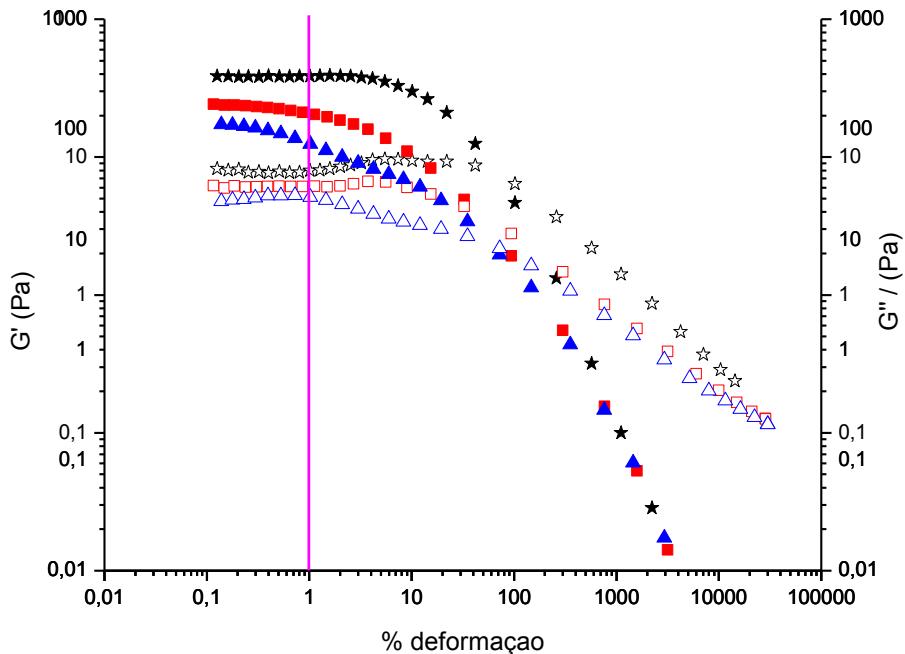
A reologia permite se conhecer a estrutura do material através das propriedades viscoelásticas. As funções e parâmetros dos materiais medidos nos experimentos se mostram uma poderosa ferramenta para o controle de qualidade nos produtos industriais. Por fim, um respaldo em viscoelasticidade linear pode ser de grande ajuda quando se deseja proceder a análises mais complexas como os demais ensaios reológicos por ser utilizado como condição de contorno²⁴.

Na região viscoelástica linear, a resposta (tensão) por parte da amostra analisada a qualquer momento é diretamente proporcional ao valor do sinal inicial (estresse aplicado). Assim, por exemplo, se aplicarmos o dobro de estresse na amostra, a tensão também deverá dobrar²⁴. Em outras palavras, essa região é onde os módulos de armazenamento e perda são constantes a uma faixa de deformação.

4.1.1.1 Varredura de Deformação

A partir da varredura de deformação pôde-se avaliar que o colágeno apresenta o módulo de armazenamento G' com um valor maior que o módulo de perda G"(Figura 08), apresentando uma maior característica do tipo sólido do que do tipo fluido e se mostrando altamente estruturado, ou seja,²⁵ com cadeias longas e flexíveis²⁶.

Figura 08 - G' (sólido) e G'' (vazio) em função da % de deformação para (\star) CG11, (\blacksquare) CG11R48 e (\triangle) CG11R96.



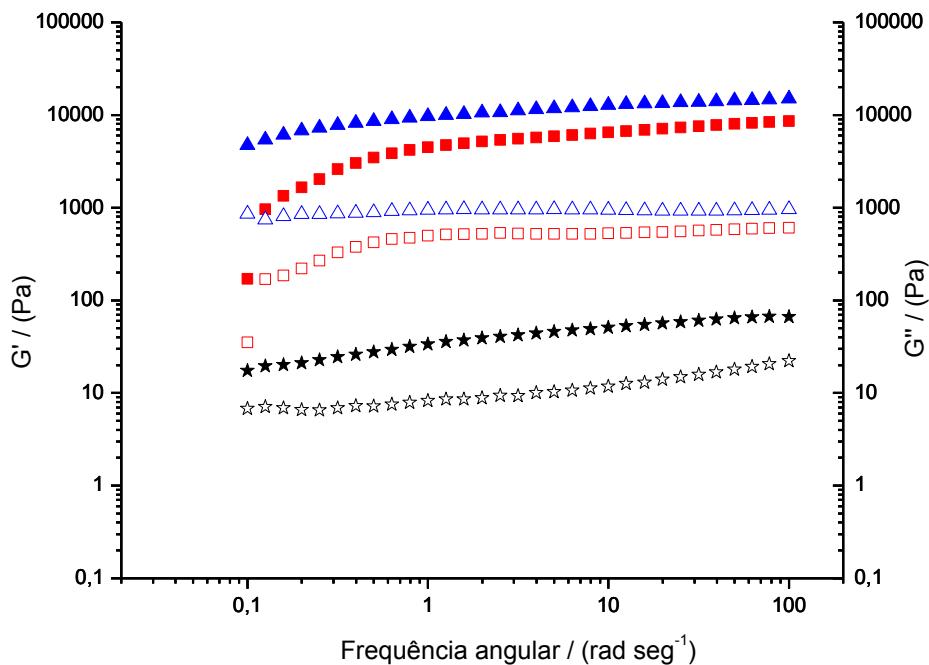
De acordo com a Figura 08 foi escolhida a deformação de 1% na região viscoelástica linear para ser utilizada nos demais ensaios oscilatórios.

Foi feito o teste de varredura de deformação também para a resina, no entanto esta não apresentou uma região viscoelástica linear e deste modo não se conduziu os experimentos seguintes.

4.1.1.2 Varredura de Frequência

Para este estudo, se analisou a resposta das amostras frente ao aumento da frequência a temperatura constante de 25°C. Tal estudo é importante para se caracterizar a natureza da amostra em questão, bem como definir de forma clara a variação dos módulos G' e G'' presentes nos gráficos. A Figura 9 mostra os resultados obtidos.

Figura 9 - Módulos G' (sólido) e G'' (vazio) em função da frequência angular para (\star) CG11, (\blacksquare) CG11R48 e (\triangle) CG11R96.



As curvas de varredura de frequência mostram que o módulo elástico G' é maior que o viscoso G'' para todas as misturas líquidas estudadas, sendo elas também dependentes da frequência aplicada. Escolheu-se a frequência de 5,0 rad seg⁻¹ para aferir os dados de ambos os módulos em cada uma das misturas, resultando na tabela a seguir.

Tabela 2 - Valores de G' e G'' para as misturas na frequência de 5,0 rad s⁻¹.

Amostra	Módulos	
	G' (Pa)	G'' (Pa)
CG11	45,71	10,29
CG11R48	5903	521,1
CG11R96	11770	957,2

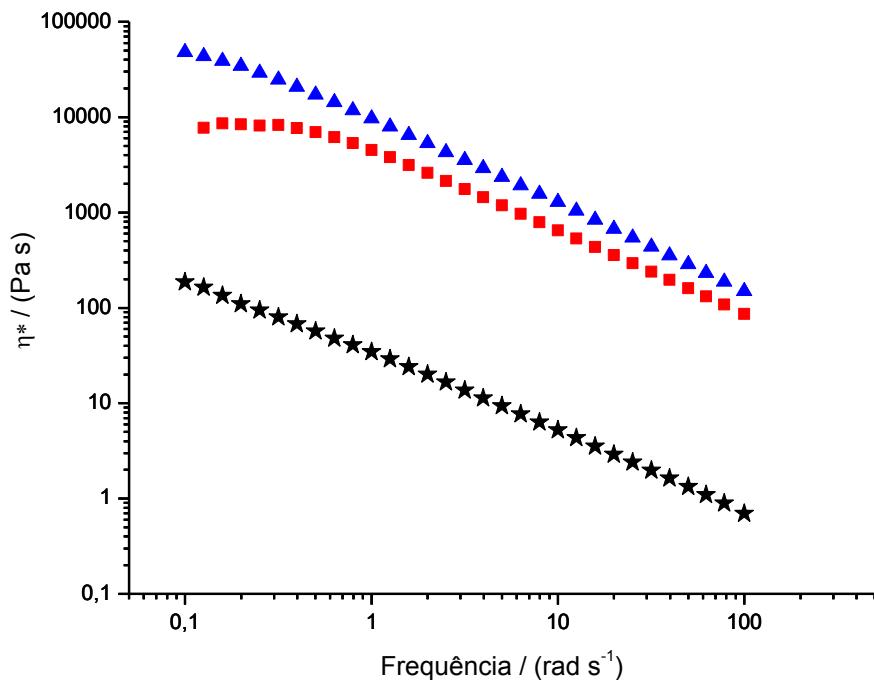
Com base na Figura 9 e na Tabela 2 se conclui que a presença da resina na membrana aumenta o caráter elástico das mesmas. Enquanto que em CG11 a diferença entre os módulos G' e G'' era de 35,4 Pa, na CG11R48 foi de 5382 Pa e na CG11R96 10813 Pa, indicando uma relação de quanto maior a concentração da resina, maior será o caráter elástico da mistura. Outro

Resultados e Discussão

fator que corrobora com este fato é o espaçamento entre os mesmos módulos das diferentes misturas. Fazendo-se a razão o $G'_{CG11R48} / G'_{CG11}$, obteve-se uma ordem de grandeza de aproximadamente 130 vezes. Para a razão $G'_{CG11R96} / G'_{CG11}$ a ordem de grandeza foi para aproximadamente 260 vezes, indicando que o dobro da concentração da resina ocasionou no dobro de elasticidade da misturas em relação à misturas sem resina.

No caso da viscosidade (Figura 10) teve-se que a razão entre os módulos descritos na Tabela 2 $G''_{CG11R48} / G''_{CG11}$ foi de 50 vezes e $G''_{CG11R96} / G''_{CG11}$ foi de 90 vezes, o que mostra que também há o aumento da viscosidade, mas que este parâmetro não segue a mesma relação da elasticidade entre a quantidade de resina e seu aumento no módulo. Através desse resultado, concluiu-se então que de fato aumentou-se o caráter viscoso das misturas, mas o elástico supera seus valores.

Figura 10 - Curvas de viscosidade complexa em função da frequência angular para as misturas: (\star) CG11, (\blacksquare) CG11R48 e (\blacktriangle) CG11R96.



Com base na Figura 10 verifica-se que a CG11 e CGR96 têm um comportamento exclusivamente pseudoplástico em toda a varredura da frequência estudada, ou seja, há uma diminuição drástica na viscosidade com o aumento da frequência angular ²⁷. A adição da resina à solução CG11R48 mostra um efeito de formação de um patamar Newtoniano em frequências

Resultados e Discussão

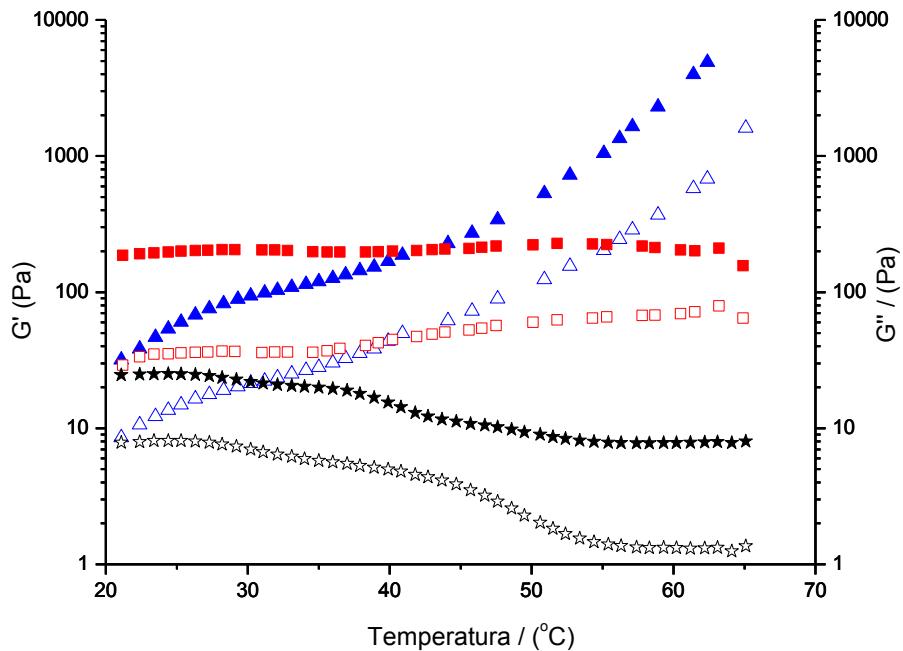
próximas de $0,1 \text{ rad s}^{-1}$ para até por volta de $0,4 \text{ rad s}^{-1}$, onde a deformação aplicada é proporcional à frequência angular. À frequências maiores, CG11R48 também se comporta como material pseudoplástico.

4.1.1.3 Varredura de Temperatura

Esta análise foi feita para determinar o comportamento das amostras com a variação de temperatura, além de obter-se a temperatura de desnaturação do colágeno.

Primeiramente analisaram-se os módulos G' e G'' em função da temperatura, que estão mostrados na Figura 11.

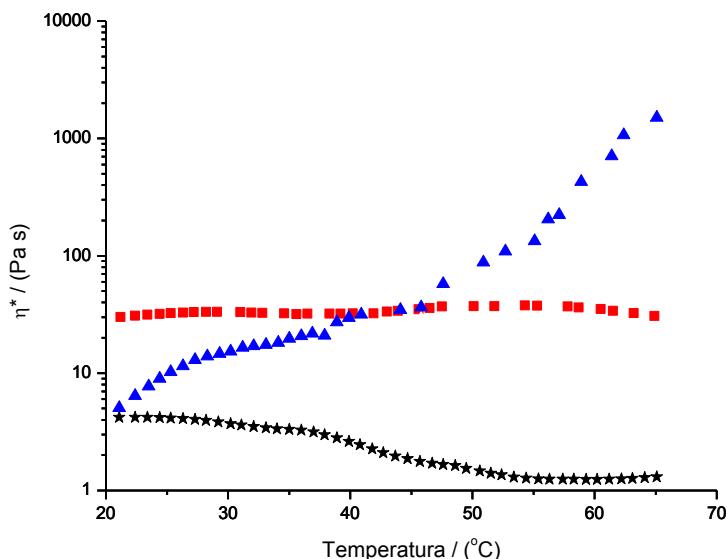
Figura 11 - G' (sólido) e G'' (vazio) em função da temperatura para (\star) CG11, (\blacksquare) CG11R48 e (\blacktriangle) CG11R96.



Na Figura 11 pode-se observar que a CG11, com o aumento da temperatura, tem seus módulos decrescendo, indicando que há a desnaturação do colágeno no decorrer do experimento. A CG11R48 se manteve praticamente constante durante toda a análise, enquanto que a CG11R96 demonstrou um aumento abrupto de seus módulos com o aumento da temperatura.

A Figura 12 contém as curvas de viscosidade complexa vs. temperatura.

Figura 12 - Curvas de η^* vs. Temperatura para as misturas (★) CG11, (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.



Novamente verifica-se que a resina manteve a viscosidade num patamar constante em função da temperatura para CG11R48, ao passo que para a CG11R96 houve um aumento com o aumento da temperatura. Isto mostra que a alteração na viscosidade das misturas é uma ação exclusivamente proporcionada pela resina adicionada, que provavelmente atuou na conformação tridimensional da mistura.

A partir da Figura 12 é possível se construir a curva da primeira derivada da CG11 de forma que esta irá mostrar a temperatura de desnaturação do colágeno.

Constatou-se que o colágeno apresentou uma temperatura de desnaturação de 40,7°C. Este valor difere do obtido pelo DSC, uma vez que aquele se apresentava na forma sólida, enquanto que este se apresenta na forma de gel, possuindo um maior grau de liberdade o que modifica suas propriedades.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas obtidas tiveram um aspecto similar ao das misturas, sendo que as que continham a resina apresentavam uma coloração mais

Resultados e Discussão

amarelada e dependendo da concentração, mais ou menos pontos brancos estavam distribuídos pela sua superfície.

Figura 13 – Foto digital das membranas.

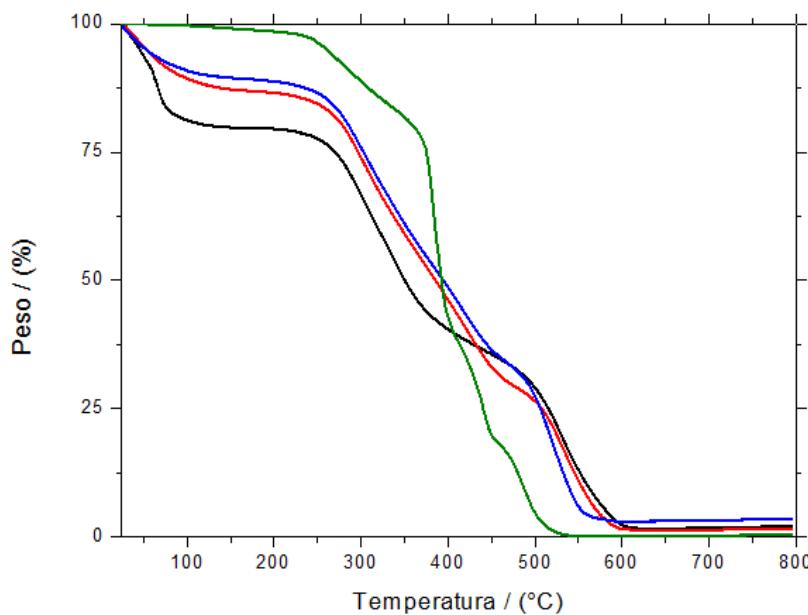


4.2.1 ANÁLISE TÉRMICA

4.2.1.1 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi utilizada para se avaliar a estabilidade térmica das membranas obtidas e também da resina frente ao aumento gradual da temperatura. A Figura 14 reproduz as curvas obtidas para cada uma delas.

Figura 14- Curvas TG para as várias amostras analisadas, sendo (—) CG11, (—) RES, (—) CG11R48, (—) CG11R96.



Todo o processo de perda de massa, no caso das membranas, pode ser dividido em três fases. A primeira consiste na perda de água estrutural e absorvida das amostras entre as temperaturas de 25 a 200°C. A segunda fase

consiste na decomposição térmica do colágeno e gelatina e compreende a região de 200 a 500°C. A partir dos 500°C, a terceira fase, está relacionada a carbonização dos materiais. No caso da resina, a curva TG mostrou 4 fases: a primeira também compreendendo a perda de água estrutural e absorvida entre as temperaturas de 25 e 200°C, a segunda fase de 200 a 370°C, a terceira de 370 a 450°C, com essas duas últimas sendo referentes a degradação/decomposição dos componentes da resina e por fim a última fase vai de 450°C em diante, que foi devido a carbonização do material. A Tabela 3 mostra a quantidade de perda de massa em cada fase para as membranas e para a resina.

Tabela 3 - Porcentagem de perda de massa nas diferentes fases para cada uma das membranas e para a resina.

Amostra	Porcentagem de massa perdida			
	25-200°C	200-500°C	500-700°C	450-700°C
CG11	20,5	50,4	27,6	
CG11R48	13,3	60,3	25,0	
CG11R96	11,4	61,1	23,9	
RES	25-200°C	200-370°C	370-450°C	450-700°C
	1,4	21,0	57,9	19,5

Na primeira fase, a membrana CG11 sofreu uma maior perda de seu valor total e a resina sofreu pouca influência do aumento da temperatura, o que já era de se esperar devido a sua composição química que apresenta apenas uma pequena porção de seus componentes capazes de absorver água ²⁸, sugerindo que a resina de jatobá pode alterar as interações das misturas de colágeno e gelatina, tornando-os menos susceptíveis a incorporação de água em seu meio. Adicionalmente, conforme se aumentou a concentração de resina na membrana, a perda de água foi menor, mas ambas as membranas com resina tiveram uma perda próxima. Na segunda fase, por volta de 300°C, se começa a notar uma perda acentuada por parte das membranas. É interessante verificar-se que as membranas que contém resina na mistura apresentam uma queda mais rápida quando comparada com a sem resina. Isto

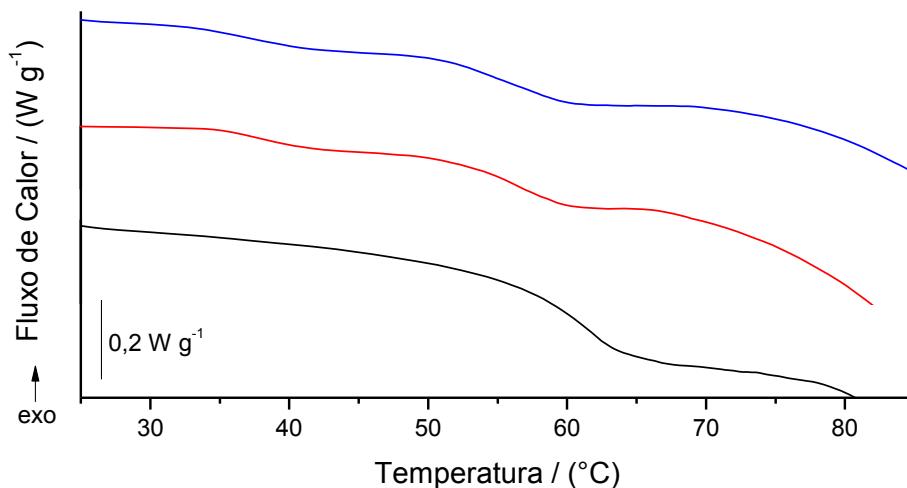
Resultados e Discussão

é por conta da própria resina que tem um decaimento abrupto de sua massa proveniente da degradação/decomposição de seus compostos orgânicos. Na fase 3 da perda de massa, as três membranas se comportam praticamente da mesma maneira devido à curva da resina demonstrar uma total carbonização de seu material a temperaturas menores a esta.

4.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC obtidas para as três membranas estão mostradas na Figura 15.

Figura 15 - Curvas DSC para (—) CG11, (—) CG11R48, (—) CG11R96.



Observa-se que a CG11 possui apenas uma transição térmica observável, enquanto que as com resina apresentam duas. Com base nessas observações fez-se a Tabela 4.

Tabela 4 - Temperaturas de transições térmicas das amostras analisadas.

Amostra	Transições Térmicas	
	1 ^a (°C)	2 ^a (°C)
CG11	-	60,5
CG11R48	34,8	54,3
CG11R96	38,0	55,7

A resina influenciou as misturas de modo a aparecer mais um temperatura de desnaturação a aproximadamente 25°C menor do observado para a CG11 e também diminuiu em cerca de 5°C a segunda temperatura de

Resultados e Discussão

desnaturação. Observa-se que ambas as temperaturas para CG11R48 foram menores que para CG11R96, mas essa diferença foi relativamente pequena para ser levada em conta.

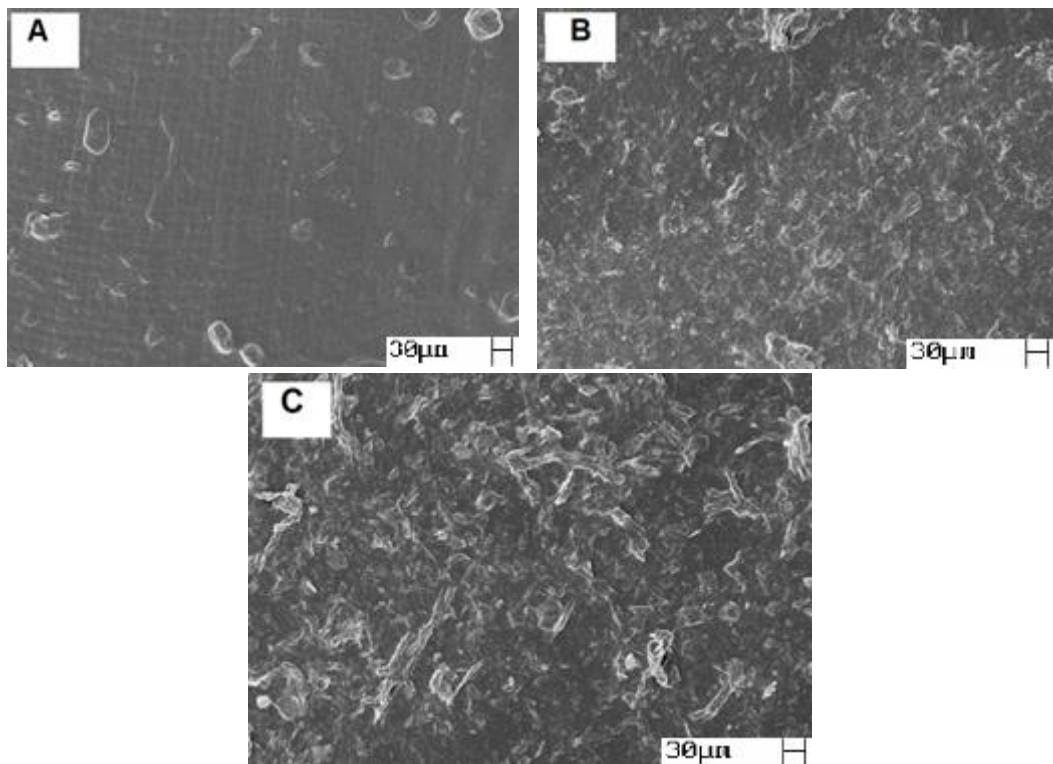
As moléculas de colágeno são estabilizadas por ligações de hidrogênio e por ligações intermoleculares²⁹. Tanto o aparecimento de uma nova temperatura de desnaturação, quanto à diminuição da observada em CG11 sugere que a resina influenciou a mistura competindo com essas interações que as estabilizam, fazendo com que sua presença torne mais fácil de ocorrer desnaturações nas respectivas temperaturas.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia da superfície das membranas de colágeno e gelatina com e sem resina pôde ser conduzida através de suas fotomicrografias (Figura 16).

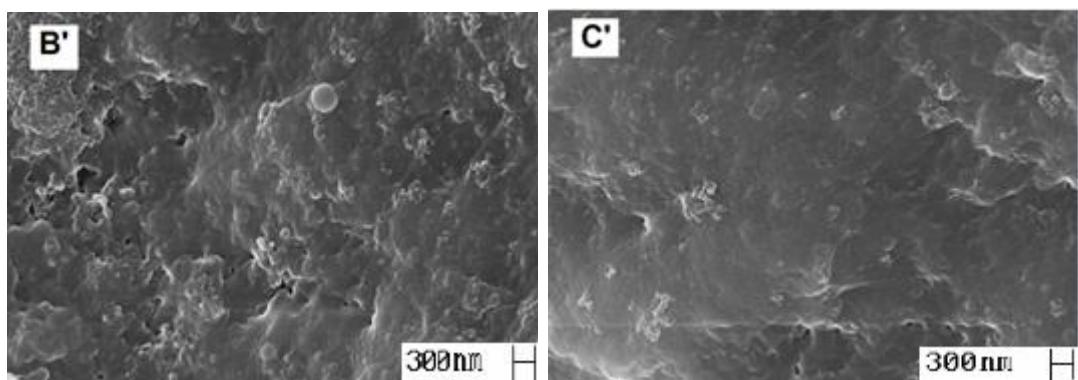
Figura 16 - Fotomicrografias por MEV para: (A) CG11, (B) CG11R48 e (C) CG11R96.

Aumento de 200x.



Pelas imagens observa-se que a superfície do material tornou-se rugosa a partir da adição de resina de Jatobá. Além do mais, tal rugosidade apresenta um aumento com o aumento da concentração da resina presente.

Figura 17 – Fotomicrografias por MEV para (B') CG11R48 e (C') CG11R96. Aumento de 20000x

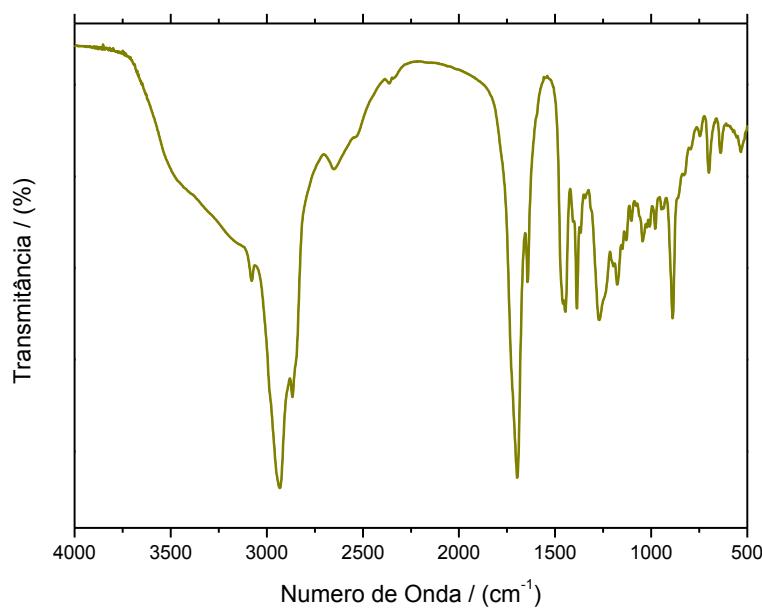


Ao ampliar para 20.000x, notou-se que conforme se aumenta a concentração de resina, houve um maior recobrimento da superfície da membrana.

4.2.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FIR)

A figura 18 mostra o espectro de absorção na região do infravermelho para a resina de Jatobá.

Figura 18 - Espectro de absorção no IV para a resina de Jatobá (RES).



A região espectral entre 3700 e 3100 cm^{-1} é predominada por um pico largo por volta de 3400 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento simétrico das ligações O-H. A outra absorção nessa região é o pequeno pico localizado a 3083 cm^{-1} , que é relacionado ao estiramento C-H dos grupos monoalquil. A

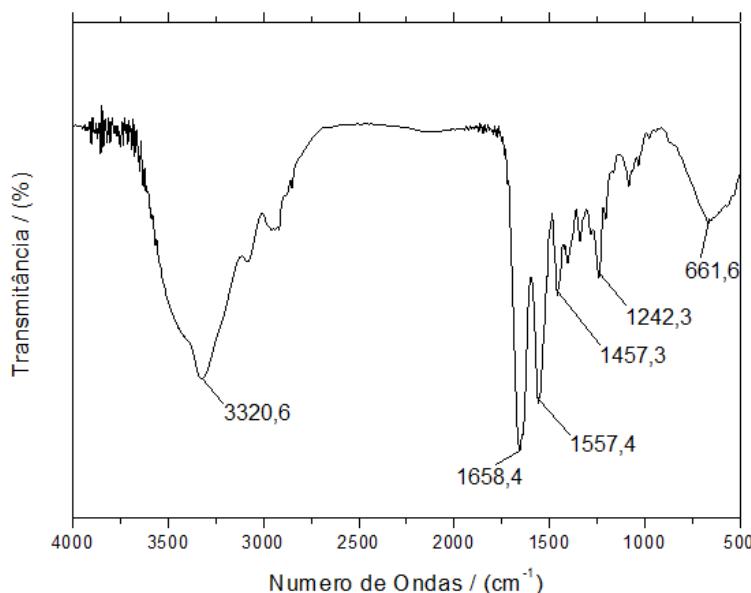
Resultados e Discussão

região espectral de 3050-2400 cm⁻¹ é caracterizada por bandas referentes a frequências vibracionais das ligações alifáticas simples da ligação C-H e é dominada por uma banda intensa em 2933 cm⁻¹ produzida pelos grupos metileno³⁰.

Os picos em 1694 cm⁻¹ e 1722 cm⁻¹ referem-se a vibrações das duplas ligações C=O em grupos carboxilas de resinas ácidas. Uma absorção em 1643 cm⁻¹ é provavelmente relacionada ao dobramento de O-H. A região espectral 1550-650 cm⁻¹ contém as maiores quantidades de absorção e podem ser atribuídas ao movimento de deformação do C-H em grupos de metil e metilenos. A região espectral compreendida entre 1300-1100 cm⁻¹ contém absorções atribuídas a ligações simples C-O. Um grande número de bandas localizadas a regiões menores que 1100 cm⁻¹ apresentam baixas amplitudes e são causadas por vibrações em estruturas macromoleculares. Uma exceção a isto é o pico em 891 cm⁻¹, que é atribuído ao movimento de deformação para fora do plano das ligações C-H em grupos de metilenos terminais³⁰.

A Figura 19 retrata o espectro FTIR da CG11 sendo possível constatar três bandas que são características das proteínas^{31, 32}.

Figura 19 - Espectro de absorção no IV para a CG11.



Duas delas, em 1557,4 e 1658,4 cm⁻¹ correspondem a bandas da amida I e II, provenientes da deformação axial da ligação C=O e deformação angular do N-H, junto com o estiramento da ligação C-N, respectivamente. Em 661,6 cm⁻¹ uma banda alargada e de média intensidade se forma devido a

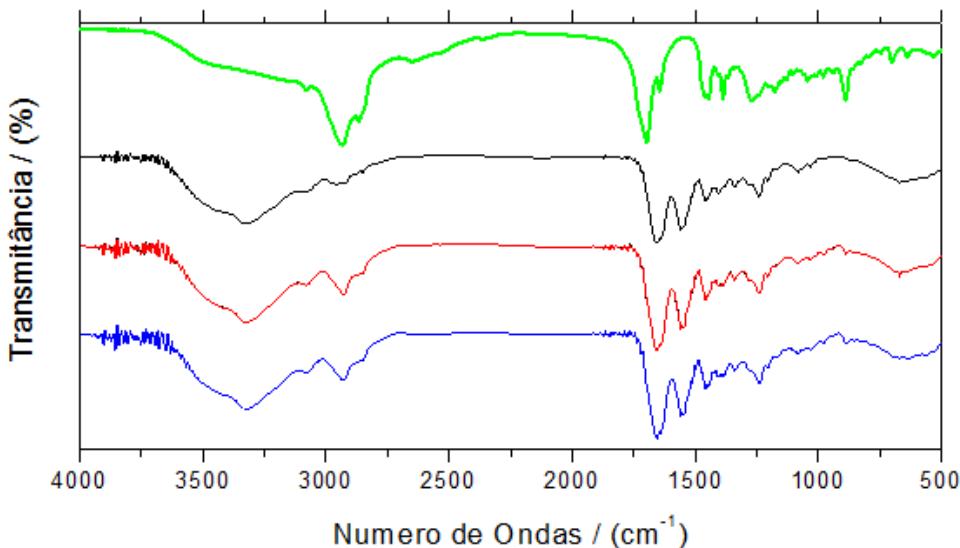
Resultados e Discussão

deformação angular fora do plano da ligação N-H. Em $3320,6\text{ cm}^{-1}$ se tem uma banda larga e intensa proveniente do estiramento O-H.

A banda em $1242,3\text{ cm}^{-1}$ é devido às vibrações no plano da amida III, a deformação da ligação N-H e ao estiramento C-N, e em $1457,3\text{ cm}^{-1}$ ocorre pela vibração dos anéis pirrolidínicos presentes na prolina e hidroxiprolina. Essas duas bandas podem ser utilizadas para se verificar a integridade da tripla hélice do colágeno no material de modo que a primeira é sensível à presença da estrutura secundária do tropocolágeno, enquanto que a segunda não. Para se fazer tal controle da estrutura secundária do tropocolágeno, basta se determinar a razão entre as duas bandas e verificar se o valor resultante é próximo de 1,0. Caso este valor esteja próximo de 0,5, isso significa que houve uma desnaturação da estrutura^{32,33}. Como nenhuma de nossas membranas é constituída apenas de colágeno, não foi feito tal cálculo, uma vez que ele não expressaria a relação real entre as bandas.

A Figura 20 apresenta os espectros tanto da resina, quanto os de todas as membranas.

Figura 20 - Espectros de absorção no IV de todas as amostras estudadas, sendo
— RES, — CG11, — CG11R48, — CG11R96



Analizando a Figura 20, constata-se primeiramente que os espectros das membranas CG11R48 e CG11R96 são praticamente idênticos. Neles ainda observou-se um aumento de intensidade na banda em 2933 cm^{-1} provinda do acréscimo da resina às membranas e adicionalmente elas tiveram

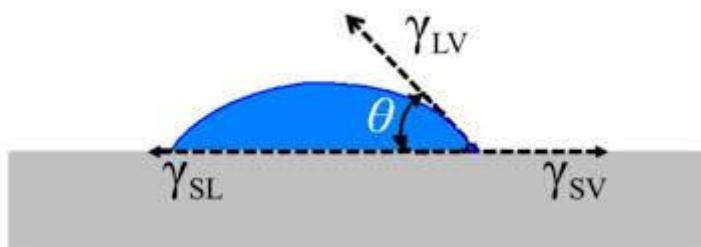
Resultados e Discussão

um alargamento de suas bandas em 1658 cm^{-1} , que deve ter sido consequência da sobreposição de sua banda com a da resina em 1690 cm^{-1} . Observou-se que nos espectros para CG11R48 e CG11R96 houve o aparecimento de uma banda em 891 cm^{-1} da deformação fora do plano dos metilenos provindo da resina.

4.2.4 Ângulo de contato

O ângulo de contato (θ) é uma medida quantitativa do sólido sendo molhado por um líquido, o que mostra seu caráter hidrofílico, ou hidrofóbico. Geometricamente é definido como o ângulo formado por um líquido nas fronteiras das três fases, na qual um líquido, um gás e um sólido se interceptam (Figura 21).

Figura 21 - Esquema do ângulo de contato de uma gota em uma superfície sólida³⁴.



Fonte: adaptado de POPA, 2013, p.938.

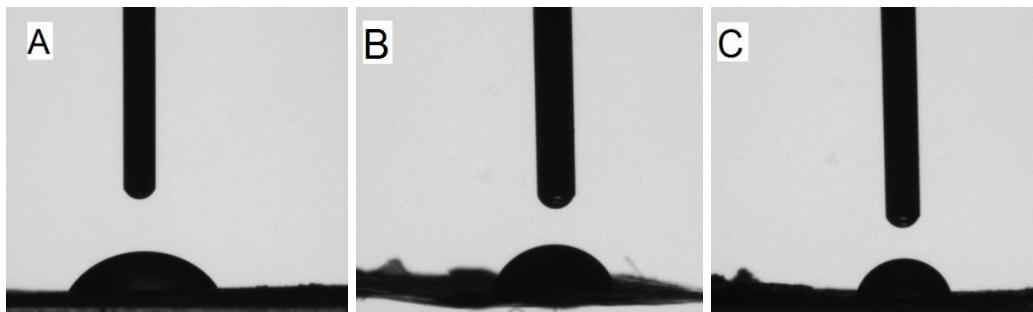
A equação (2) que rege esta medida é conhecida como a relação de Young, descrita a seguir.

$$\gamma_{lv} \cdot \cos\theta = \gamma_{sv} \cdot \gamma_{sl} \quad (2)$$

Em que γ_{sv} , γ_{sl} e γ_{lv} , são as três tensões interfaciais envolvidas: a sólida-gasosa, a sólida-líquida e a líquida-gasosa respectivamente.

A Figura 22 mostra as imagens das gotas nas superfícies das membranas.

Figura 22 - Imagens da gota na superfície das membranas, sendo: (A): CG11, (B): CG11R48 e (C): CG11R96.



A Tabela 5 apresenta os resultados de ângulo de contato para as membranas de colágeno e gelatina com e sem a resina de Jatobá em quintuplicata, bem como a média aritmética e seu desvio padrão.

Tabela 5 - Valores dos ângulos de contato e suas médias para as membranas.

Ângulo de Contato (°)		
CG11	CG11R48	CG11R96
45,47	43,40	68,78
43,49	45,43	68,36
44,87	44,53	68,11
45,18	45,46	68,08
45,29	43,80	68,22
$44,86 \pm 0,79^a$	$44,52 \pm 0,93^a$	$68,31 \pm 0,28^a$

a – média aritmética dos valores e desvio padrão.

Como mostrado na Tabela 5, todos os ângulos analisados foram inferiores a 90°, indicando um bom grau de hidrofilicidade e molhabilidade para a superfície das membranas. Para as membranas CG11 e CG11 R 48 observaram-se um maior grau de “espalhamento” da gota na superfície das membranas. Já para a CG11R96, a de maior concentração, obteve-se maior valor para ângulo de contato, indicando que o aumento da concentração de resina tornou a membrana menos hidrofílica.

Resultados e Discussão

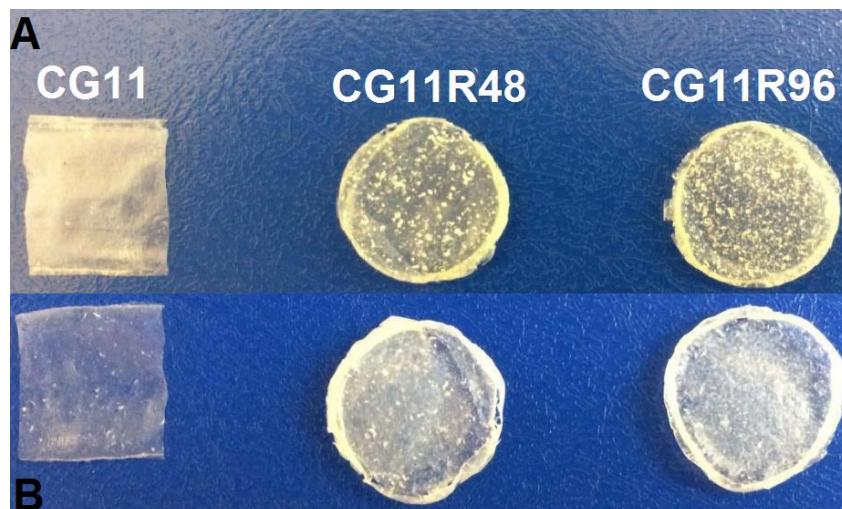
O valor do ângulo de contato tanto da membrana CG11 e CG11R48 aproximaram do valor expresso na literatura para uma membrana de colágeno puro de 45°³⁵. A presença da resina nessa concentração não interfere na hidrofilicidade e molhabilidade da membrana, podendo ser interessante para certos fins em sua utilização para a regeneração da pele.

Sabe-se que para a aplicação de membrana de colágeno para liberação controlada de fármacos *in vivo*, uma maior hidrofilicidade pode acelerar a permeabilização de água e promover uma taxa de difusão mais eficiente de fármacos aos poros da membrana. Assim sendo, talvez fosse mais interessante se considerar o uso da membrana com adição da resina como a descrita para CG11R48 caso se objetivasse utilizá-la para tal finalidade, uma vez que esta se apresentou com um carácter mais hidrofílico que a mais concentrada³⁶. Contudo, se a finalidade fosse utilizar uma membrana para a retenção de líquidos e fármacos junto a um tecido, fazendo com que não houvesse dispersão a membrana mais interessante seria a que tem maior concentração da resina devido a sua maior hidrofobicidade.

4.2.5 Absorção de água

As fotos digitais na Figura 23 mostram membranas antes e depois do processo de intumescimento.

Figura 23 - Fotos de membranas antes (A) e após (B) o intumescimento.



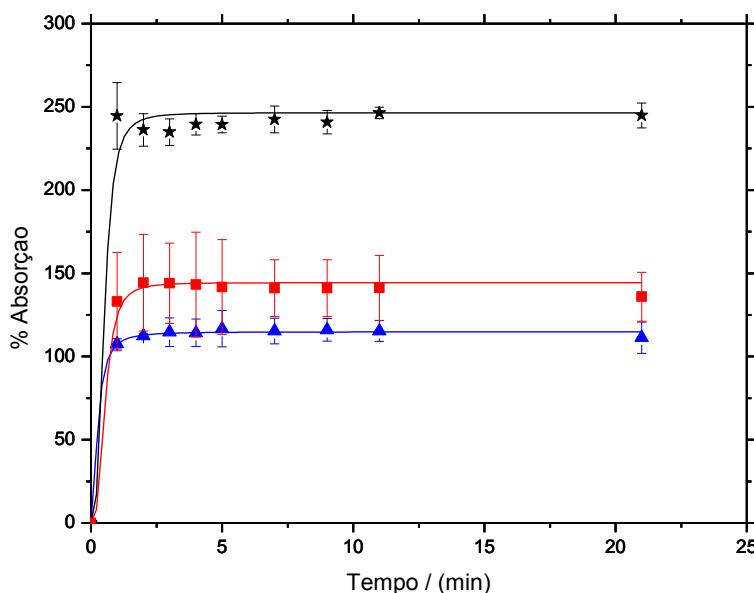
Com base nas fotos digitais verifica-se, visualmente, que para a membrana CG11 ocorre o intumescimento com um pequeno aumento de

Resultados e Discussão

tamanho e um aumento na transparência. Para as membranas com resina CG11R48 e CG11R96 ocorre um maior aumento de tamanho com grande aumento na opacidade.

Para tornar o método de investigação mais quantitativo, pesaram-se as membranas em determinados tempos e então se fez as curvas de intumescimento para as três membranas estudadas. Neste experimento monitorou-se a absorção de água nas membranas por um período total de 24 h, mas os resultados mostram que em apenas 1 minuto já se tem a estabilização do grau de absorção.

Figura 24 - Curvas de intumescimento para as membranas: (★) CG11; (■) CG11R48 e (▲) CG11R96.



A Figura 24 corrobora nossas observações acerca das fotos digitais obtidas e também do raciocínio utilizado no experimento de TG. A membrana CG11 demonstrou valores de intumescimento maiores que ambas as outras, indicando que a resina promove um caráter hidrofóbico à membrana sendo influenciado pela concentração do componente, o que também foi notado no estudo de ângulo de contato.

Com o intuito de se comparar a porcentagem de absorção das membranas, fez-se a Tabela 6 para o tempo de 10 minutos.

Tabela 6 - % de absorção para as membranas no tempo de 10 minutos.

Amostra	% Absorção
CG11	246,4
CG11R48	140,8
CG11R96	114,8

A quantidade de água absorvida a mais da membrana sem resina, quando comparada com a CG11R48 foi de 1,75 vezes, enquanto que em relação à CG11R96 foi de 2,15 vezes, indicando que de fato a resina atua nas misturas de modo a diminuir a interação das moléculas de água com elas e este efeito é mais pronunciado conforme se aumenta sua concentração.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados é evidente a influência da resina nas misturas e que sua concentração afeta suas propriedades. Os estudos reológicos nos mostraram que sua presença faz com que o caráter viscoso e elástico das misturas sejam aumentados, mas que este último em uma proporção maior que o outro, ainda mais se a resina estiver em maior concentração. Além do mais, observou-se que com o aumento da temperatura os módulos G' e G'' para as misturas com resina aumentaram também proporcionalmente à concentração de resina, enquanto que para a CG11 houve um decréscimo em seus valores. A análise térmica também mostrou que a resina atua de forma a diminuir a quantidade de água absorvida pelas membranas e para o DSC obteve-se uma nova temperatura de desnaturação para as misturas, sugerindo que os grupos funcionais da resina possam atuar de modo a desestabilizar sua estrutura.

As fotomicrografias das membranas revelaram que com a adição da resina no meio, suas superfícies tornaram-se cada vez mais rugosas conforme se aumentava a concentração. Já os espectros de infravermelho mostraram o alargamento de certas bandas do CG11 e a intensificação da banda em 2933 cm^{-1} proveniente da resina.

No caso do estudo do ângulo de contato verificou-se que a resina na proporção de CG11R48 não exerce grande influência no grau de molhabilidade da membrana ficando com seu valor próximo a CG11, enquanto que a de maior concentração demonstrou um maior grau de hidrofobicidade. Este resultado é importante por nos mostrar que não há uma membrana de determinada concentração que seja melhor ou pior que a outra para sua utilização, mas sim que uma é mais apropriada que a outra dependendo do uso que se queira.

Finalmente, o estudo de absorção de água mostrou-nos que após este procedimento todas as membranas aumentam de tamanho, mas que somente as que contêm resina se tornam mais opacas. Além do mais, também se observou que a membrana que contém maior concentração de resina é a que menos absorveu água, o que vai de encontro com os outros resultados obtidos.

6 REFERÊNCIAS

1 - Disponível em:

<http://courses.washington.edu/bioen327/Labs/Lit_SkinStruct_Bensouillah_Ch01.pdf>.p. 1. Acesso em 28/05/2016

2 - Disponível em:

<<http://sendicosmeticos.com.br/linhaprofissional/imagens/pele.jpg>>. Acesso em 01/06/2016

3 - Disponível em:

<http://courses.washington.edu/bioen327/Labs/Lit_SkinStruct_Bensouillah_Ch01.pdf>.p. 2-5. Acesso em 28/05/2016

4 - HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, p. 1419-1423, 1998.

5 - PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. Biologic Materials: Tissue Derived Biomaterials (Collagen). In: PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. *Biomaterias: Principles and Applications* v.2, Boca Raton, Fl.: CRC Press, 2003. p.117-139.

6 – MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*, v. 8, p. 15-23, 2008.

7 - PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. Biomaterias: Principles and Applications. Boca Raton, CRC Press, 2002. 250 páginas.

8 - MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, v. 11, p. 26-35, n. 5, 2008.

9 - SÖDERHÄLL, C.; et al. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biology*, v.5, p. 1952-1961, 2007.

10 – BATISTA, T. M. Mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno aniónico derivadas de tecidos biológicos. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

11 - USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers, elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch. Histol. Cytol.*, v.65, n.2, p. 109-126, 2002.

12 - HUANG, C. H.; et al. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. *Materials Science and Engineering*, v. 32, p. 2476–2483, 2012.

Referências

- 13 – ZHANG, Y.; OUYANG, H.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S.; HUANG, Z.-M.**
Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 72B, p. 156–165, 2005.
- 14 - Disponível em:**
<http://albumen.conervation-us.org/library/c20/vonendt1991e.gif>. Acesso em 03/05/2016.
- 15 - Disponível em:** <<http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/collagen-vs-gelatine-based-biomaterials-and-their-biocompatibility-review-and-perspectives>> Acesso em: 10/01/2016.
- 16 - LANCELOTTI, C.** *Obtenção e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno, gelatina e extrato de semente de uva*. 2014. 82 f. Tese (Mestre Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 17 – DIAS, L. S.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N.** Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 610-618, 2013
- 18 - LANGENHEIM, J. H.** Plant Resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. *Annals of Botany*, v. 93, p. 784-785, 2004.
- 19 - DOMÉNECH-CARBÓ, M. T.; et al.** Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa*, *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 284, p. 81-92, 2009.
- 20 - Disponível em:**
<http://www.onordeste.com/administrador/personalidades/imagemPersonalidad e/d2c79cf2418d943660c17ef80c651c7b228.jpe> . Acesso em: 07/06/2016
- 21 - Disponível em:**
<http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/jatoba.html#.V1h1dvkrLIU>.
Acesso em: 27/04/2016
- 22 - DA COSTA, M. P.; et al.** Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea Courbaril* L. and its major constituent fisetin. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, p. 245, 2014.
- 23 – HORN, M. M.** *Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico*. 2008. 73 f. Tese (Mestre Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 24 – BARNES H. A.; HUTTON J. F.; WALTERS K.** An Introduction to Rheology. United Kingdom: Elsevier, 2005. 199 p.

Referências

- 25** - LAUN, M. Understanding Rheology of Structured Fluids. *Private communication*, 1964. 11p.
- 26** - WITTEN, T. A.; Structured fluids. *Physics today*, v. 43, p. 21-28, 1990.
- 27** - SCHRAMM, G.; Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. e. 2, São Paulo: Artliber, 2006. 238p.
- 28** - BEZERRA, G. P. *Estudo Farmacoquímico Bioguiado Pela Atividade Miorrelaxante Do Extrato Etanólico Das Cascas Do Caule De Hymenaea Courbaril L. (Jatobá)*. 2013. 128 f. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- 29** - DA SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 71, p. 530-539, 2012.
- 30** – TAPPERT, R.; WOLFE, A. P.; MCKELLAR, R. C.; TAPPERT, M. C.; MUEHLENBACHS, K. Characterizing modern and fossil gymnosperm exudates using micro-Fourier transform infrared spectroscopy. *Int. J. Plant Sci.*, v. 172, p. 120–138, 2011.
- 31** - PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier-transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions - deconvolution of the amide i-band for conformational studies. *Biopolymers*, v. 27, p. 1749-1760, 1988.
- 32** - GEORGE, A.; VEIS, A. FT-IR in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. *Biochemistry*, v. 30, p. 2372-2377, 1991.
- 33** - EGAWA, E. Y. *Caracterização Térmica e Reológica de Blendas de Glicerol:Colágeno Tipo I de Diferentes Tecidos*. 2007. 106 f. Tese (Mestre Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 34** - POPA, L.; GHICA, M. V.; ALBU, M. G.; ORTAN, A.; DINU-PÎRVU, C. E. Hysteresis of contact angle. Dynamic wettability studies of collagen and doxycycline porous matrices crosslinked with tannic acid. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 8, n. 3, p. 937 – 943, 2013.
- 35** – YING, P.; JIN, G.; TAO, Z. Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin—effect of the surface wettability, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 33, p. 259–263, 2004.
- 36** - PEDROSO, M. G. V. *Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA*. 2009. 70 f. Tese (Mestre Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.