



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



MARIANA CHIOCHETA BUENO

**OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE COLÁGENO E
QUITOSANA COMO BIOMATERIAL PARA LIBERAÇÃO DE
FÁRMACO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pato Branco, 2021.

MARIANA CHIOCHETA BUENO

**OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE COLÁGENO E
QUITOSANA COMO BIOMATERIAL PARA LIBERAÇÃO DE
FÁRMACO**

**Obtaining Scaffolds the Basis of Collagen and Chitosan as
Biomaterial for Drug Release**

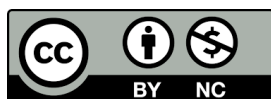
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos”

Professor Orientador: Dr^a. Patrícia Teixeira Marques.

Professor Coorientador: Dr. Antonio Guilherme Basso Pereira.

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco



MARIANA CHIOCHETA BUENO

**OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE COLÁGENO E QUITOSANA COMO BIOMATERIAL PARA
LIBERAÇÃO DE FÁRMACO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 17 de Dezembro de 2021

Prof.a Patricia Teixeira Marques, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marcia Margarete Meier, Doutorado - Fundação Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc)

Prof Reinaldo Yoshio Morita, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 07/02/2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe Lucimara Chiocheta, por todo suporte, amor e carinho em momentos difíceis e desanimadores nessa jornada. A realização desse ciclo não seria possível sem a sua presença. Ao meu companheiro Sullivam, por acreditar em mim e dar apoio em todas as decisões tomadas.

Aos meus orientadores, Professora Dra. Patrícia Teixeira Marques e Professor Dr. Antonio Guilherme Basso Pereira, obrigada por acreditarem em mim, pela paciência e por todos os ensinamentos nesses últimos meses.

Aos que me ajudaram nos laboratórios onde realizei as análises, a central de análises, aos laboratórios de química UTFPR-PB e ao Programa de Pós-graduação de Processos Químicos e Bioquímicos. Este estudo foi financiado em parte pelos recursos próprios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Por fim, aos familiares, amigos e professores que de alguma forma estiveram presentes nessa jornada.

RESUMO

BUENO, Mariana Chiocheta. Obtenção de *scaffolds* a base de colágeno e quitosana como biomaterial para liberação de fármaco. 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Área de conhecimento: Química de Materiais) Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

O presente trabalho visa a utilização de polímeros naturais e biocompatíveis para a obtenção de blendas na forma de *scaffolds* por liofilização. Os polímeros utilizados para a formação das matrizes foram a quitosana, derivado da quitina, e o colágeno extraído a partir do tendão bovino. O fármaco escolhido para testar a capacidade de liberação das matrizes poliméricas foi a ceftriaxona. Avaliou-se as seguintes proporções em massa de colágeno e quitosana: C25:Q75; C50:Q50 e C75:Q25. A interação química entre os componentes para todas as amostras foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. A adição de quitosana alterou as propriedades morfológicas na matriz polimérica, observadas através do MEV, e aumentou a porcentagem de porosidade, que ficou entre 89 a 91 %. O diâmetro de poros medido ficou entre 0,085 a 0,065 mm, acima do valor mínimo para a fixação celular. No estudo cinético, a amostra C25:Q75F, nos solventes água Mili-Q e PBS, mostrou menor taxa de liberação em 24 horas. Para o teste de atividade hemolítica, os biomateriais não apresentaram caráter tóxico para as células sanguíneas. As amostras C75:Q25 e C75:Q25F apresentaram valores de porcentagem de hemólise inferiores a 5%, o que está dentro dos limites aceitáveis para aplicação na engenharia de tecidos. No ensaio biológico o halo de inibição esteve presente nas matrizes poliméricas incorporadas com ceftriaxona.

Palavras-chave: Blendas poliméricas. Biocompatibilidade. Liberação de fármacos.

ABSTRACT

Bueno, Mariana Chiocheta (Obtaining collagen and chitosan-based *scaffolds* as a biomaterial for drug release. 2021. 71 f. Thesis (Master's degree in Chemical and Biochemical Process Technology. Area of knowledge: Materials Chemistry) Graduate Program in Chemical and Biochemical Process Technology, Federal Technological University of Paraná. White Duck, 2021.

The present work aims at the use of natural and biocompatible polymers to obtain blends in the form of scaffolds by lyophilization. The polymers used to form the matrices were chitosan, derived from chitin, and collagen extracted from bovine tendon. The drug chosen to test the release capacity of polymeric matrices was ceftriaxone. The following collagen and chitosan mass ratios were evaluated: C25:Q75; C50Q50 and C75:Q25. The chemical interaction between the components for all samples was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy. The addition of chitosan changed the morphological properties in the polymer matrix, observed through SEM, and increased the percentage of porosity, which was between 89 and 91%. The pore diameter measured was between 0.085 and 0.065 mm, above the minimum value for cell fixation. In the kinetic study, the C25:Q75F sample, in Mili-Q water and PBS solvents, showed a lower release rate in 24 hours. For the hemolytic activity test, the biomaterials were not toxic to blood cells. Samples C75:Q25 and C75:Q25F had hemolysis percentage values less than 5%, which is within acceptable limits for tissue engineering applications. In the biological assay, the inhibition halo was present in polymer matrices incorporated with ceftriaxone.

Keywords: Polymer blends. Biocompatibility. Drug release.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Biomaterial	14
3.2 Colágeno	15
3.3 Quitosana	18
3.4 Blenda Colágeno/Quitosana	21
3.5 Liberação de fármacos	24
3.6 Ceftriaxona dissódica	27
4 MÉTODOS	29
4.1 Extração de Colágeno	29
4.2 Preparação e Caracterização de <i>scaffolds</i> de Colágeno/Quitosana	30
4.3 Avaliação da porosidade dos biomateriais	31
4.4 Incorporação e avaliação da liberação do fármaco	31
4.5 Atividade Antimicrobiana - Halo de Inibição	34
4.6 Ensaio de Hemólise	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Extração de colágeno	38
5.2 Caracterização morfológica e espectroscópica das blendas liofilizadas	39
5.3 Estudo da porosidade dos biomateriais	49
5.4 Liberação do fármaco	50
5.5 Halo de inibição	57
5.6 Atividade hemolítica	60
6 CONCLUSÃO	62
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
8 REFERÊNCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) hélice secundária esquerda e estrutura tripla hélice terciária direita e (c) estrutura quaternária escalonada. Fonte: (FRIESS, 1997) 16
- Figura 2: Fontes de extração, estrutura química e aplicação da quitosana. Fonte: Criado com Biorender. 19
- Figura 3: Estrutura química da quitina. Fonte: (CROISIER; JÉRÔME, 2013). 19
- Figura 4: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrado por métodos convencionais de multidose (a) e sistema de liberação controlada (b). Fonte: (LYRA et al., 2007). 25
- Figura 5: Estrutura química geral dos antibióticos cefalosporinas. Fonte: (EL-SHABOURY et al., 2007). 28
- Figura 6: Estrutura química do antibiótico ceftriaxona. Fonte: (EL-SHABOURY et al., 2007). 29
- Figura 7: Etapas que envolvem a extração do colágeno em meio ácido a partir do tendão bovino até a liofilização do mesmo. Fonte: Criado com BioRender. 30
- Figura 8: Representação da obtenção de blendas poliméricas de colágeno e quitosana em ácido acético. Fonte: Criado com BioRender. 31
- Figura 9: Curvas de calibração do fármaco ceftriaxona em Mili-Q e PBS (pH 7,4). Fonte: Autor. 33
- Figura 10: Representação simplificada da liberação in vitro do fármaco ceftriaxona. Fonte: Criado com BioRender. 33
- Figura 11: Halo de inibição após o tratamento com o software ImageJ. Fonte: Autor. 35
- Figura 12: Separação eritrócitos e plasma após a centrifugação. Fonte: Autor. 36
- Figura 13: Controles positivo (Triton X-100) e negativo (PB) para hemólise. Fonte: Autor. 37
- Figura 14: Obtenção de colágeno. Fonte: Autor. 38
- Figura 15: Espectroscopia ATR-FTIR do colágeno puro extraído a partir do tendão bovino. Fonte: Autor. 39

Figura 16: Fotografias das blendas poliméricas de colágeno e quitosana obtidas por liofilização. Fonte: Autor.	40
Figura 17: Micrografias dos biomateriais poliméricos, ampliação de 250 mil vezes. Fonte: Autor.	41
Figura 18: Valor médio do diâmetro dos poros obtido a partir de 9 medidas individuais com o auxílio do software ImageJ. Fonte: Autor.	41
Figura 19: Espectroscopia ATR-FTIR dos polímeros puros e das blendas poliméricas. Fonte: Autor.	43
Figura 20: Micrografias dos biomateriais incorporados in situ com ceftriaxona. Fonte: Autor.	46
Figura 21: Espectroscopia ATR-FTIR dos polímeros puros e das blendas poliméricas incorporadas com fármaco. Fonte: Autor.	48
Figura 22: Avaliação da porosidade dos biomateriais em diferentes proporções de colágeno e quitosana (letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova). Fonte: Autor.	49
Figura 23: Curvas de liberação do fármaco a partir das diferentes proporções de colágeno e quitosana em água Mili-Q e PBS. Fonte: Autor.	51
Figura 24: Avaliação da estabilidade do fármaco ceftriaxona em PBS e Mili-Q. Fonte: Autor.	55
Figura 25: Possíveis intermediários provenientes da degradação do fármaco ceftriaxona em diferentes vias. Fonte: (ABRAMOVIĆ et al., 2021).	56
Figura 26: Amostras frente à <i>S. aureus</i> no teste de halo de inibição . Fonte: Autor.	59
Figura 27: Atividade hemolítica das amostras comparadas com as matrizes poliméricas puras, com o controle negativo (PB) e o controle positivo (Triton-X) (letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova). Fonte: Autor.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Adequação do modelo teórico aos dados experimentais com a diferença entre as bandas de amida I (ν_I) e a amida II (ν_{II}) ($\Delta\nu$) em blendas de colágeno/quitosana.	44
Tabela 2: Bandas de absorção do antibiótico ceftriaxona. Fonte: Adaptado de (EL-SHABOURY et al., 2007).	46
Tabela 3: Obtenção da constante cinética (k) e o expoente difusional (n) a partir da adequação dos dados experimentais ao modelo de Korsmeyer–Peppas. Fonte: Autor.	51
Tabela 4: Coeficiente de correlação (r^2) nas etapas I e II para ordens de reação primarias 0, 1 e 2. Fonte: Autor.	52
Tabela 5: Halo de inibição frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> estimados a partir da figura 25. Fonte: Autor.	57
Tabela 6: Porcentagem de hemólise dos biomateriais comparadas ao controle positivo (triton X-100) e negativo (PB). Fonte: Autor.	60

1 INTRODUÇÃO

A substituição artificial de tecidos danificados e doentes constitui uma promissora via de pesquisa na engenharia de tecidos, engenharia imunológica e sistemas de administração de medicamentos. Esses campos multidisciplinares visam a regeneração de tecidos através do uso de biomateriais. O progresso de biomateriais inteligentes e responsivos a sinais bioelétricos, semelhante ao tecido celular nativo, está em amplo desenvolvimento no mercado. Estima-se que o mercado global de biomateriais irá atingir US\$ 348,4 bilhões até 2027 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020).

Biomateriais poliméricos tem a finalidade de auxiliar a regeneração de estruturas tridimensionais de tecidos e órgãos, são ótimos candidatos para o desenvolvimento de dispositivos terapêuticos, como curativos para cicatrização de feridas, próteses temporárias, estruturas porosas tridimensionais utilizadas como *scaffolds* (suportes para crescimento celular) no ramo da engenharia de tecidos, bem como, para sistemas de administração de medicamentos. A escolha de um biomaterial segue parâmetros específicos, regido por propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas, biocompatibilidade, toxicidade e de degradação para fornecer terapia adequada aos requisitos de cada aplicação médica individual (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Diferentes técnicas de obtenção podem ser aplicadas para produzir materiais poliméricos como, por exemplo, a eletrofiação, a evaporação de solvente (casting) e a liofilização. Esses processos são de grande interesse devido a metodologia simples, reprodutibilidade e de fácil manipulação, além da viabilidade de produzir diversos materiais, como nanofibras, blendas com elevada porosidade a partir de polímeros naturais e sintéticos.

O colágeno e a quitosana (derivado da quitina) são polímeros naturais e ambos possuem propriedades características que fornecem uma estrutura de *scaffold* promissora no ramo médico, fornecendo propriedades funcionais e mecânicas únicas. Podem ser desenvolvidos em diferentes formas, como curativos, esponjas, espumas, filmes, géis, matrizes nanofibras, membranas e materiais para entrega de medicamentos (GUO et al., 2019; PEREZ-PUYANA et al., 2019; SIN MUN et al., 2019).

Sistemas de liberação para entrega de medicamentos a partir de biomateriais oferecem vantagens comparadas aos métodos convencionais mais comuns como via oral e tópica. Diminuindo o tempo de permanência de circulação do medicamento na corrente sanguínea no organismo em nível efetivo e não tóxico. O fármaco ingerido pelo método convencional pode matar outras bactérias não patogênicas presentes no corpo, ao contrário da liberação a partir dos biomateriais, pois a droga situa-se no local lesionado (UHRICH et al., 1999).

O propósito geral de um biomaterial é auxiliar na restauração ou substituição de tecidos e órgãos danificados. As blendas poliméricas a base de colágeno e quitosana obtidas por evaporação de solvente, eletrofiação e liofilização são viáveis para aplicações como dispositivos de liberação lenta.

Dentre os fármacos de interesse para a incorporação em *scaffolds* e fibras, destaca-se a ceftriaxona (cfx), antibiótico utilizado para tratar infecções contra um amplo espectro de bactérias fatais gram-positivas e gram-negativas. Este medicamento é considerado eficaz contra várias doenças microbianas, é indicado para tratar meningite, pneumonia, doenças inflamatórias, infecções na articulação, ouvidos, osso, pele e trato urinário (EBRAHIMI et al., 2020; KUMAR et al., 2016).

Neste sentido, este estudo tem como obter *scaffolds* a base de colágeno e quitosana, e investigar a viabilidade do biomaterial para liberação do agente ativo ceftriaxona, com a pretensão de um biomaterial para o ramo biomédico biocompatível e bioativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver e caracterizar biomateriais na forma de scaffolds a base de colágeno e quitosana para liberação de ceftriaxona.

2.2 Objetivos específicos

- Obter dispositivos porosos por liofilização da blenda colágeno:quitosana em diferentes composições;
- Caracterizar quimicamente as matrizes poliméricas por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Quantificar a incorporação e liberação da ceftriaxona dos biomateriais;
- Classificar o perfil de liberação do agente ativo por meio de curvas de fração cumulativa de massa liberada em função do tempo;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a atividade hemolítica para confirmar a biocompatibilidade do biomaterial.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biomaterial

Segundo Willians (2009), biomaterial é definido como qualquer substância ou conjunto de substâncias, de origem natural ou sintética, que possam ser usados por um período de tempo, como um todo ou como parte em sistemas que aumentam, tratam ou substituam quaisquer funções do corpo, órgãos ou tecidos. Na contribuição com a área médica, estes materiais foram introduzidos em contato com o sangue, no planejamento de substituir tecidos duros e moles, como adesivos e materiais dentários (PEPPAS; LANGER, 1994). Os biomateriais foram empregados para contribuir e acelerar fenômenos naturais, como a regeneração de tecidos e na cicatrização de feridas (HUBBELL, 1995).

Vários procedimentos cirúrgicos são realizados para reparar ou substituir tecidos danificados por doenças ou traumas. O ramo da engenharia de tecidos desenvolve modelos para auxiliar na regeneração e orientar o crescimento de novos tecidos. Um desses modelos é combinar células do corpo com *scaffolds*, um biomaterial altamente poroso que serve como suporte para ancoramento e crescimento celular. Os poros existentes neste biomaterial desempenham um papel significativo no transporte de nutrientes, oxigênio e infiltração celular (O'BRIEN, (2011); SATISH KUMAR; VIJAYA RAMU; SAMPATH KUMAR, (2019)).

Matrizes porosas, designadas *scaffolds*, estão sendo investigadas para aplicações biomédicas no ramo da engenharia de tecidos para implante bem como para curativo de ferida. Com o intuito de uma interação satisfatória entre biopolímero e o sistema biológico, o *scaffold* deve simular as funções da matriz extracelular (ECM), promovendo a adesão e a proliferação celular. Várias considerações devem ser feitas para um *scaffold* se adequar aos requisitos de regenerar diferentes tecidos e órgãos, como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, as propriedades mecânicas e a arquitetura do *scaffold* (Jennings; Bumgardner, 2016).

Materiais biológicos como colágeno, e substratos à base de quitosana, foram utilizados na produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Os polímeros naturais são biologicamente ativos podendo promover excelente adesão e crescimento celular. Além disso, eles também são biodegradáveis e permitem que as células hospedeiras produzam sua própria matriz extracelular. (O'BRIEN, 2011).

3.2 Colágeno

O colágeno pertence à classe de proteínas mais presente distribuída no corpo humano, constitui cerca de 30% da matéria orgânica do corpo dos animais, e 60% das proteínas totais do corpo (SATISH KUMAR; VIJAYA RAMU; SAMPATH KUMAR, 2019). É uma proteína sintetizada por células do tecido conjuntivo denominadas fibroblastos. Vários tipos de colágeno foram caracterizados, e as diferentes formas tem designações a partir de números romanos que vão do I até ao XXIX. Todos exibem uma estrutura característica de tripla hélice, com três subunidades polipeptídicas conhecidas em comum como cadeias α , e cada cadeia consiste em mais de mil aminoácidos. Tais cadeias polipeptídicas estão organizadas paralelamente contendo aminoácidos como, alanina, hidroxiprolina, hidroxilisina, lisina e prolina (SATISH KUMAR; VIJAYA RAMU; SAMPATH KUMAR, 2019, CRISTINA, 2013, PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

A complexidade estrutural da molécula de colágeno é observada na Figura 1. As cadeias α combinam-se para formar hélices. O tecido conjuntivo é constituído de três cadeias polipeptídicas, duas cadeias iguais, α_1 , e uma cadeia α_2 . Essas cadeias se entrelaçam por ligações de hidrogênio para formar uma estrutura de hélice tripla, também conhecida como tropocolágeno (CRISTINA, 2013, ME NIMNI, 1988) .

Para analisar a estrutura química e hierárquica, diversificada e complexa do colágeno, é necessário considerar um conjunto de técnicas (Espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), Ângulo de contato, etc) que forneçam informações como: detalhes estruturais, pureza e conteúdo helicoidal (ABRAHAM et al., 2008).

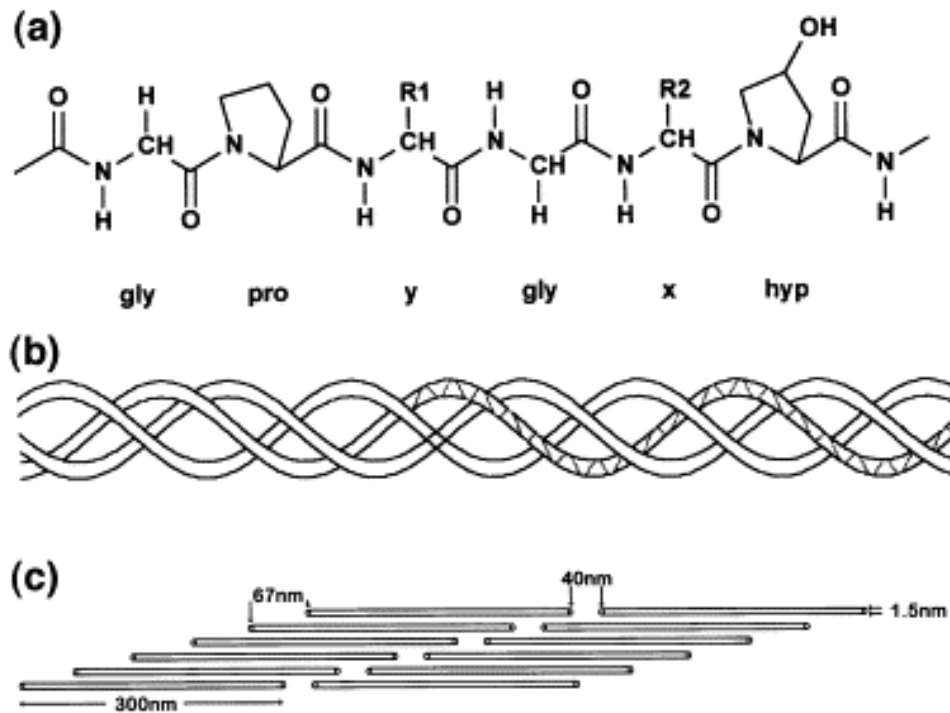


Figura 1: Estrutura química do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) hélice secundária esquerda e estrutura tripla hélice terciária direita e (c) estrutura quaternária escalonada. Fonte: (FRIESS, 1997)

No campo da engenharia de tecidos, matrizes de colágeno utilizadas na forma de fibras, filmes e revestimentos possuem uma ampla aplicação biotecnológica como biomateriais, por ser um polímero natural biocompatível e bioativo. O colágeno é a biomolécula mais estudada da matriz extracelular devido a sua presença em todo tecido conjuntivo, que deriva de características como a força mecânica e a ativação da coagulação sanguínea. Com o intuito de melhorar a função tecidual, as aplicações do colágeno como um biomaterial enfocam os aspectos capazes de estimular a resposta celular por entregas de proteínas ou o crescimento celular (FRIESS, 1997, BARNES; KNIGHT; FARNDAL, 1998).

O colágeno pode ser extraído de várias fontes, as mais usuais incluem a pele bovina e tendões, em meio ácido, alcalino ou enzimático. Aproximadamente 2 % do colágeno tecidual é solúvel em meio ácido. Os 98 % restantes são classificados como colágeno insolúvel. No entanto, esse material insolúvel pode ser solubilizado sem trazer danos a estrutura de tripla hélice. Uma abordagem comum é a adição de enzimas para dissolver ou suspender as estruturas insolúveis em ácido (K.A Piez; A.H Reddi, 1984).

O tecido natural do tendão consiste em uma estrutura graduada de fibrilas e fibras de colágeno. A possibilidade de melhorar as propriedades de

biocompatibilidade incorporando em sua estrutura fármacos para o tratamento de infecções, proporcionam um ambiente adequado para as células, tendo potencial de apresentar ótimas propriedades mecânicas (VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002).

Vários tipos de colágeno proporcionam características biológicas diferentes aos tipos de tecidos conjuntivos do corpo. O colágeno mais usado na produção de biomateriais é do tipo I, que são formadores de fibrilas (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

O colágeno representa uma matriz promissora para entrega de drogas em locais específicos devido a sua não toxicidade e sua degradabilidade. Formulações farmacêuticas contendo colágeno são investigadas para incorporar agentes ativos com baixa massa molecular, como antibióticos e carcinostáticos. As principais abordagens clínicas desenvolvidas são no tratamento profilático de ossos e tecidos moles, na oftalmologia, na ortodontia e na cicatrização de feridas (FUJIOKA, 1998, RUSZCZAK; FRIESS, 2003).

Gautieri et al., (2012) investigou as propriedades viscoelásticas de moléculas de colágeno e de fibrilas. Como resultado, as moléculas individuais de colágeno exibiram um comportamento viscoelástico não linear, uma vez que o módulo de Young depende da carga externa. Seu teste de modelagem foi baseado em um peptídeo modelo contendo glicina-prolina-hidroxiprolina, esperando que o colágeno natural apresentasse uma sequência primária mais variada, exibindo diferentes propriedades viscoelásticas referente ao modelo peptídico. Relatou-se que a viscosidade de uma única molécula é muito menor do que a viscosidade encontrada nas fibrilas individuais de colágeno, sugerindo que o comportamento viscoso de fibrilas de colágeno e as fibras envolvem mecanismos adicionais, como deslizamento molecular entre as moléculas de colágeno dentro da fibrila ou o efeito de relaxamento de maiores volumes de solvente. Com base nesses resultados da modelagem peptídica, foi proposto um modelo estrutural que descreve o tecido colagenoso como uma estrutura governante, fornecendo uma descrição ascendente em que as propriedades elásticas e viscosas formam as propriedades básicas de construção dos tecidos.

Yang et al., (2008) estuda as propriedades mecânicas de fibras de colágeno de tipo I a partir da eletrofiação. Essas propriedades foram investigadas por testes de flexão micromecânica no modo varredura. O teste observou que o elevado grau

de alinhamento nas moléculas de colágeno pode explicar os módulos de flexão observados semelhantes aos das fibrilas de colágeno nativas.

Biomateriais contendo misturas poliméricas tem sido amplamente utilizado nos ramos farmacêutico e médico. Um aspecto importante é a miscibilidade nas misturas desses polímeros, as quais ocorrem por interações intermoleculares como, por exemplo, ligações de hidrogênio, iônicas e dipolo. As blendas formadas a partir de colágeno e quitosana interagem entre si formando um complexo seja por meio de interações puramente eletrostáticas ou por ligação de hidrogênio (SIONKOWSKA et al., 2004). As misturas de colágeno e quitosana podem ser preparadas por reticulação, eletrofiliação e liofilização. Essas misturas podem aumentar a biocompatibilidade e as funções dos biomateriais (TARAVEL; DOMARD, 1993, 1995, 1996).

3.3 Quitosana

Derivado da quitina, a quitosana é um biopolímero natural, que apresenta notáveis propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade. É o principal componente do exoesqueleto de crustáceos (exemplos: Casca de camarões, caranguejos, lagostas e siris). Também é encontrada em cutículas de insetos, moluscos, nas algas verdes e na parede celular de fungos e leveduras (KUMAR et al., 2004).

A quitosana é um polissacarídeo semi-cristalino composto por (1 → 4) -2-acetamido-2-desoxi-β- D- glucano (*N*- acetil D- glucosamina) e (1 → 4) -2-amino-2-desoxi-β- D -glucano (D unidades-glucosamina), representada na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017). A quitosana pode ser derivada da desacetilação parcial da quitina (grupos acetil removidos dos grupos acetamino, formando aminas) (Figura 3).

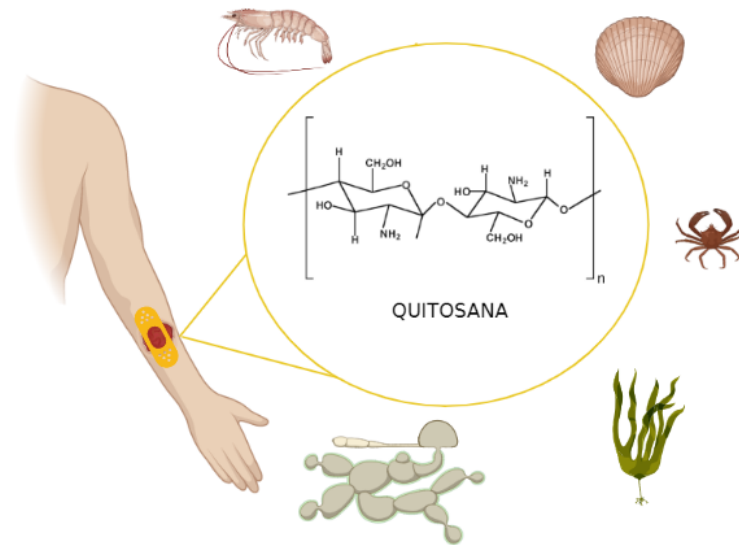


Figura 2: Fontes de extração, estrutura química e aplicação da quitosana. Fonte: Criado com Biorender.

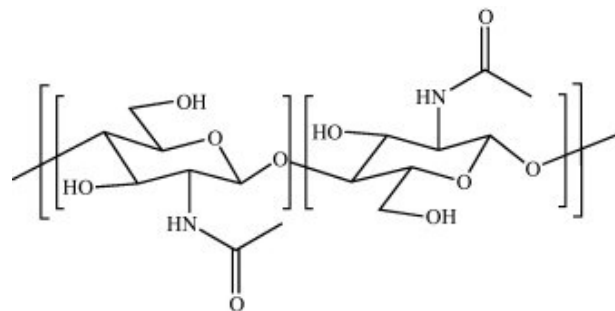


Figura 3: Estrutura química da quitina. Fonte: (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

A quitosana apresenta várias propriedades funcionais, sua alta biodegradabilidade, não toxicidade e atividade antimicrobiana são algumas delas. Vários fatores influenciam na viscosidade da quitosana em solução. Como, o grau de desacetilação do polímero, peso molecular, concentração, força iônica, pH e temperatura. Em geral a viscosidade da solução diminui com o aumento da temperatura, podendo acarretar uma mudança de pH na solução de polímero, dependendo do tipo de ácido utilizado. A viscosidade da quitosana tende a aumentar com a diminuição do pH em ácido acético, já em ácido clorídrico (HCl) a viscosidade diminui quando o pH é reduzido, a explicação desse comportamento é a dependência da constante de dissociação do ácido (pK) e concentração de quitosana para solubilizar este polímero (DOS SANTOS ALVES, 2008). Além disso, a quitosana é insolúvel em água e solventes orgânicos e solúvel em ácidos

orgânicos quando o pH da solução é menor que 6. Exemplos de ácidos utilizados na dissolução da quitosana são o acético, fórmico e alguns ácidos inorgânicos diluídos, como o ácido nítrico, ácido clorídrico, o ácido perclórico (LI et al., 1992).

O grau de desacetilação do polissacarídeo determina a diferença entre a quitina e a quitosana. Para ser nominada “quitosana”, a quitina deve apresentar um grau de desacetilação 60, ou seja, deve conter pelo menos 60 % dos resíduos D-glucosamina (ACOSTA et al., 1993). Isto influencia na solubilidade da estrutura, tornando-a mais solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos inorgânicos e orgânicos. Essa solubilidade ocorre devido a presença dos grupos amino (-NH₂) dos resíduos D-glucosamina na estrutura da quitosana que a transformam em um polieletrólito catiônico hidrossolúvel, esses grupos podem ser protonados, possibilitando a solubilidade em soluções ácidas (pH < 6), (LEEDY et al., 2011). A reação de equilíbrio que descreve a ionização da quitosana: $\text{QuitosanaNH}_2 + \text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{QuitosanaNH}_3^+ + \text{H}_2\text{O}$. A desacetilação da quitina é conduzida em condições alcalinas severas ou por hidrólise enzimática na presença de enzimas, como desacetilase (JAYAKUMAR et al., 2010).

A quitosana como biomaterial oferece propriedades notáveis para o desenvolvimento de materiais para aplicação biomédica. Alguns exemplos são o efeito analgésico, mucoadesão, bioadesividade, atividade hemostática, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade (OKAMOTO et al., 2002, PARK et al., 2004, SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992). Também estimula a migração e proliferação celular. Ela promove a cicatrização de feridas, melhorando funções de fibroplastos (células constituintes do tecido conjuntivo) e células inflamatórias (REZAI; ORYAN; JAVERI, 2019)

Este biopolímero pode ser projetado em diferentes formas e arquiteturas devido a sua excelente habilidade em ser preparado, resultando em estruturas porosas, como esponjas, microesferas, membranas, nanopartículas e *scaffolds*. Incluindo a utilização como curativos, lentes de contato e sistemas de liberação lenta (DENKBAS; OTTENBRITE, 2006).

O uso de um curativo à base de quitosana para a cicatrização de ferimentos tem respondido positivamente. Curativos contendo quitosana tem apresentado excelente permeabilidade ao oxigênio, controle de perda de água, absorção de exsudatos das lesões, proteção contra agente infecciosos, atuando no controle a

hemorragia e influenciando para uma cinética mais rápida na cicatrização de feridas (BROWN; DAYA; WORLEY, (2009); PEREZ-PUYANA et al., (2019)). Em experimentos com animais e humanos, a quitosana influenciou em estágios para a cicatrização dos tecidos, bem como a diminuição no tempo de tratamento (MUZZARELLI, 2009).

Altiok et al., (2010) estudaram as propriedades antimicrobiana e antioxidante de filmes a base de quitosana incorporados com óleo de tomilho, com o intuito de um possível biomaterial para a cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que a concentração mínima de óleo essencial de tomilho, 1,2 % (v/v), impede o crescimento de todos os microrganismos selecionados, em meios gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) e um microrganismo gram-positivo de *Staphylococcus aureus*. O teste antimicrobiano simulou o pior cenário em que o número de microrganismos é muito maior do que aquele encontrado na superfície de feridas. Portanto, o biomaterial é promissor nestas condições severas.

Para além das várias características relevantes e atrativas encontradas nas matrizes de quitosana, é possível melhorar ainda mais o seu desempenho incorporando compostos farmacêuticos e outras moléculas bioativas.

3.4 Blenda Colágeno/Quitosana

As blendas poliméricas podem ser definidas como uma preparação de uma mistura a partir da interação física de dois ou mais polímeros estruturalmente distintos, com a vantagem de fornecer propriedades diferentes em comparação aos polímeros puros (PAKRAVAN; HEUZEY; AJJI, 2011). O sinergismo do colágeno com a quitosana apresentam melhores propriedades mecânicas e morfológicas do que seus sistemas unitários, embora exista uma proporção ideal desses biopolímeros (50:50) (PEREZ-PUYANA et al., 2019). O colágeno isolado apresenta pouca resistência mecânica e rápida biodegradabilidade. A adição de quitosana aumenta a biocompatibilidade e estabilidade, fornecendo uma estrutura adequada para a proliferação celular (C TANGSADTHAKUN, 2006). Além de reduzir o grau de intumescimento de filmes e estruturas porosas, permitindo controlar fatores do

crescimento epidérmico se forem aplicados como curativos cutâneos (ANDONEGI et al., 2020).

O ideal de biomateriais como esponjas e *scaffolds* é a característica por apresentar grande ou alto volume de poros, 88-95 %, para auxiliar no reparo de tecidos (ADEKOGBE; GHANEM, 2005; VALENZUELA-ROJO et al., 2020). Essa propriedade permite a migração e a proliferação celular pelo *scaffold*, além de permitir a entrada de nutrientes. A micrografia eletrônica de varredura (MEV) apresentado por Alagha et al.,(2020), mostrou que a adição de quitosana ao colágeno (50:50) aumentou o tamanho dos poros de 56 para 96 μm .

Taravel et al., (1996) relataram que a presença de apenas 10% de quitosana em um sistema puramente eletrostático aumenta as propriedades elásticas de blendas a base de colágeno e quitosana. Esse comportamento está em boa concordância com o modelo de encapsulamento de microgéis de colágeno por quitosana propostos pela literatura (TARAVEL; DOMARD, 1993, 1995).

A adição de quitosana ao colágeno em meio ácido leva à formação de ligações eletrostáticas e de hidrogênio entre os amino protonados da quitosana e os grupos carboxílicos de colágeno (ALAGHA; NOURALLAH; HARIRI, 2020). Ao preparar blendas poliméricas de colágeno/quitosana a partir de soluções com baixo valor de pH, aproximadamente 3,5, os grupos $-\text{NH}_2^+$ da quitosana encontram-se protonados e o pH do colágeno localiza-se abaixo do seu ponto isoelétrico, na faixa de 6,5 a 8,5, onde é mais acentuado o processo de fibrilogênese (desenvolvimento de fibrilas finas normalmente presentes nas fibras de colágeno do tecido conjuntivo). Qualquer desvio deste pH (ou seja, mudança do ponto isoelétrico) pode provocar intumescimento (TONHI; DE GUZZI PLEPIS, 2002).

Os grupos laterais formadores das fibrilas do colágeno, como a hidroxila (-OH) da hidroxiprolina, formam ligações de hidrogênio com os grupos $-\text{OH}$ e amina ($-\text{NH}_2$) da quitosana. Além disso, os grupos de ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) e $-\text{NH}_2$ do colágeno podem formar ligações de hidrogênio com $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ da quitosana. Pelo fato da quitosana possuir em sua estrutura um grande número de hidroxilas, a sua longa cadeia enrola-se em torno da hélice tripla do colágeno, resultando no emaranhamento de duas macromoléculas e formando um novo complexo com alta viscosidade, comparado aos componentes puros (SIONKOWSKA et al., 2004).

Estudos de Sionkowska et al., (2004) evidenciaram que as análises de FTIR apontam para a formação de novas ressonâncias que não podem ser esclarecidas

em uma mistura simples. Índícios mostraram que misturas de colágeno-quitosana são homogêneas interagindo a nível molecular, resultando em novas ligações de hidrogênio, formando um novo complexo poliânion/policátion, sucedendo em novas propriedades físicas. Dados de FTIR apresentados por Kumar et al., (2019) e Andoneginet al., (2020), revelam que a adição de quitosana não altera a estrutura helicoidal do colágeno, mostrando que a integridade estrutural dos polímeros é mantida.

O complexo colágeno-quitosana pode ser usado para imitar os componentes da matriz extracelular nativa. Tangsadthakun et al, (2006) discutem a proliferação de fibroplastos por meio de *scaffolds* contendo colágeno-quitosana. Este biomaterial com 30 % de quitosana é eficaz para promover a regeneração de células L929. Essa mistura é promissora como um novo material para a engenharia de tecidos da pele.

Wang et al., (2003) investigaram matrizes compostas de quitosana e colágeno para regeneração do fígado. As análises mostraram resultados favoráveis, apresentando moderada resistência mecânica, ótima compatibilidade sanguínea e boa compatibilidade com hepatócitos (células encontradas no fígado capazes de sintetizar proteínas) tornando um biomaterial auspicioso para fígados artificiais.

Kumar et al., (2019) estudaram o intumescimento e a adsorção de proteínas de *scaffolds* compostos por colágeno e quitosana em proporção 7:3. Biomateriais com maior grau de intumescimento adquirem maior área superficial, permitindo enorme viabilidade para a proliferação celular. Entretanto, o fenômeno de inchamento de uma matriz polimérica pode resultar na diminuição das propriedades mecânicas. A propriedade de adsorção de proteínas influencia na adesão de células (TELI; SHEIKH, 2012). Os resultados da pesquisa de Kumar et al., (2019) mostraram que os efeitos da forte interação destes polímeros resultaram na minimização da capacidade de inchamento do *scaffold* e a fusão do colágeno com a quitosana mostra melhoras na adsorção de proteínas comparados aos polímeros puros. Mostrando-se favorável para a aplicação biomédica.

A obtenção de blendas poliméricas para aplicação como biomateriais devem apresentar elevada porosidade, essa propriedade permite a migração e a proliferação celular na matriz polimérica e são afetadas pelo tamanho médio dos poros dos biomateriais. Em média, o diâmetro mínimo de poros necessários para a biocompatibilidade celular são valores acima de 0,05 mm (O'BRIEN, 2011; RAHMAN et al., 2019) .

A liberação do antibiótico sulfato de gentamicina foi estudada a partir de blendas de colágeno e quitosana. Os resultados mostraram que o antibiótico pode ser incorporado durante a preparação da blenda. A cinética de liberação da droga pode ser controlada pela alteração das proporções da massa dos componentes. A maior liberação observada foi com a proporção 75/25 de quitosana e colágeno resultando em uma cinética de primeira ordem (SIONKOWSKA; KACZMAREK; GADZALA-KOPCIUCH, 2016).

Chen et al., (2008) observaram a biocompatibilidade de nanofibras eletrofiadas compostas de colágeno, quitosana (proporção 1/3) e óxido de poli(óxido de etileno) (PEO) 3,5 % (m/m). Em estudos com animais, as nanofibras tiveram um melhor desempenho comparados aos curativos de gaze e esponja comerciais, não apresentando toxicidade para o crescimento de fibroplastos induzindo a cicatrização das camadas da pele.

3.5 Liberação de fármacos

Os sistemas de liberação lenta e prolongada de substâncias ou fármacos tem o intuito de estabelecer uma abordagem terapêutica com uma resposta positiva, minimizando os efeitos colaterais e ação prolongada (KIM et al., 2009).

Os métodos de liberação sustentada, cuja liberação do fármaco é prolongada, requerem uma dosagem menor de medicamento em relação aos métodos convencionais, onde a concentração plasmática do fármaco se eleva e depois diminui (Figura 4 (a)), essas oscilações na corrente sanguínea podem acarretar insuficiência e toxicidade ao organismo. Já no sistema (b), Figura 4, ocorre a liberação controlada, onde a concentração plasmática do fármaco se mantém constante e dentro do nível terapêutico, não apresentando grandes variações ao longo do tempo (LYRA et al., 2007).

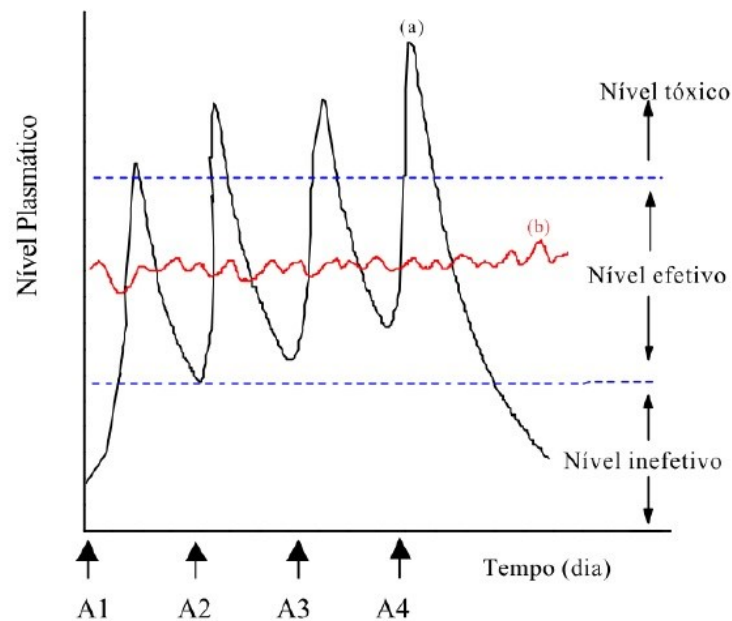


Figura 4: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrado por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b). Fonte: (LYRA et al., 2007).

Diversos polímeros, sejam eles de origem natural ou sintética, podem ser utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos. Polímeros naturais tem a vantagem de ser biodegradáveis, biocompatíveis e são amplamente disponíveis, como por exemplo o colágeno, a celulose, a gelatina e a quitosana. Os polímeros de interesse, no caso o colágeno e a quitosana, tem a aplicabilidade em sistemas de liberação como: curativos, hidrogéis, microencapsulamento, microesferas, filmes, membranas, nanofibras, sistemas oral, gástrico e nasal de liberação. Já polímeros sintéticos apresentam ampla gama de propriedades e variam de acordo com a necessidade de aplicação. Podendo ter desvantagens como alergias e inflamação, apresentando baixa biocompatibilidade (GRUND; BAUER; FISCHER, 2011).

Dentre as formas de liberação, a utilização de sistemas matriciais é viável devido as vantagens como eficácia, baixo custo e versatilidade. Esses mecanismos são divididos em matrizes inertes, insolúveis em água, erodíveis e hidrofílicas. Nesses sistemas, o fármaco pode estar homoganeamente disperso na matriz polimérica e os modos de liberação envolvem processos físicos e químicos, como a difusão das moléculas de fármaco pelos poros da matriz, a erosão polimérica e o intumescimento da matriz através da penetração de água (LYRA et al., 2007).

A modelagem matemática foi designada para analisar os mecanismos de liberação envolvidos nos sistemas de liberação da droga, projetando vários sistemas

com equações que preveem o comportamento geral de liberação (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Higuchi foi o primeiro a postular um modelo matemático para descrever a liberação de medicamentos em diferentes geometrias e matrizes porosas. Utilizado para relatar a cinética de liberação a partir de uma matriz, expressa pela equação 1:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_H \sqrt{t} \quad (1)$$

Onde, M_t/M_0 é a quantia total de fármaco liberada, K_H é constante de liberação de Higuchi e t é o tempo de liberação.

Este modelo é baseado na lei de difusão de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Para fenômenos como intumescimento, o modelo se torna inadequado devido ao relaxamento de matrizes poliméricas. O modelo prevê maior exatidão em sistemas insolúveis que não intumescem (HIGUCHI, 1961).

Outra equação que descreve o comportamento de cinética de liberação de sistemas poliméricos é o modelo de Korsmeyer – Peppas (KP). Esta equação semi-empírica é uma combinação do transporte Fickiano (difusão das moléculas do fármaco) e do transporte não Fickiano (fenômeno de inchamento e relaxamento de uma matriz polimérica), equação 2:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (2)$$

A equação 2 descreve o comportamento geral de liberação de soluto de dispositivos poliméricos, podendo ser usada para descrever os 60% iniciais de fármaco liberados. Onde M_t/M_∞ é a liberação cumulativa da droga no tempo pelo tempo infinito, t é o tempo de liberação, k é a constante cinética e n é o expoente difusional que caracteriza o mecanismo de liberação. (RITGER; PEPPAS, 1987a)

Em sistemas poliméricos, usualmente quando o valor do expoente n é igual ou inferior a 0,5, o mecanismo que domina a liberação é a difusão Fickiana. Valores

entre $0,5 < n < 0,9$ são considerados mecanismos de transporte de drogas não-fickiano, ou seja, ocorre a difusão e intumescimento simultaneamente e $n > 0,9$ é considerado como transporte do tipo II (contribuição relaxante) (RITGER; PEPPAS, 1987b).

O modelo da equação de Peppas e Sahlin foi proposto para quantificar os fenômenos de difusão e relaxamento (equação 3). Este modelo está ligado ao modelo KP, fornecendo informações complementares aos mecanismos de liberação (PEPPAS; SAHLIN, 1989). Onde m é o expoente difusional e k_1 e k_2 são constantes que refletem o fenômeno de relaxamento e difusão.

$$\frac{M_t}{M_0} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (3)$$

A fim de melhorar esses sistemas, a escolha do agente ativo e do mecanismo de liberação é de extrema importância, garantindo que o fármaco seja liberado ao longo do tempo, na dosagem e região corretas, de acordo com as propriedades do medicamento, como hidrofobicidade e sua bioatividade.

3.6 Ceftriaxona dissódica

O fármaco cfx é classificado como cefalosporina de terceira geração. Genericamente, a estrutura química da cefalosporina apresenta um anel aromático β -lactâmico de quatro membros unidos a um anel de diidroxiacina, figura 5.

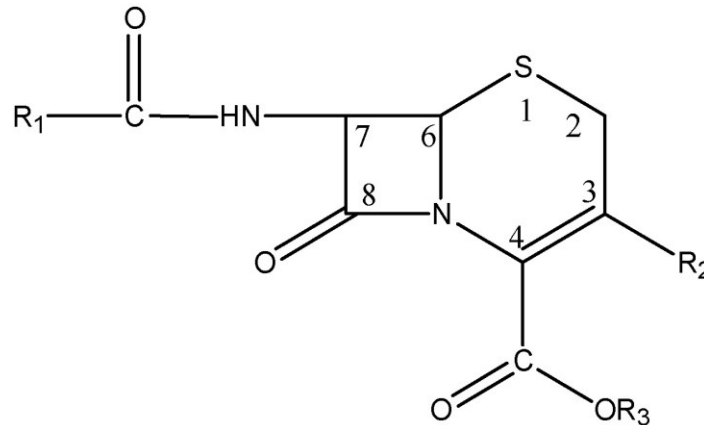


Figura 5: Estrutura química geral dos antibióticos cefalosporinas. Fonte: (EL-SHABOURY et al., 2007).

Os substituintes como, C3, C4 e C7 presentes na molécula influenciam em fatores como a sua atividade biológica. No C3, alterações causam mudanças na farmacocinética do fármaco. A hidrofobicidade ou hidrofobicidade da cefalosporina é dependente de mudanças no C7, o ácido carboxílico presente no C4 não pode ser substituído. Deste modo, as posições representadas por R1, R2 e R3, figura 6, podem ser alteradas e dão origem as diferentes gerações das cefalosporinas. São divididas em agentes de primeira, segunda, terceira e quarta geração, com base em suas propriedades antimicrobianas. O fármaco de interesse, cfx, é uma cefalosporina de terceira geração atuando contra bactérias gram-positivas e negativas, é um antibiótico de uso hospitalar utilizado para tratar infecções bacterianas mais severas, sua estrutura está exemplificada na figura 6 (EBRAHIMI et al., 2020; EL-SHABOURY et al., 2007).

Segundo a ABL (Antibióticos do Brasil Ltda), a única incompatibilidade da cfx é em diluentes que apresentam cálcio, como as soluções de ringer ou hartmann, pois pode ocorrer a formação de precipitado. Estudos mostraram resultados satisfatórios utilizando a ceftriaxona sódica a partir de nanocarreadores e hidrogéis como sistemas para a liberação lenta de fármacos (EBRAHIMI et al., 2020; HUSSAIN et al., 2021; KUMAR et al., 2016).

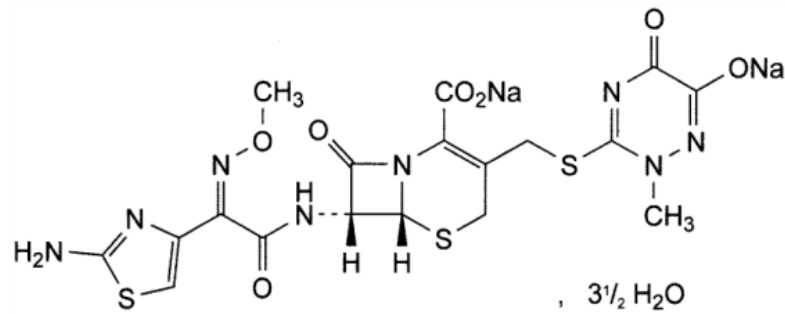


Figura 6: Estrutura química do antibiótico ceftriaxona. Fonte: (EL-SHABOURY et al., 2007).

4 MÉTODOS

4.1 Extração e caracterização do colágeno

O tendão bovino foi limpo, liofilizado e desfiado, aumentando a superfície de contato entre tendão e solução. 10 g de tendão bovino foram imersos em 500 mL de uma solução de ácido acético $3,5 \text{ g L}^{-1}$ contendo 5 g L^{-1} de pepsina. O sistema permaneceu sob agitação a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. Após 48 h, a solução foi filtrada, o precipitado foi descartado e no sobrenadante adicionou-se 500 mL de NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, sendo possível observar a precipitação do colágeno. O precipitado foi centrifugado à 3500 rpm por 45 minutos, metodologia adaptada de De Castro et al., 2014. Para purificação, o colágeno foi dialisado com membrana de celulose (Inlab com *cut-off* de peso molecular de 12.000-16.000) em tampão fosfato (PBS) e água ultrapura durante 72 h (12 h cada) à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a purificação, o colágeno foi liofilizado. A figura 7 ilustra as etapas descritas acima até o processo de liofilização. A caracterização espectroscópica no infravermelho (FTIR-ATR), dos materiais obtidos, foi realizada com equipamento modelo *Perkin Elmer Frontier*, e os espectros obtidos na faixa de comprimento de onda de $1000 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$. A análise morfológica foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca *Hitachi*, modelo 3000.

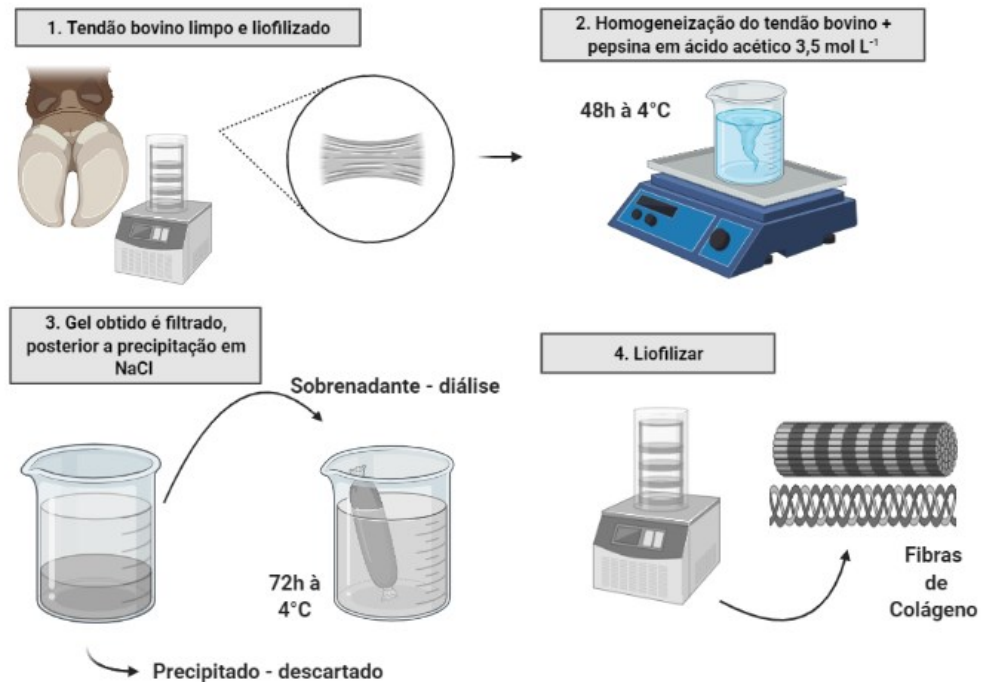


Figura 7: Etapas que envolvem a extração do colágeno em meio ácido a partir do tendão bovino até a liofilização do mesmo. Fonte: Criando com BioRender.

4.2 Preparação e Caracterização de *scaffolds* de Colágeno/Quitosana

Os *scaffolds* foram preparados em diferentes proporções de colágeno/quitosana (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100). O método utilizado para a preparação foi adaptado de Perez-Puyana et al., (2019). Consiste em duas etapas: Preparação das soluções dos biopolímeros e liofilização.

Na primeira etapa, as soluções foram preparadas com diferentes proporções de colágeno/quitosana com ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em $\text{pH} = 3,5$. Neste pH é possível solubilizar ambos os polímeros. Todas as soluções foram preparadas com concentração de 1% massa/volume (m/v) de material. Em seguida, as amostras foram congeladas e posteriormente liofilizadas (figura 8). A análise do diâmetro dos poros foi realizada com o auxílio do software de imagem *ImageJ*.

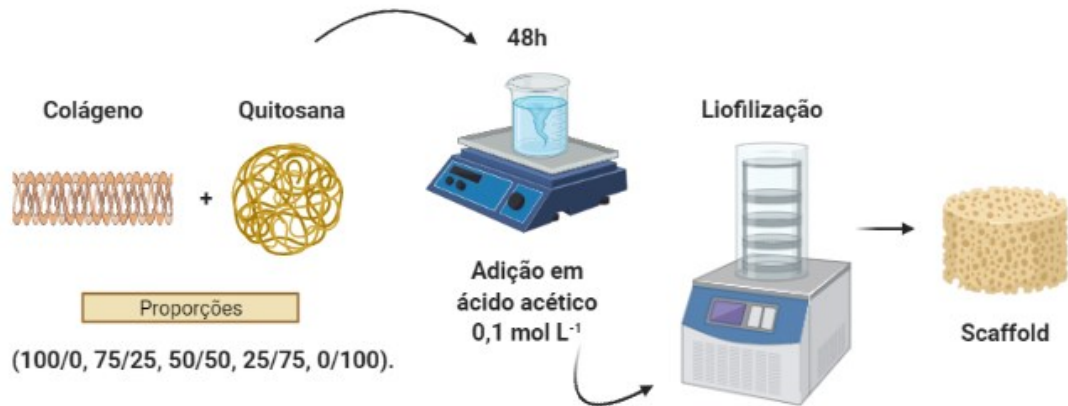


Figura 8: Representação da obtenção de blends poliméricas de colágeno e quitosana em ácido acético. Fonte: Criado com BioRender.

4.3 Avaliação da porosidade dos biomateriais

A porosidade foi determinada utilizando a metodologia citada em Sin Mun et al., 2019, onde o solvente penetra nos espaços vazios da matriz polimérica. Após a obtenção dos biomateriais liofilizados as amostras foram pesadas e em seguida imersas em 10 mL de etanol 99,5 % por 2 h. A porosidade foi determinada pela equação 4, onde ρ é a densidade em kg m^{-3} do etanol. Metodologia adaptada de (Sin Mun et al., 2019)

$$\text{Porosidade} = \left(\frac{\text{massa}_{\text{úmida}} - \text{massa}_{\text{seca}}}{\rho \text{Volume}_{\text{hidrogel}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.4 Incorporação e avaliação da liberação do fármaco

Adicionou 1 mL da solução de cfx 7 g L^{-1} incorporando 7 mg do fármaco, nas soluções poliméricas, preparadas como descrito no item 6.2, com diferentes

proporções de colágeno e quitosana. A mistura foi agitada por 48 h, e posteriormente foi liofilizada.

O estudo da cinética de liberação *in vitro* do fármaco foi realizado mediante a diálise, com os solventes água ultrapura (Mili-Q) e PBS. A matriz biopolímeros-fármaco foi colocada em membrana de diálise, imersa em 30 mL dos solventes e mantidos sob agitação a temperatura ambiente (25 °C). Na liberação, alíquotas de 2 mL foram coletadas em tempos pré-determinados, em horas, de 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24. Alíquotas foram retiradas até 24 h devido a estabilidade e a degradabilidade do fármaco a temperatura ambiente. O volume retirado foi substituído por 2 mL de solução PBS ou água de modo a manter a condição *sink*.

O tempo final de liberação foi fixado em 24 h pois, nas características do fármaco prescritas na bula, as soluções feitas com o pó liofilizado de ceftriaxona apresentam estabilidade física e química por 6 h à temperatura ambiente (15 a 30 °C) e/ou no refrigerador, entre 4 a 8 °C, por 24 h, segundo a ABL (antibióticos do Brasil). A estabilidade da molécula de cfx foi estudada com o auxílio do espectrofotômetro UV, marca *Shimadzu*, modelo *UV-1800*, no comprimento de onda entre 220 a 300 nm.

A quantificação de fármaco liberado foi investigada pela medição da sua concentração no meio utilizando o espectrofotômetro UV, marca *Shimadzu*, modelo *UV-1800*, no comprimento de onda de 243 nm, determinado a partir da curva de calibração do fármaco mediante a diluição seriada em mili-q e PBS (figura 9). A figura 10 ilustra as etapas envolvidas até a construção do gráfico de porcentagem de massa cumulativa liberada em função do tempo.

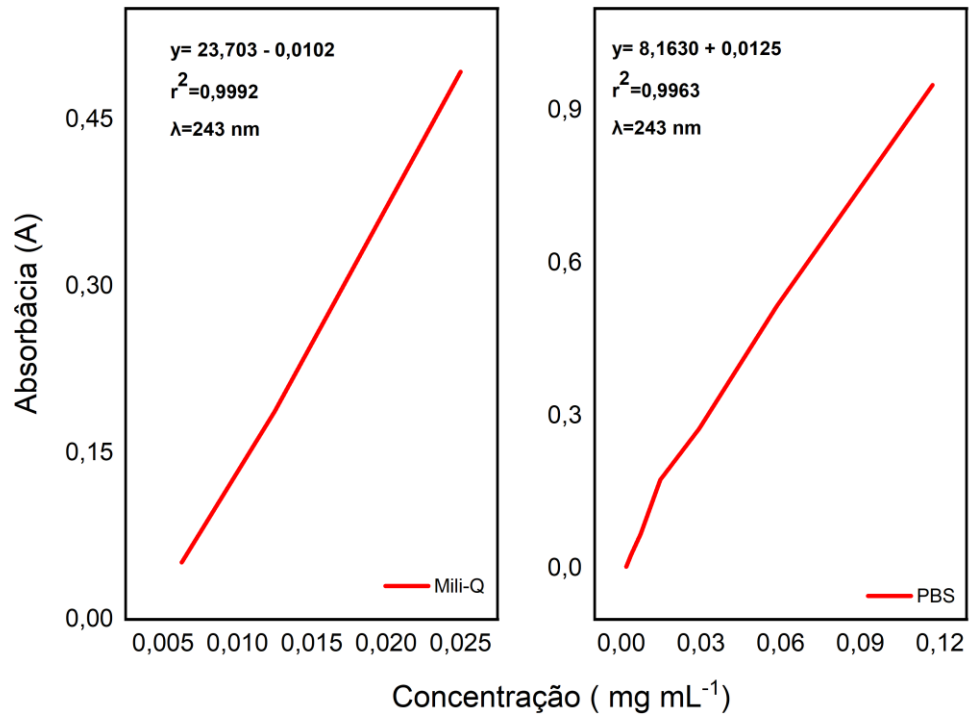


Figura 9: Curvas de calibração do fármaco ceftriaxona em Mili-Q e PBS (pH 7,4). Fonte: Autor.

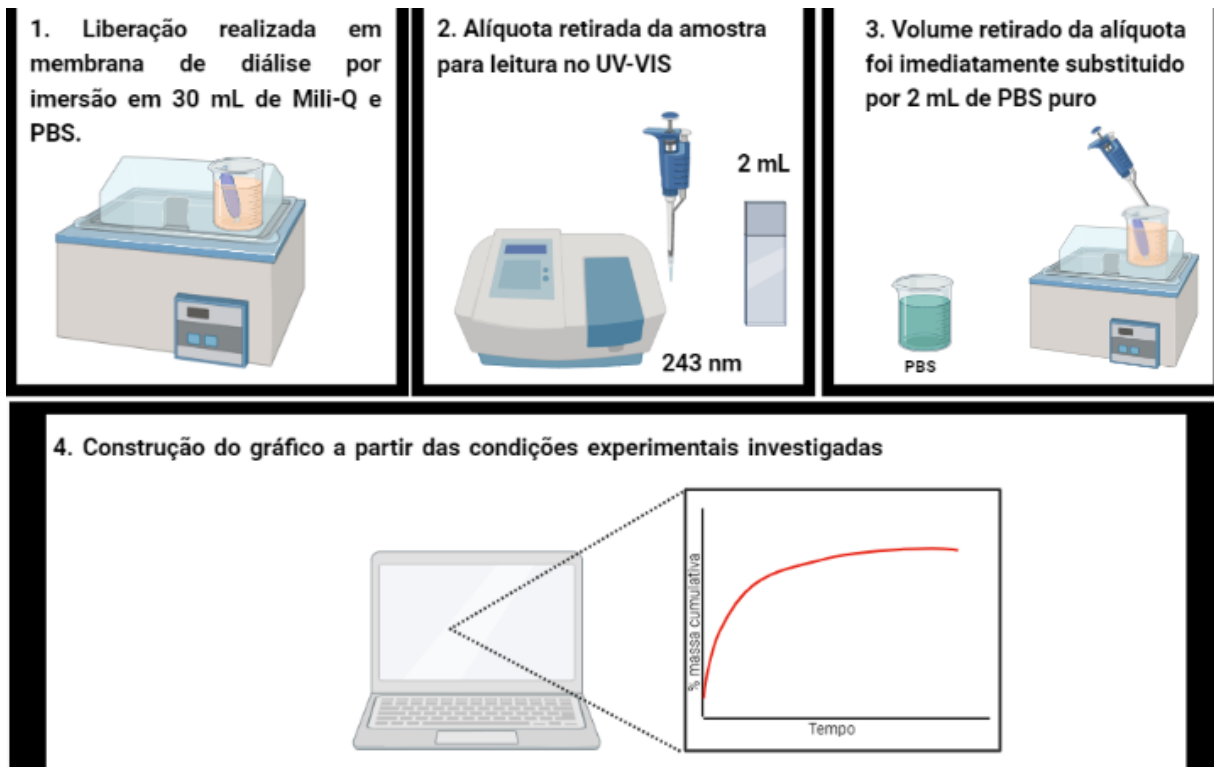


Figura 10: Representação simplificada da liberação in vitro do fármaco ceftriaxona. Fonte: Criado com BioRender.

4.5 Atividade Antimicrobiana - Halo de Inibição

Os *scaffolds* com e sem antimicrobiano foram testados frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no teste de halo de inibição. Para o inóculo uma alçada de células ativas aderidas ao fio de platina, previamente esterilizado, foi transferida para uma placa de BHI (*Brain-Heart Infusion*) e cultivadas em estufa bacteriológica a 35 - 37 °C por 24 h. Após o tempo de estufa para o preparo do inóculo, o meio de cultivo foi centrifugado (3500 rpm/15min) e a massa celular foi lavada (aproximadamente 10 mL), e suspensa em solução salina 0,9% (aproximadamente 5 mL). A concentração de inóculo foi padronizada com auxílio da escala de Mc Farland 0,5 (10^8 UFC/mL), utilizando o espectrofotômetro (UV-vis) no comprimento de onda de 600 nm. Para a análise, 100 µL do microrganismo padronizados e diluídos a 10^6 UFC/mL em meio BHI líquido, foram dispersos na superfície da placa de Petri contendo ágar nutriente seguindo metodologia adaptada de Guo et al.,(2014). Os *scaffolds* obtidos foram colocados no centro da placa para investigar o halo de inibição. A atividade antimicrobiana também foi testada para as amostras após os ensaios de liberação, para avaliar se ainda tinham efetividade frente a bactéria. Estas amostras foram nomeadas como: C25:Q75FP, C50:Q50FP e C75:Q25FP. As placas de Petri ficaram incubadas por 18 h em temperatura de 35 – 37 °C, após esse tempo as medidas dos halos de inibição foram tratadas com o auxílio do Software ImageJ a partir de 6 medidas individuais, demonstrado na figura 11, expressos em mm.

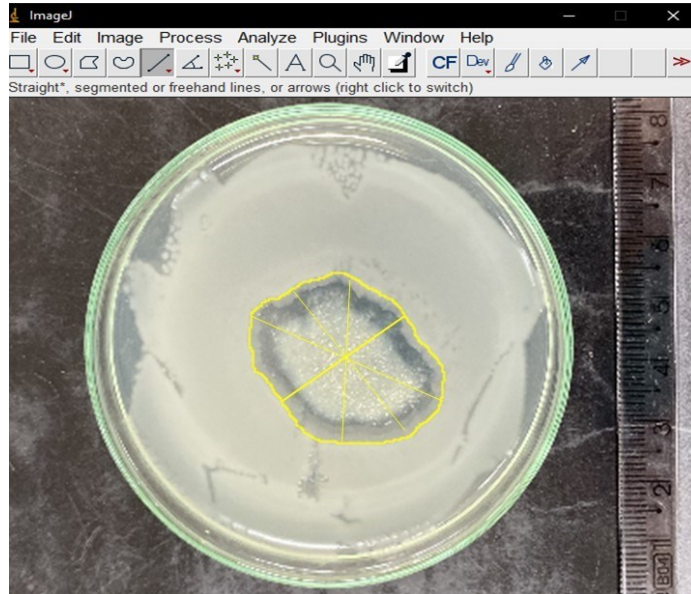


Figura 11: Halo de inibição após o tratamento com o software ImageJ. Fonte: Autor.

4.6 Ensaio de Hemólise

A atividade hemolítica dos biomateriais em diferentes proporções de colágeno e quitosana foi avaliada mediante a metodologia adaptada de Bulmus et al., 2003. Neste ensaio, aproximadamente 8 mL de sangue humano foi recolhido em frasco contendo EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), para que não ocorra a coagulação sanguínea, e seguidamente centrifugados a 6 °C a 4000 rpm (rotações por minutos) durante 10 min, para separação dos eritrócitos (precipitado) e plasma (descartado), figura 12.

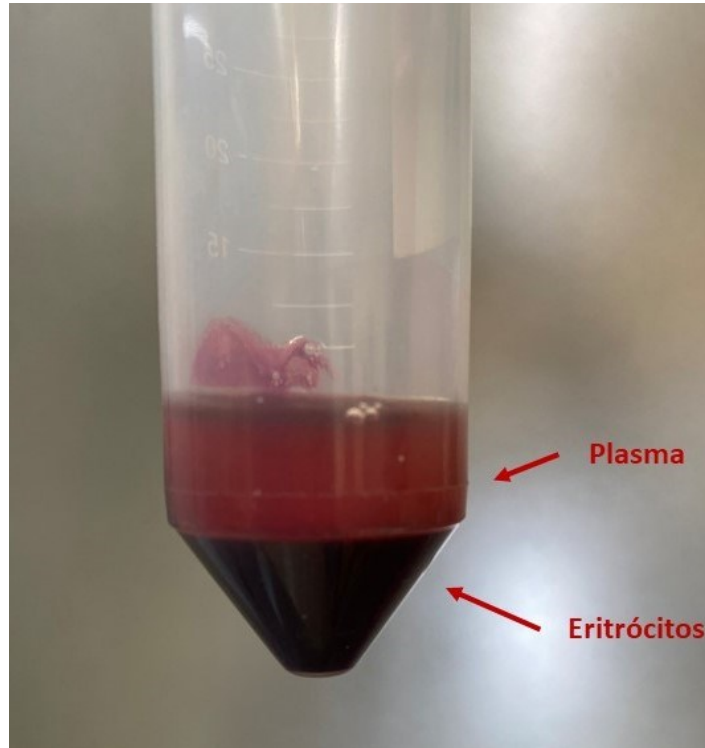


Figura 12: Separação eritrócitos e plasma após a centrifugação. Fonte: Autor.

Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina 0.9%, a cada lavagem foram centrifugados a 6 °C a 4000 rpm durante 10 min. Posterior a lavagem final, os eritrócitos foram suspensos em tampão fosfato (PBS) em pH 7.4 e diluídos para 10% da sua concentração inicial, resultando em suspensão com concentração 10^8 de hemácias por 200 μL .

Em tubos falcon de 50 mL, as amostras foram misturadas em 4,8 mL de PB e 1,2 mL de hemácias 10^8 células/200 μL (BULMUS, 2003; PALANIVELU; RUBAN KUMAR, 2014), e incubadas por 1 h a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram retiradas e os tubos foram centrifugados a 6 °C a 4000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e lido na absorbância de 541 nm (cromóforo da hemoglobina) usando espectrofotômetro UV, marca *Shimadzu*, modelo *UV-1800*. Soluções de Triton X (1% em massa) foram utilizadas como controle positivo para a hemólise, e tampão fosfato como controle negativo (figura 13). Para ocorrer a hemólise, as hemácias são rompidas permitindo o escape da hemoglobina para a solução.

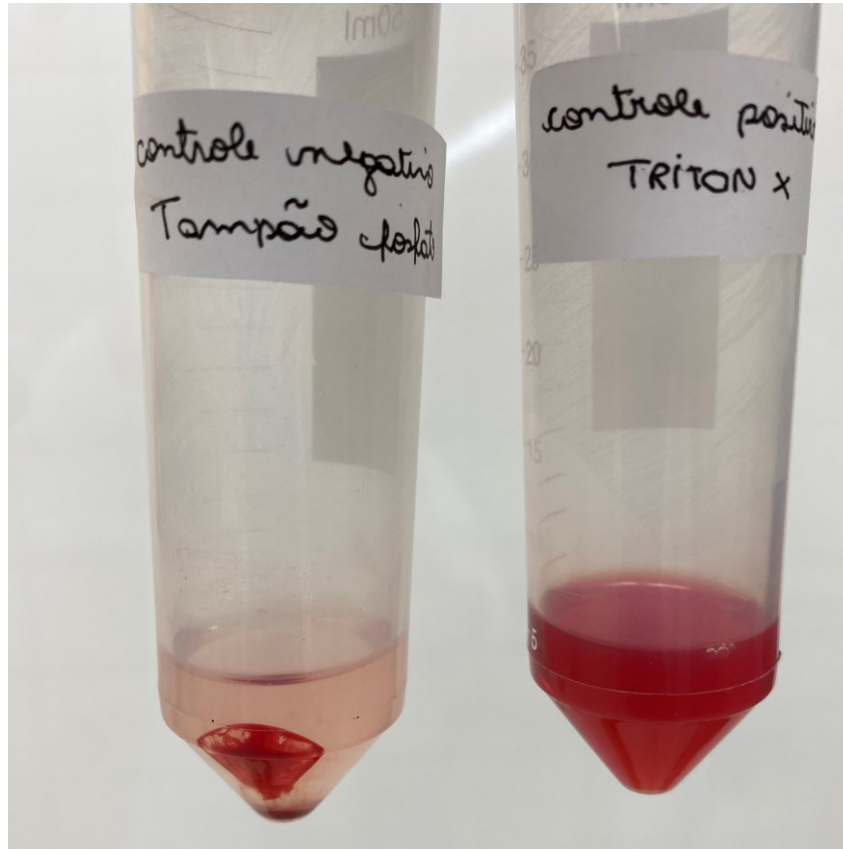


Figura 13: Controles positivo (Triton X-100) e negativo (PB) para hemólise. Fonte: Autor.

Mediante ao cálculo da porcentagem de hemólise é possível avaliar a atividade hemolítica dos biomateriais, pela equação 5 a seguir:

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle positivo}} \right) \times 100 \quad (5)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de colágeno

O colágeno foi obtido de forma satisfatória a partir da extração ácida do tendão bovino liofilizado, figura 14. O rendimento a partir de 10 gramas de matéria-prima foi de 10,57 %. O baixo rendimento, similar a outros relatos (ALEXANDRE; FARIA; SANTOS, 2017), pode ser atribuído pela perda de colágeno na etapa de centrifugação, até mesmo no processo de hidrólise e obtenção do colágeno. Entretanto, a extração de colágeno é economicamente viável. Esse coproduto (tendão) na maioria das vezes é descartado, gerando impacto ambiental. Além disso, o custo da extração é estimado em R\$ 674,00/g muito inferior ao produto comercial com valores aproximados a R\$ 1.400,00/g. Outro aspecto favorável à extração é a possibilidade de adição de enzimas que aumentam o rendimento de colágeno puro precipitado, classificado como insolúvel em meio ácido, Castro et al. (2014).

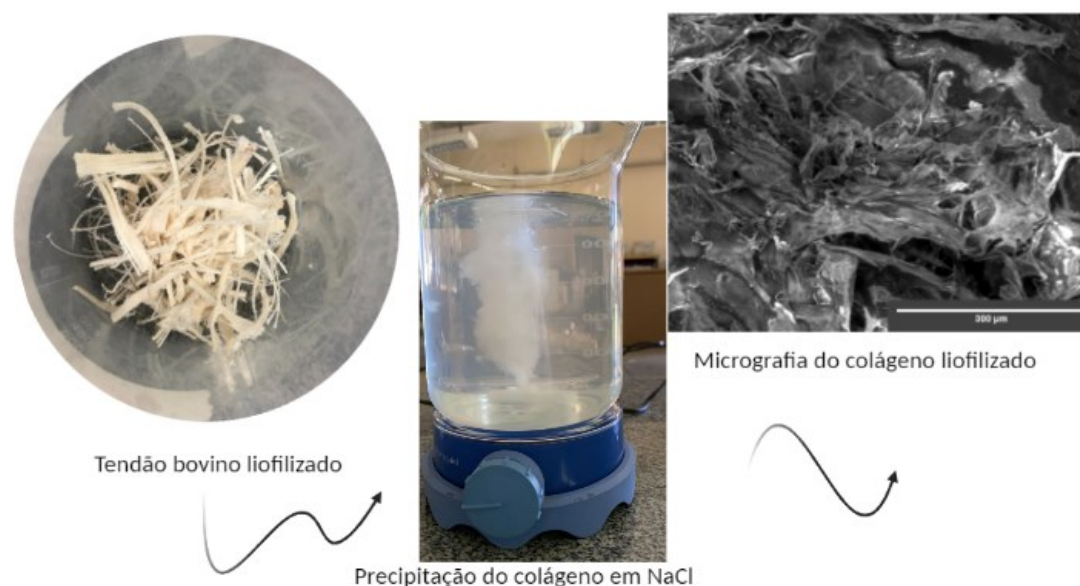


Figura 14: Obtenção de colágeno. Fonte: Autor.

Pela análise de FTIR-ATR do colágeno puro (C100), observa-se o espectro vibracional referente a estrutura de tripla hélice, que está relacionada as ligações de hidrogênio entre as três subunidades polipeptídicas associadas as amidas I, II e III em 1636, 1545 e 1241 cm^{-1} , respectivamente. Estas bandas são atribuídas as vibrações do estiramento simétrico das ligações N-H e da dupla ligação da carbonila

(amida I), a deformação angular simétrica da ligação N-H e o estiramento simétrico da ligação C-N (amida II) e a deformação angular da ligação N-H e o estiramento da ligação C-N (amida III). Em 2930 cm^{-1} , observa a banda relativa ao estiramento simétrico dos anéis de pirrolidina, e em 3295 cm^{-1} , relaciona-se ao estiramento simétrico da ligação O-H (KACZMAREK; SIONKOWSKA; OSYCZKA, 2018; SIONKOWSKA; KACZMAREK, 2017).

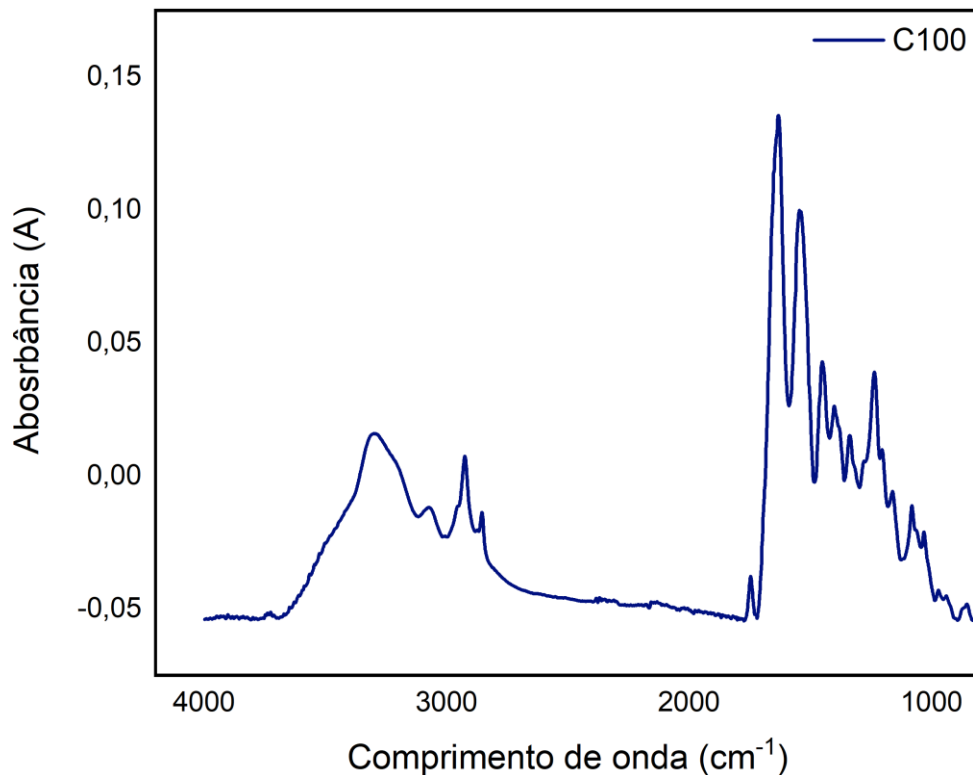


Figura 15: Espectroscopia ATR-FTIR do colágeno puro extraído a partir do tendão bovino.
Fonte: Autor.

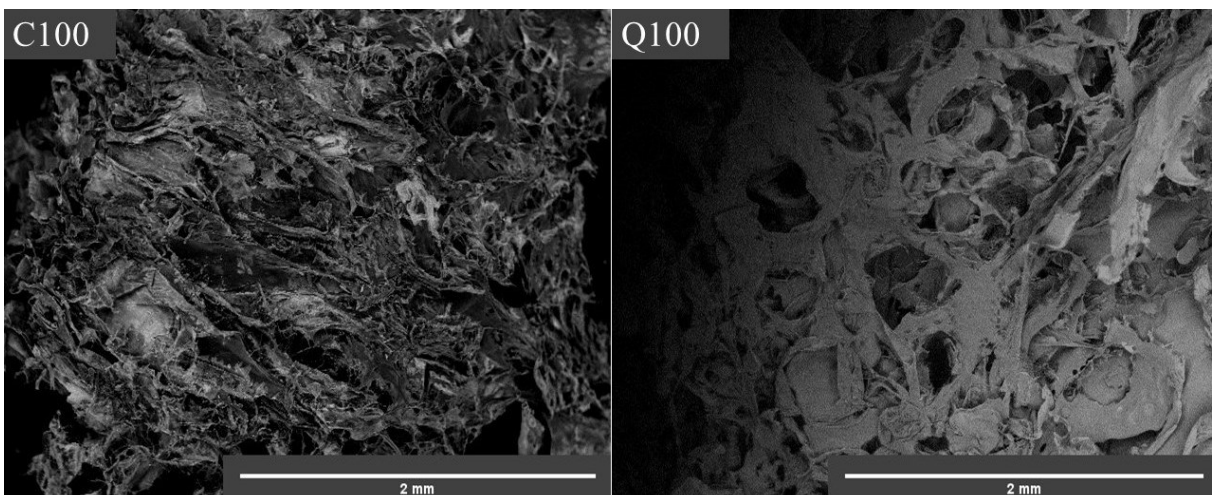
5.2 Caracterização morfológica e espectroscópica das blendas liofilizadas

As blendas de colágeno e quitosana são opacas apresentam textura macia, administrável e exibiram estrutura quebradiça. O aumento de quitosana na composição alterou a tonalidade esbranquiçada para amarela em comparação com as demais proporções (figura 16).



Figura 16: Fotografias das blendas poliméricas de colágeno e quitosana obtidas por liofilização. Fonte: Autor.

A análise morfológica dos biomateriais, a partir do microscópio eletrônico de varredura, mostra que a adição de quitosana alterou as propriedades morfológicas na matriz polimérica, e conseqüentemente aumentou a sua porosidade, exibindo poros irregulares e interconectados na figura 16. A ordem crescente de tamanho de poros para as matrizes poliméricas é: C75:Q25 < C50:50 < C25:Q75, e os diâmetros variam em média $0,0852 \pm 0,0566$ mm, $0,0629 \pm 0,0258$ mm, $0,0657 \pm 0,0271$ mm, respectivamente. Menor concentração de quitosana na matriz polimérica leva a presença de estruturas fibrilares diminuindo a quantidade de poros. As ligações eletrostáticas e de hidrogênio formadas através dos grupos protonados da quitosana, interagem com os grupos desprotonados do colágeno, levando a estabilização das fibras de colágeno (FERNANDES et al., 2011; SIONKOWSKA et al., 2004).



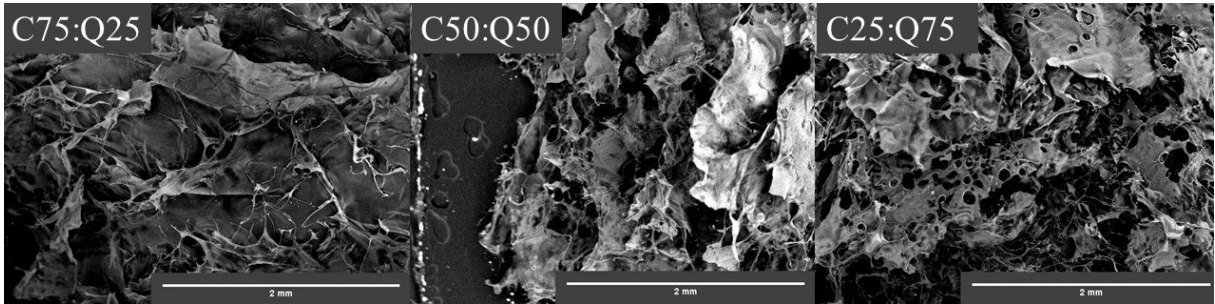


Figura 17: Micrografias dos biomateriais poliméricos, ampliação de 250 mil vezes. Fonte: Autor.

Neste caso, o diâmetro médio dos poros as blendas poliméricas de colágeno e quitosana estão acima do tamanho mínimo necessário para a fixação celular (figura 18), segundo Raman et al., (2019) que deve ser acima de 0,05 mm.

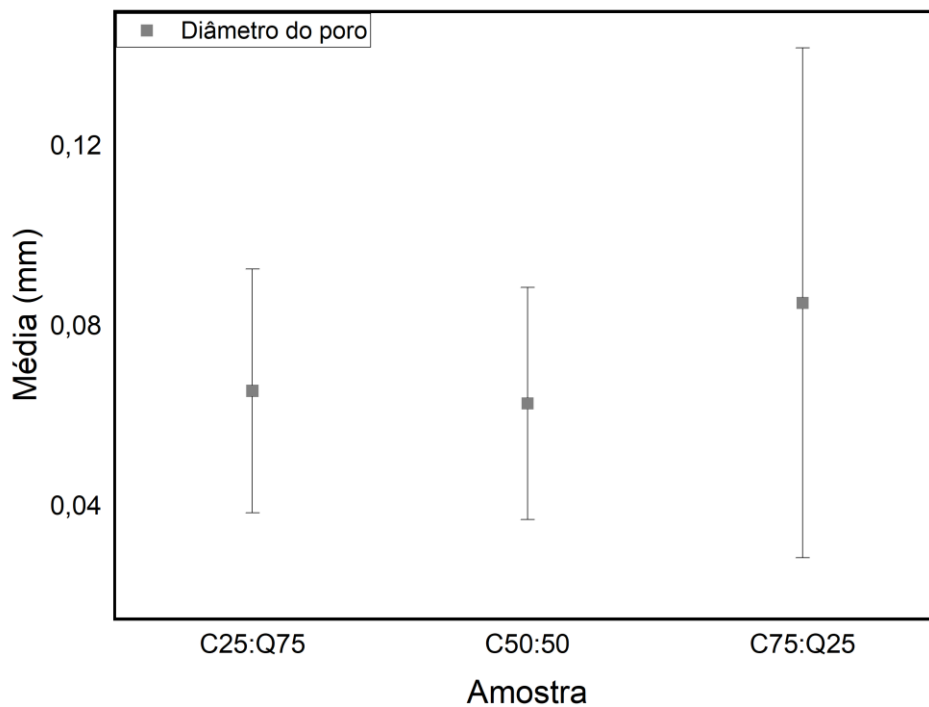


Figura 18: Valor médio do diâmetro dos poros obtido a partir de 9 medidas individuais com o auxílio do software ImageJ. Fonte: Autor.

A figura 19 apresenta os espectros para o colágeno puro, a quitosana pura e as blendas poliméricas. Na região III, o espectro de FTIR-ATR de quitosana (Q100), mostra a absorção característica representada pelo estiramento simétrico do grupo O-H e a vibração no grupo amino N-H em 3354 e 3291 cm^{-1} respectivamente. Em

2884 cm^{-1} , na região II, mostra o estiramento dos grupos C-H alifáticos. Na região I, o espectro vibracional mostra as bandas amida I e II. A banda em 1649 cm^{-1} , amida I, é caracterizada pelo estiramento da ligação C=O. A banda de absorção em 1594 cm^{-1} , amida II, representa a deformação angular simétrica de amina N-H. Ainda na região I, o comprimento de onda no valor de 1418 cm^{-1} corresponde a deformação angular do grupo C-H (CH_3) e a banda absorvida em 1071 cm^{-1} representa o estiramento da ligação C-O-C (ALAGHA; NOURALLAH; HARIRI, 2020; SIONKOWSKA et al., 2004; YOUNES et al., 2014).

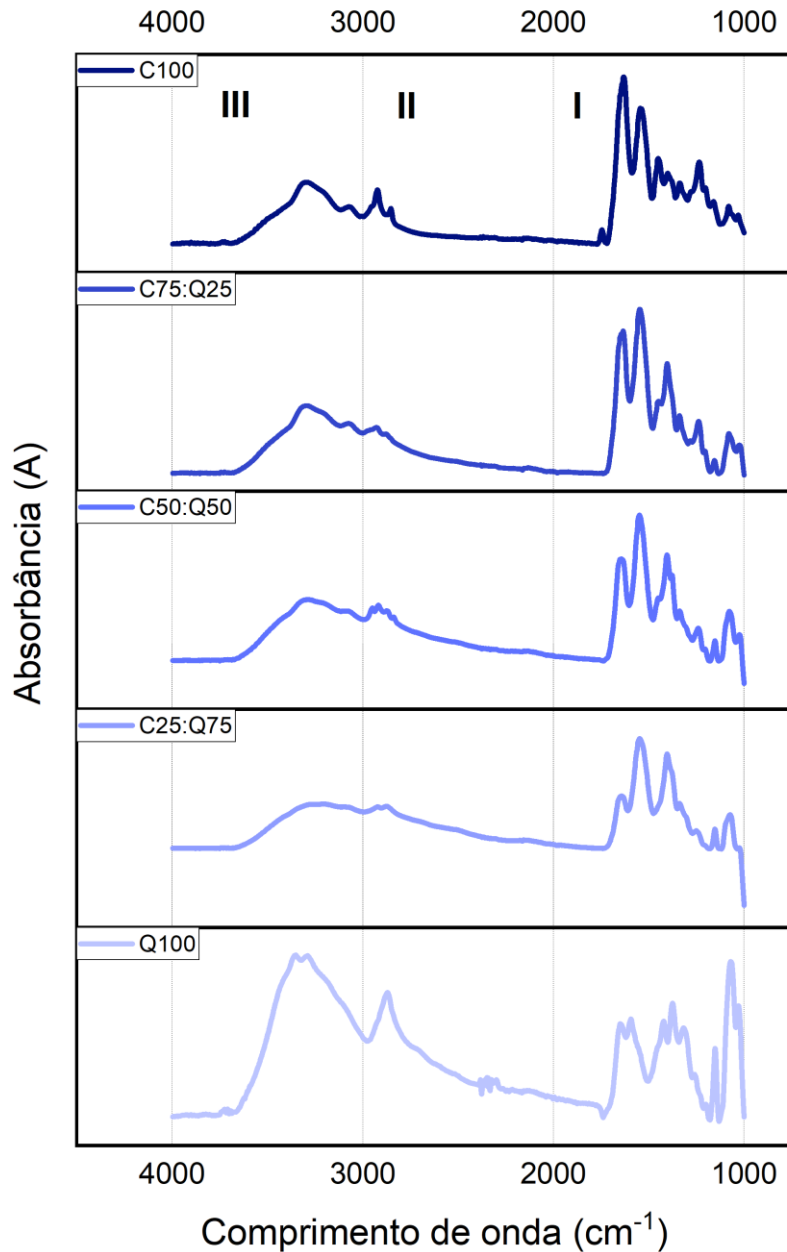


Figura 19: Espectroscopia ATR-FTIR dos polímeros puros e das blendas poliméricas. Fonte: Autor.

Os espectros ATR-FTIR das blendas não apresentam bandas adicionais além das bandas de absorção atribuídas as ligações peptídicas do colágeno. Observou-se que a adição de quitosana modificou a intensidade das bandas de absorção entre as amidas I e II, na região I. A diminuição de colágeno diminuiu gradualmente a intensidade da amida I, em aproximadamente 1640 cm^{-1} . A intensidade da amida II, em 1544 cm^{-1} , aumentou com a diminuição de colágeno na matriz polimérica.,

Concentrações menores de colágeno resultaram no deslocamento e na intensidade da banda referente a amida III na região I (ALAGHA; NOURALLAH; HARIRI, 2020; ANDONEGI et al., 2020; SIONKOWSKA et al., 2004).

Essas diferenças na intensidade relativa das bandas por intermédio do FTIR-ATR informam que as interações entre colágeno e quitosana ocorrem por ligações de hidrogênio. Em meio ácido, a protonação dos grupos amino da quitosana favorece a atração eletrostática com os grupos desprotonados do colágeno.

A integridade da hélice tripla do colágeno pode ser avaliada por intermédio de dados espectrais entre as bandas amida I, II e III em 1640, 1544 e 1410-1200 cm^{-1} respectivamente. O método descrito por Andonegi et al., (2020), baseia-se em calcular a diferença entre os números de onda (ν) das amida I e II, usando a equação (6), onde a variação de valores menores que 100 cm^{-1} indicam que a integridade da hélice tripla da molécula de colágeno foi mantida, acima desse valor indica a presença de colágeno desnaturado que a integridade da hélice tripla da molécula de colágeno foi mantida, acima desse valor indica a presença de colágeno desnaturado (ANDONEGI et al., 2020; SIZELAND et al., 2018).

$$\Delta\nu = \nu_{\text{I}} - \nu_{\text{II}} \quad (6)$$

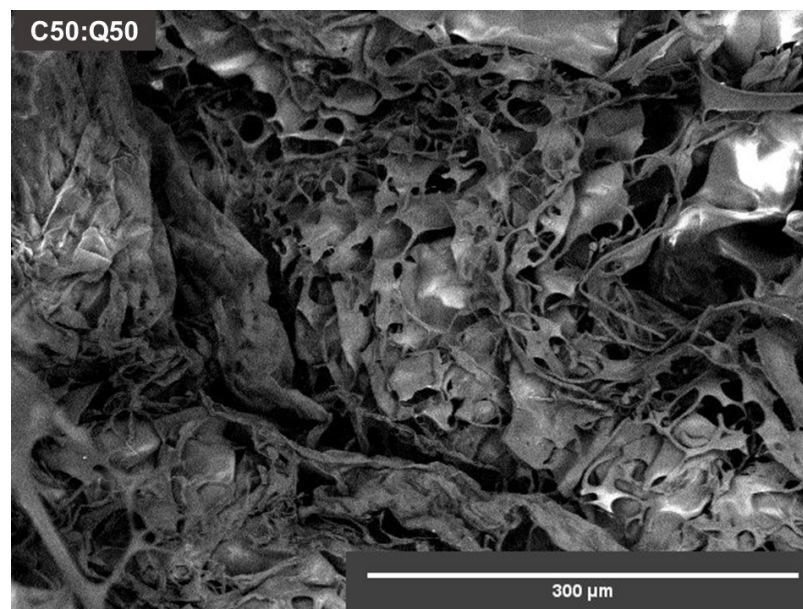
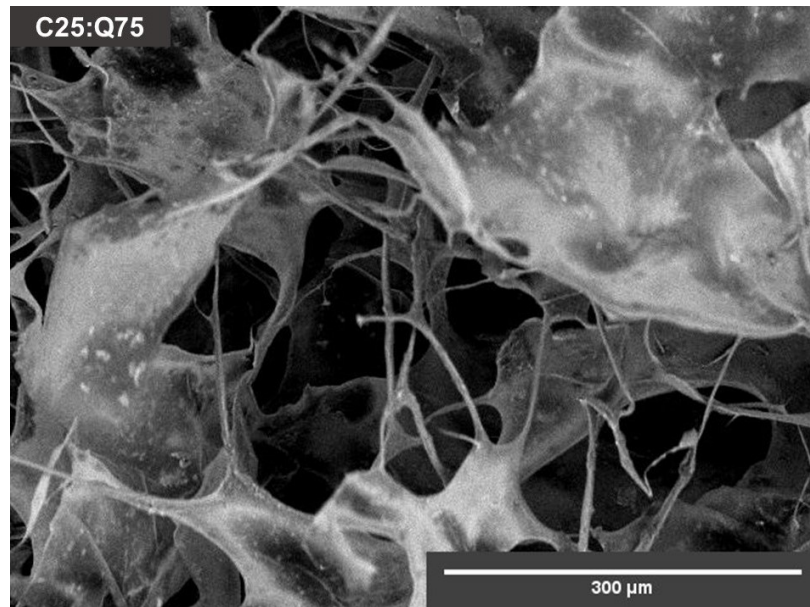
A estabilidade da molécula de colágeno após a adição de quitosana foi confirmada por esse método, apresentando valores inferior a 100 cm^{-1} (tabela 1).

Tabela 1: Adequação do modelo teórico aos dados experimentais com a diferença entre as bandas de amida I (ν_{I}) e a amida II (ν_{II}) ($\Delta\nu$) em blendas de colágeno/quitosana.

Amostra	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
C75/Q25	97,9
C50/Q50	92,2
C27/Q75	86,4

As micrografias dos biomateriais incorporados com o fármaco sugerem que o fármaco está retido na matriz polimérica, onde observa-se pequenos pontos

brancos cristalizados sobre a extensão do material. Nota-se que a adição do mesmo induziu o aparecimento de poros nos materiais, como apresenta a figura 20. Essa característica além de aumentar a biocompatibilidade e a bioaceitação das amostras para a reparação de tecidos, estimula a proliferação e a migração celular na arquitetura da matriz polimérica.



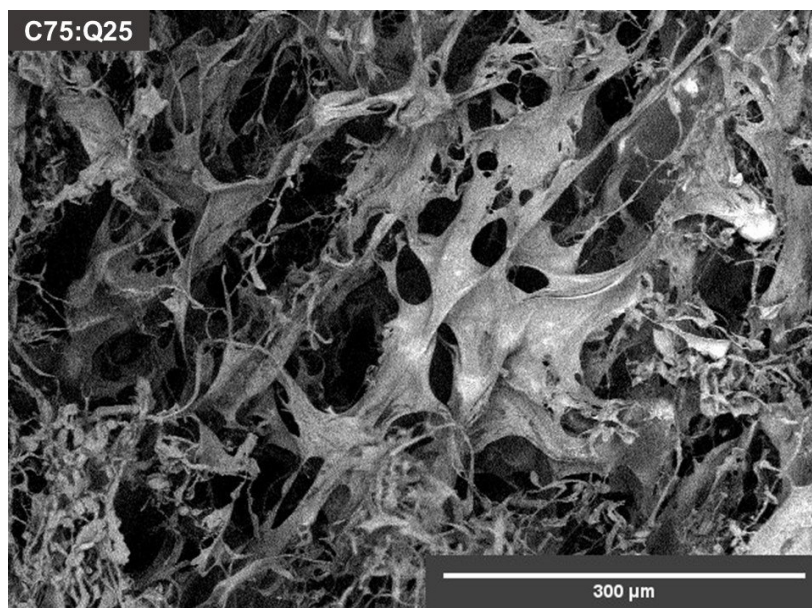


Figura 20: Micrografias dos biomateriais incorporados in situ com ceftriaxona. Fonte: Autor.

Os espectros ATR-FTIR obtidos do fármaco puro e deste incorporado nas blendas estão apresentados na figura 21. A tabela 2 resume para o fármaco as principais frequências de vibração e os respectivos modos vibracionais e grupamentos.

O espectro de infravermelho do fármaco apresentou faixas de absorção características de compostos cefalosporínico, semelhantes aos espectros encontrados na literatura (ALÉSSIO, 2012; EBRAHIMI et al., 2020)

Tabela 2: Bandas de absorção do antibiótico ceftriaxona. Fonte: Adaptado de (EL-SHABOURY et al., 2007)

Região	Frequência de absorção (cm⁻¹)	Vibrações e grupamentos
III	3500-3253	Alongamento do grupo N-H da amina
II	2937	Alongamento da ligação C-H do Csp ³
I	1737	Alongamento da ligação C=O da lactama
	1646	Alongamento da ligação C=O da amida
	1603	Dobramento da ligação C-N da amida
	1534-1504	Alongamento do grupamento carboxilato (COO ⁻)

	1032	Alongamento da ligação C-O e N-O
--	------	----------------------------------

A figura 21 apresenta o espectro de FTIR-ATR, obtido para investigar a interação do cfx com a matriz. Na região II, as faixas de absorção referentes as amidas I, II e III, foram mantidas comparadas às blendas poliméricas puras (figura 19). Observa-se uma mudança sutil no espectro vibracional na região de absorção entre 1000 a 1500 cm^{-1} (região I), observado também pelos autores Ebrahim e Hussain. (EBRAHIMI et al., 2020; HUSSAIN et al., 2021). Presume-se que essa mudança e variação de características vibracionais entre as bandas de absorção evidenciam a formação das interações eletrostáticas entre o alongamento assimétrico dos grupos C-O-C da quitosana e o alongamento C-O do éter da molécula de cfx. Estas bandas de absorção estão em aproximadamente 1022 e 1068 cm^{-1} para a amostra C25:Q75F, 1022 e 1070 cm^{-1} para a amostra C50:Q50F, e 1031 e 1074 para C75:Q25F (figura 18). Observou-se que a adição de colágeno diminuiu suavemente a intensidade das bandas de absorção entre 1000 a 1100 cm^{-1} . Por meio dos espectros de FTIR-ATR é perceptível que o fármaco ceftriaxona foi incorporado a partir da obtenção das blendas a base de colágeno e quitosana.

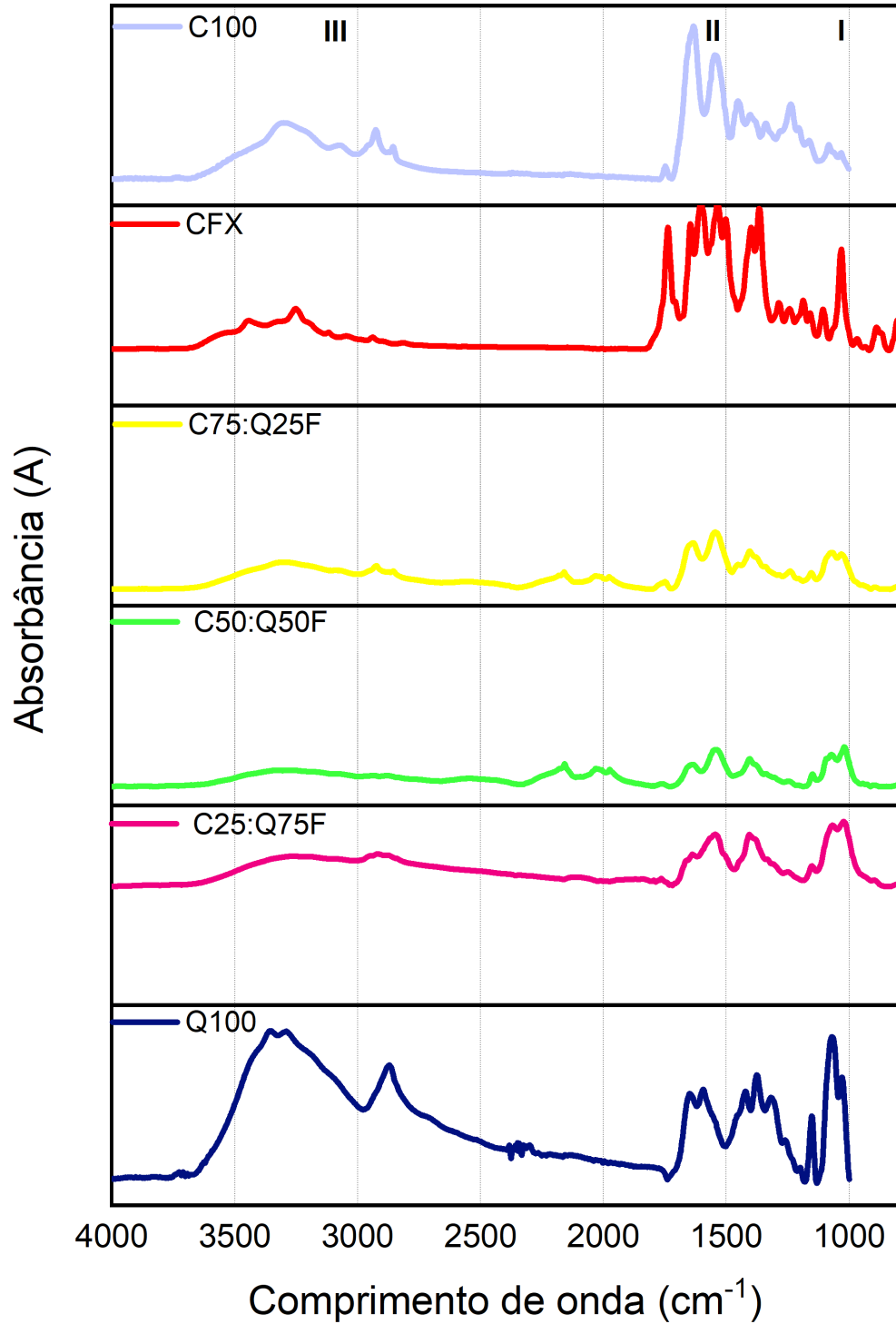


Figura 21: Espectroscopia ATR-FTIR dos polímeros puros e das blends poliméricas incorporadas com fármaco. Fonte: Autor.

5.3 Estudo da porosidade dos biomateriais

A figura 22 apresenta os resultados de porosidade para as amostras C25:Q75, C50:Q50 e C75:Q25. Estas apresentaram percentagem de porosidade média no valor de 90,3, 89,5 e 90,4% respectivamente. Apesar de não ter diferença estatística significativa ($\alpha < 0,05$), os resultados sugerem que as blendas poliméricas em diferentes proporções de massa possam ser favoráveis para aplicação biomédica.

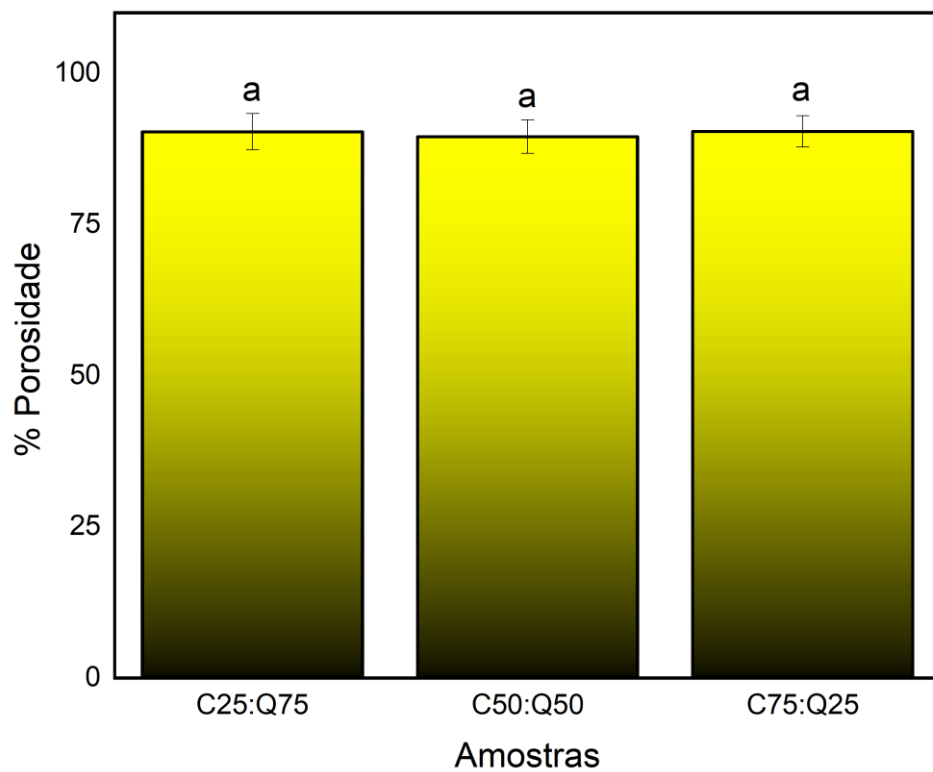


Figura 22: Avaliação da porosidade dos biomateriais em diferentes proporções de colágeno e quitosana (letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova). Fonte: Autor.

5.4 Liberação do fármaco

A transferência de massa em materiais poliméricos carregados com fármaco pode ser descrita por intermédio da modelagem matemática. O modelo cinético condizente com a liberação *in vitro* do fármaco seria o de Korsmeyer-Peppas (KP), que descreve o comportamento cinético por meio da difusão das moléculas do fármaco, chamado de transporte fickiano, e pelo fenômeno de inchamento e relaxamento de materiais poliméricos (transporte não fickiano) (RITGER; PEPPAS, 1987b).

A tabela 3, informa os resultados de liberação em diferentes proporções de colágeno e quitosana nos solventes, água ultrapura (Mili-Q) e PBS.

Observa-se duas fases de liberação na figura 23, tanto em água Mili-Q quanto em PBS. Inicialmente ocorre liberação *burst*, que é a explosão inicial devido a liberação das partículas que estão retiradas superficialmente na matriz nas primeiras horas. A segunda, etapa de liberação é caracterizada por ser mais lenta, e ocorre com essa mesma cinética até o tempo de liberação (24 h). A diferença da cinética dessas etapas nos parâmetros estudados, altera os mecanismos de liberação descrito pela equação de KP na curva de liberação.

Os resultados da cinética de liberação nos dois solventes estão apresentados na figura 23.

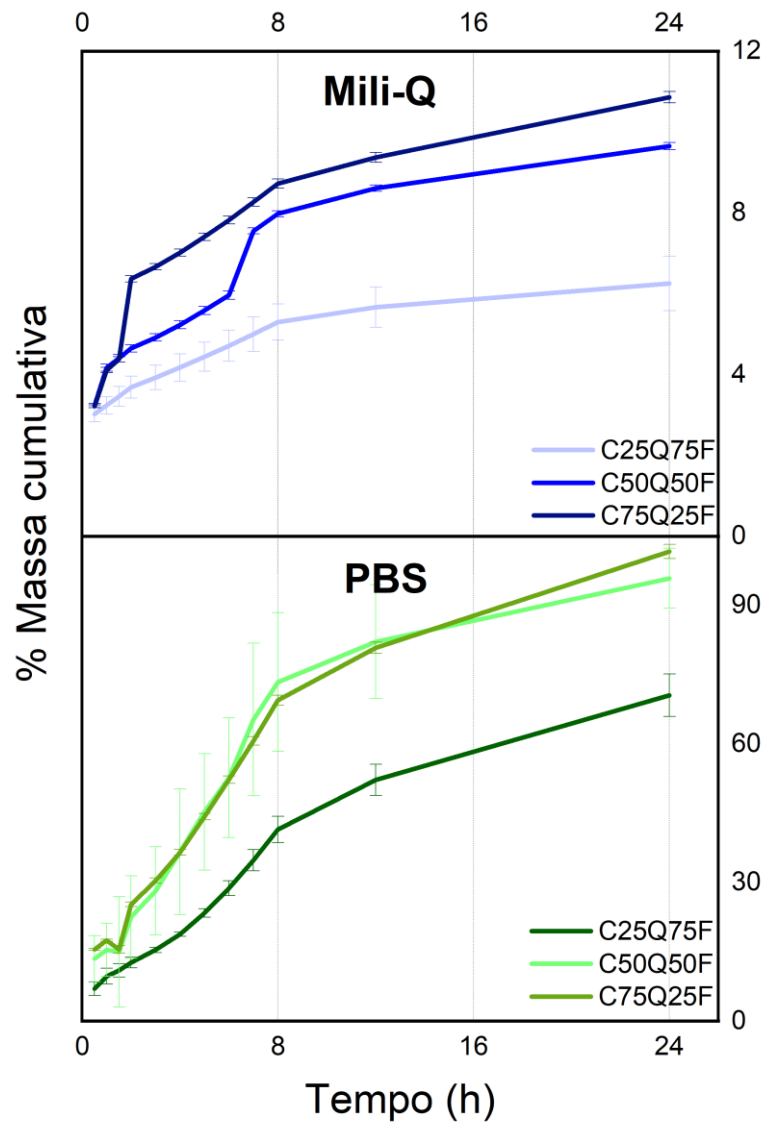


Figura 23: Curvas de liberação do fármaco a partir das diferentes proporções de colágeno e quitosana em água Mili-Q e PBS. Fonte: Autor.

Tabela 3: Obtenção da constante cinética (k) e o expoente difusional (n) a partir da adequação dos dados experimentais ao modelo de Korsmeyer–Peppas. Fonte: Autor.

SOLVENTE	AMOSTRA	M_T/M_∞ EM 24h (%)	K (h ⁻¹) 8h ETAPA I	K (h ⁻¹) 24h ETAPA II	n 8h	n 24h
MILI-Q	C25:Q75F	6,25 ^f	3,37 ±0,00860	3,89 ±0,00642	0,202 ±0,0147	0,150 ± 0,00564
	C50:Q50F	9,65 ^e	0,271 ± 0,0191	0,665 ± 0,00690	0,282 ± 0,003281	0,173 ± 0,00607
	C75:Q25F	10,9 ^d	0,294 ±	0,603 ±	0,361 ±	5,83

			0,0161	0,0334	0,0276	$.10^{-7} \pm 3,26.10^{-7}$
PBS	C25:Q75F	70,5 ^c	0,643 $\pm 0,0301$	1,09 \pm 0,0402	0,624 \pm 0,0515	0,501 \pm 0,0354
	C50:Q50F	95,6 ^b	2,54 \pm 0,0397	3,13 \pm 0,0161	0,661 \pm 0,0678	0,241
	C75:Q25F	100 ^a	7,69 \pm 0,0386	2,38 \pm 0,0122	0,586 \pm 0,0659	0,346 \pm 0,0107

Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova

Na tabela 4, observa-se o coeficiente de correlação (r^2) para as ordens de reação primárias 0, 1 e 2. Nota-se que a ordem predominante na cinética de liberação é a ordem 0, entretanto, por não apresentar diferença estatística significativa entre elas, há inconsistência nas reações não podendo concluir efetivamente qual mecanismo prevalece na cinética de reação devido ao r^2 . Como resposta a ordem de reação 0, a velocidade da difusão das moléculas de fármaco do interior para o exterior da matriz é menor que a velocidade de dissolução permitindo a liberação lenta do fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Tabela 4: Coeficiente de correlação (r^2) nas etapas I e II para ordens de reação primárias 0, 1 e 2. Fonte: Autor.

SOLVENTE	AMOSTRA	Ordem 0 Equação: $[M] - [M]_0 = -kt$ (r^2) etapa I/II	Ordem 1 Equação: $\ln[M] = \ln[M]_0 - kt$ (r^2) etapa I/II	Ordem 2 Equação: $\frac{1}{[M]} - \frac{1}{[M]_0} = kt$ (r^2) etapa I/II
MILI-Q	C25:Q75F	0,99239 ^a / 0,95768 ^a	0,97470 ^a / 0,94373 ^a	0,94282 ^a / 0,92759 ^a
	C50:Q50F	0,92698 ^a / 0,96091 ^a	0,92213 ^a / 0,94533 ^a	0,85791 ^a / 0,92687 ^a
	C75:Q25F	0,86005 ^a / 0,9967 ^a	0,77002 ^a / 0,98537 ^a	0,66716 ^a / 0,97461 ^a
PBS	C25:Q75F	0,97545 ^a / 0,96548 ^a	0,9806 ^a / 0,91727 ^a	0,84471 ^a / 0,84677 ^a
	C50:Q50F	0,98681 ^a / 0,95367 ^a	0,96894 ^a / 0,92897 ^a	0,86224 ^a / 0,89857 ^a
	C75:Q25F	0,98636 ^a / 0,97539 ^a	0,94801 ^a / 0,94801 ^a	0,84183 ^a / 0,90921 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova

As amostras liberadas em Mili-Q apresentaram valores de expoente difusional (n) entre 0,00 e 0,361 na etapa I. Segundo Ritger e Peppas, quando os valores dos expoentes são iguais ou inferiores a 0,5, o mecanismo que domina a liberação é a

difusão fickiana. Valores entre 0,5 e 0,9 são considerados mecanismos de transporte não-fickiano. Observa-se que as amostras C50:Q50F e C75:Q25F liberadas em PBS ocorreu simultaneamente o transporte fickiano e o não fickiano, ou seja, o intumescimento da matriz polimérica e posterior a contribuição relaxante, comprovados pelo expoente difusional (n) nas duas etapas de liberação. Foram obtidos dois valores de (n) para as amostras devido as diferentes fases de liberação (burst e lenta). Para a amostra C25:Q75F o mecanismo predominante foi a contribuição relaxante da matriz polimérica.

Os gráficos representando a cinética de liberação dos biomateriais estão apresentadas na figura 23 e podem ser descritos por meio das etapas I e II. A etapa I, de liberação burst é caracterizada pela parte linear acentuada da curva nas primeiras 8 h do experimento. Na segunda etapa a liberação exibe um comportamento linearmente crescente, porém com cinética mais lenta, menor inclinação. As amostras C25:Q75F, C50:Q50F e C75:Q75F liberaram em água mili-q cerca de 6,25, 9,65 e 10,9% de ceftriaxona em 24 h, respectivamente. Para o solvente PBS as amostras C25:Q75F, C50:Q50F e C75:Q75F liberaram nessa ordem: 70,5, 95,6 e 100% em 24 h.

Nos dois parâmetros estudados, nota-se que as amostras C25:Q75F liberadas em Mili-Q e PBS mostraram menor taxa de liberação, isto pode estar relacionado ao fato do fármaco apresentar um impedimento ao se desprender da matriz polimérica. Este pode ser, proveniente das ligações eletrostáticas C-O e N-O da molécula do fármaco com os grupos C-O-C da quitosana. O contrário observa-se para as amostras C75:Q25F, onde a velocidade de dissolução foi maior. Este fato pode estar associado a menor concentração de quitosana nessa amostra tornando a interação mais fraca entre fármaco e matriz. Dessa forma, evidencia-se que as proporções de colágeno e quitosana influenciam diretamente a cinética de liberação desse fármaco para o meio.

Percebe-se a discrepância entre os resultados de massa cumulativa liberada de fármaco em Mili-Q e PBS, figura 23. Os resultados informam que a liberação em PBS aumentou aproximadamente 10,5 vezes nas diferentes proporções em massa de colágeno e quitosana. Esse aumento da massa cumulativa, reforça que o pH do meio no qual está sendo liberada a droga deve estar bem controlado. O solvente PBS mantém o valor de pH constante em 7,4. Em água Mili-Q, pelo fato das blendas serem obtidas em meio ácido, quando ocorre o contato com este solvente o

pH acaba tornando-se ácido, fato este verificado com a medida do pH do meio, e neste caso há a perda da capacidade de liberação, como observado também em (HUSSAIN et al., 2021).

O método espectrofotométrico informa que após 24 h houve a degradação parcial do fármaco devido a diminuição da absorbância (figura 24). Entretanto, nas 6h iniciais de leitura ocorreu o aumento da absorbância em ambas as condições estudadas. Presume-se que esse aumento ocorre pela formação de produtos de degradação da molécula de ceftriaxona, levando a hidrólise e/ou a fotólise do antibiótico (ABRAMOVIĆ et al., 2021; EL-BAGARY et al., 2018).

Estudos experimentais e computacionais revelaram que uma solução aquosa desse fármaco é instável, a estabilidade da molécula depende do pH e da temperatura e a degradação ocorre devido ao sinergismo de vários parâmetros, como o solvente, pH, temperatura e radiação (ABRAMOVIĆ et al., 2021; ABRAMOVIĆ; UZELAC; FINČUR, 2019).

A hidrólise leva sistematicamente a formação de produtos intermediários menores e mais polares, no estudo experimental e computacional, os intermediários formados foram identificados por intermédio da técnica de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) (ABRAMOVIĆ et al., 2021; ARMAKOVIĆ et al., 2018). Os possíveis produtos de degradação a partir do fármaco estão exemplificados na figura 25. Onde P1 é o intermediário formado pela perda de 2-aminotiazol do fármaco, P2 é gerado a partir da degradação parcial de 2-aminotiazol e tiotrizinona, P3 é o intermediário formado pela perda do grupo carbolina e os demais (P4 a P9) são intermediários formados a partir das perdas e deslocamentos da molécula de cfx (ABRAMOVIĆ et al., 2021).

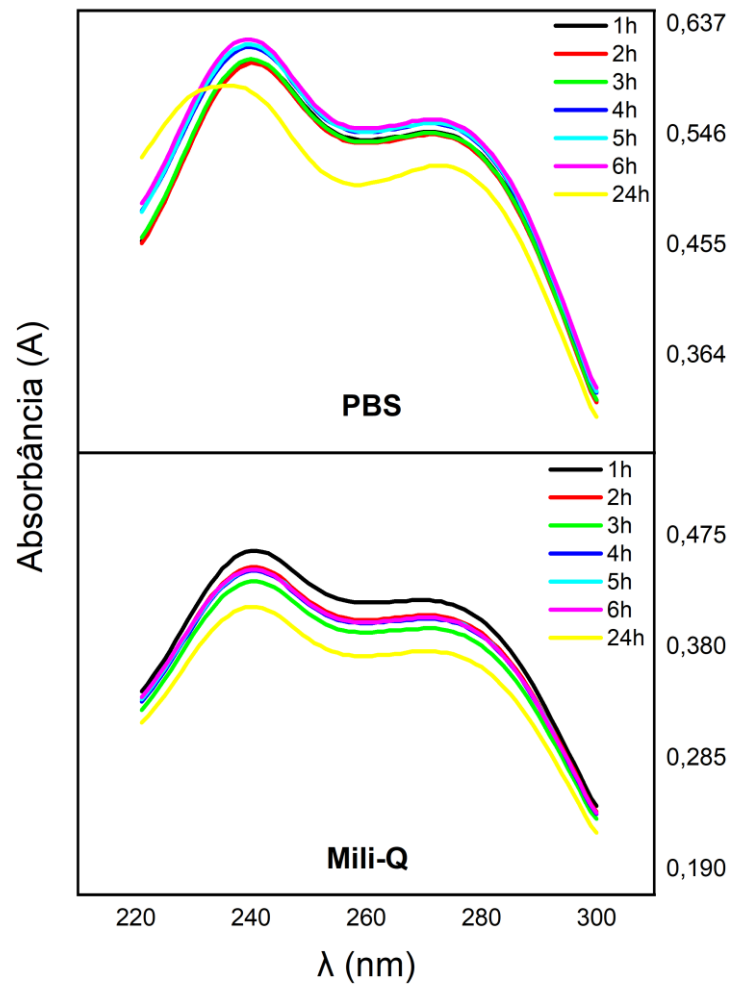


Figura 24: Avaliação da estabilidade do fármaco ceftriaxona em PBS e Mili-Q. Fonte: Autor.

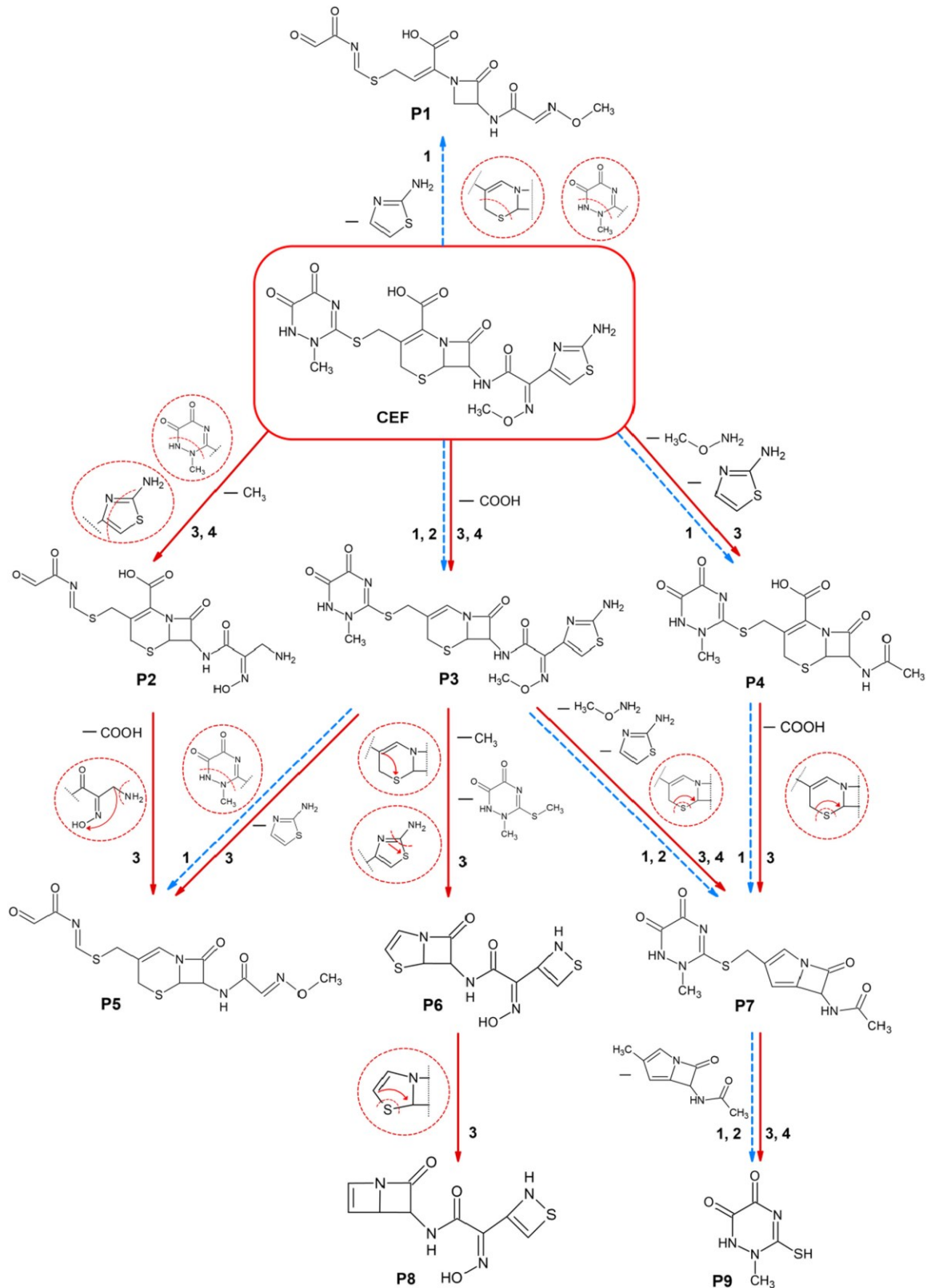


Figura 25: Possíveis intermediários provenientes da degradação do fármaco ceftriaxona em diferentes vias. Fonte: (ABRAMOVIĆ et al., 2021).

5.5 Halo de inibição

A tabela 5, apresenta o halo de inibição das blendas frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 analisados pelo diâmetro de inibição e tratados estatisticamente pela ANOVA e Tukey.

Tabela 5: Halo de inibição frente ao microrganismo *S. aureus* estimados a partir da figura 26. Fonte: Autor.

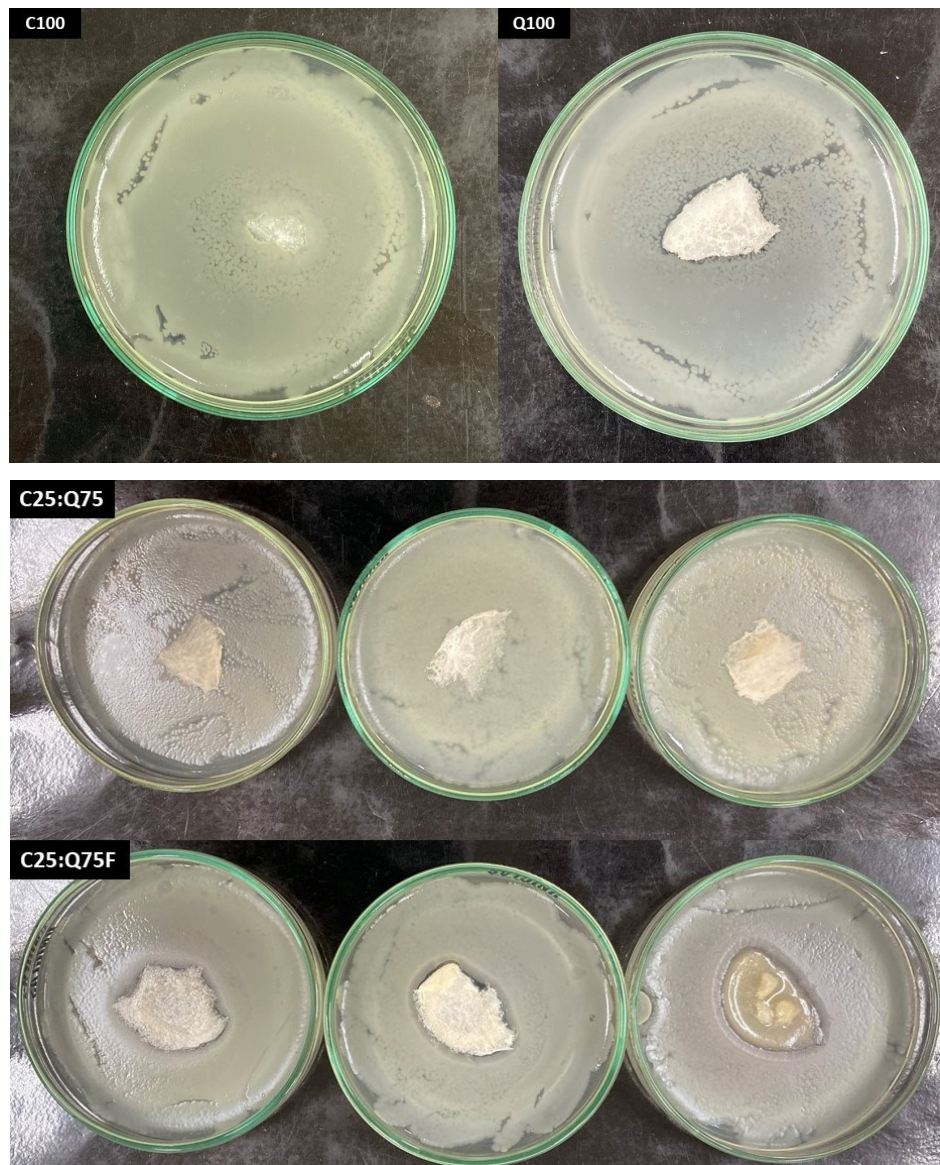
Amostra	Halo de inibição (mm)
C100	00,00
C25:Q75	00,00
C25:Q75F	23,62 ± 2,291 ^a
C25:Q75FP	14,78 ± 1,427 ^b
C50:Q50	00,00
C50:Q50F	23,96 ± 2,695 ^a
C50:Q50FP	13,47 ± 2,434 ^b
C75:Q25	00,00
C75:Q25F	21,71 ± 1,145 ^a
C75:Q25FP	9,46 ± 0,7972 ^c
Q100	15,79 ± 2,837 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova

Os resultados de atividade antimicrobiana avaliados pelo teste de difusão em ágar evidenciam maior efeito antibacteriano nas blendas incorporadas com o fármaco em relação as demais amostras. O colágeno puro (C100) não apresentou atividade antimicrobiana, Guo et al., (2017) e Muthukumar et al.,(2014) relataram que o colágeno não apresenta atividade contra a *S. aureus*. Ao contrário da quitosana, apresentou halo de inibição de 15,79 mm, essa atividade ocorreu devido aos grupos $-NH_2$ carregados positivamente que possam interagir com as membranas celulares (VALENZUELA-ROJO et al., 2020).

As amostras C25:Q75, C50:Q50 e C75:Q25 não apresentaram halo de inibição, no entanto, após a incorporação do fármaco cfx, as amostras exibiram halo de 23,62, 23,96 e 21,71 mm respectivamente. As amostras C25:Q75FP, C50:Q50FP e C75:Q25FP nos informam que após os ensaios de liberação *in vitro* em 24 horas

as matrizes poliméricas apresentaram halo de inibição. Neste sentido, pode-se concluir que, para a inibição do crescimento de bactérias na região onde a matriz polimérica é posicionada, as amostras C25:Q75F, C50:Q50F, C75:Q25F, C25:Q75FP, C50:Q50FP e C75:Q25FP mostraram-se eficazes, sendo uma característica importante no desenvolvimento de biomateriais impedindo a adesão de bactérias.



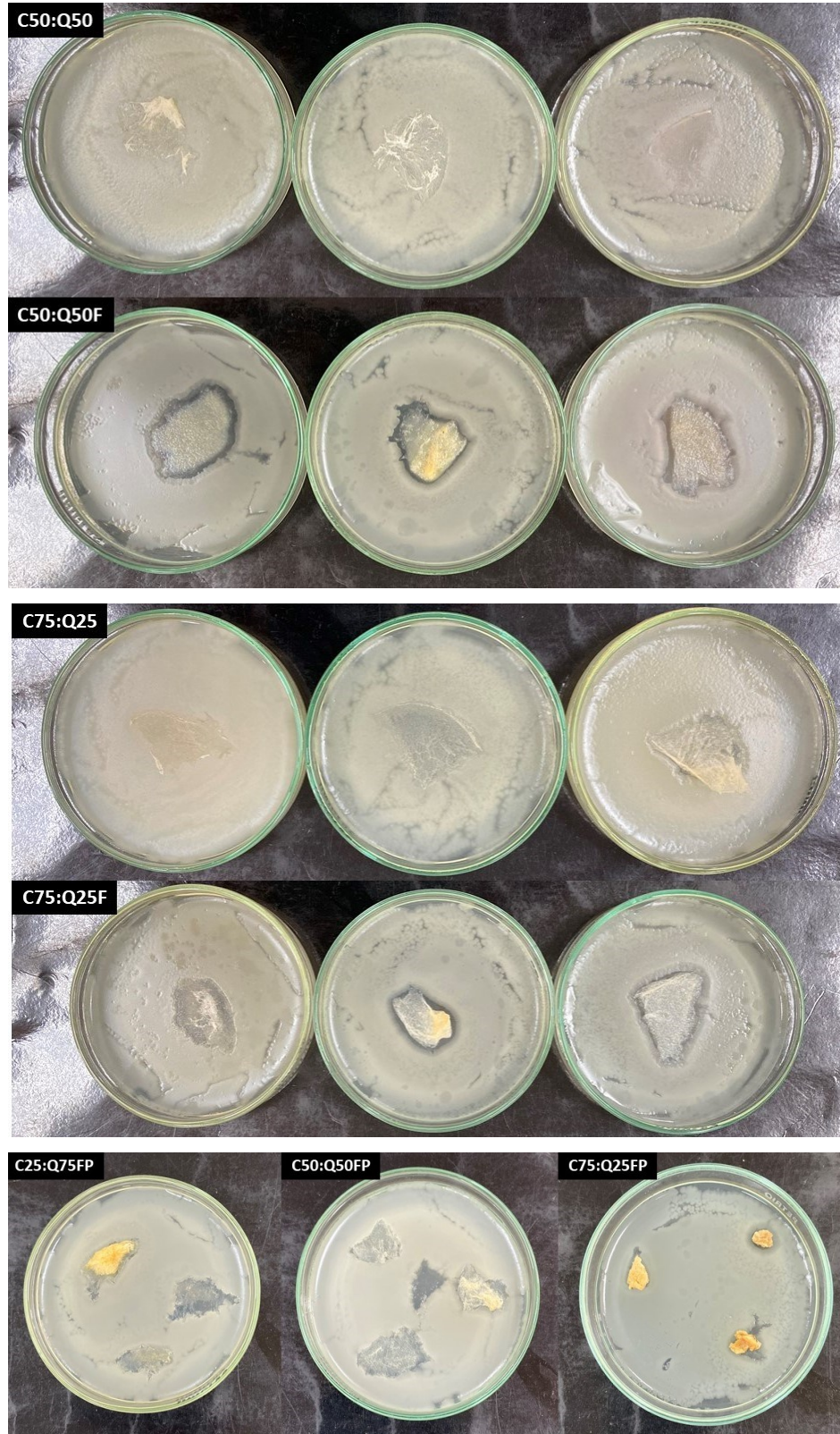


Figura 26: Amostras frente à *S. aureus* no teste de halo de inibição . Fonte: Autor.

5.6 Atividade hemolítica

O efeito da atividade hemolítica nas amostras comparadas aos controles positivo e negativo é representado pela figura 27.

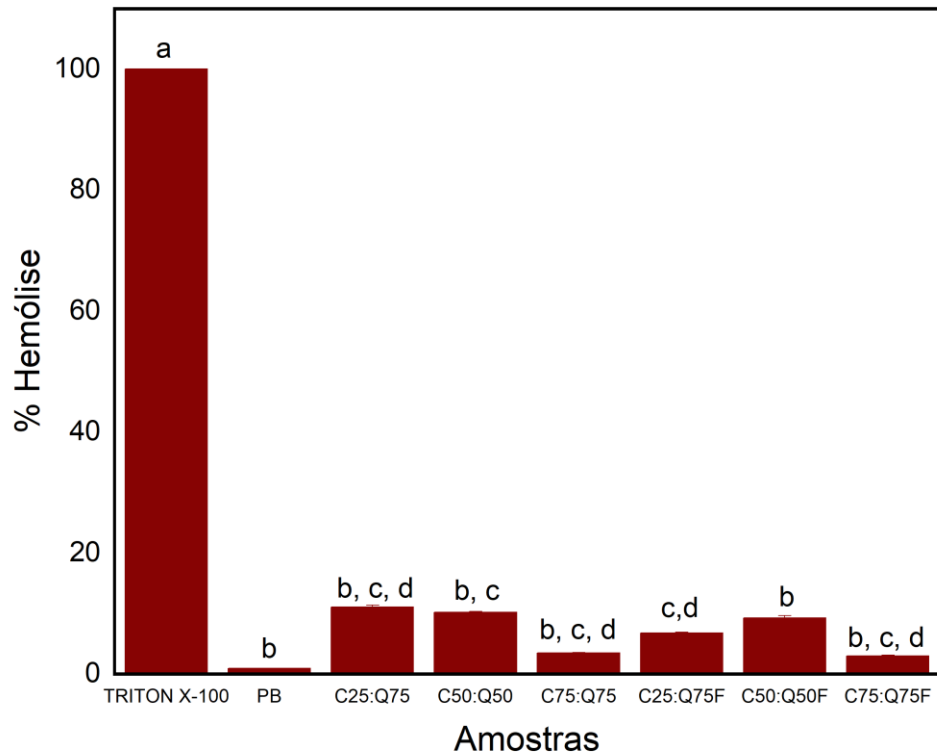


Figura 27: Atividade hemolítica das amostras comparadas com as matrizes poliméricas puras, com o controle negativo (PB) e o controle positivo (Triton-X) (letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha < 0.05$), Tukey e Anova). Fonte: Autor.

Tabela 6: Porcentagem de hemólise dos biomateriais comparadas ao controle positivo (triton X-100) e negativo (PB). Fonte: Autor.

AMOSTRAS	ATIVIDADE HEMOLÍTICA (%)
TRITON X-100	100
PB	0,915
C25:Q75	11,1
C25:Q75F	6,74

C50:Q50	10,2
C50:Q50F	9,28
C75:Q25	3,49
C75:Q25F	2,99

A interação entre os eritrócitos e as matrizes poliméricas apresentaram atividades inferiores a 11,5% (tabela 4). As matrizes poliméricas puras, amostra C25:Q75, C50:Q50 e C75:Q25, exibiram atividade hemolítica de 11,1, 10,2 e 3,49% respectivamente. Em relação a hemocompatibilidade da quitosana, estudos sugerem que este polímero pode induzir a uma resposta trombogênica ou hemolítica devido as interações dos grupos amino livres da quitosana com as proteínas sanguíneas. Neste caso, a porcentagem de hemólise aumentou linearmente com a adição de quitosana no biomaterial. Com a adição de colágeno, os grupos carboxílicos dessa proteína carregados negativamente neutralizaram essas cargas positivas da quitosana, a resposta hemolítica pode ser atribuída devido as ligações eletrostáticas e de hidrogênio da matriz polimérica (BALAN; VERESTIUC, 2014; SOCRATES et al., 2019).

A adição de cfx nas matrizes com diferentes proporções de colágeno e quitosana diminuíram a atividade hemolítica dos biomateriais. Em ambas as condições as amostras sofreram baixa porcentagem de hemólise, não sofrendo a degradação severa dos eritrócitos.

As amostras C75:Q25 e C75:Q25F apresentaram valores de porcentagem de hemólise inferiores a 5%, o que está dentro dos limites aceitáveis para um biomaterial, estabelecidos por Autian (1975). Os resultados informam que os biomateriais C75:Q25 e C75:Q25 apresentaram atividade hemolítica aceitável para aplicações como um curativo para feridas na engenharia de tecidos.

6 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo verificou-se a influência da composição na estrutura, nos parâmetros cinéticos e nos perfis de liberação das matrizes a base de colágeno e quitosana. As amostras com menor porcentagem de quitosana e incorporadas com cfx apresentaram melhores resultados para aplicação como biomaterial.

Com base nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, avaliou-se que a adição de quitosana influenciou na morfologia das amostras.

A modelagem matemática forneceu informações relevantes dos parâmetros cinéticos n e k , onde as amostras seguem a cinética de fick, onde a velocidade da difusão das moléculas de fármaco é menor que a velocidade de dissolução permitindo a liberação lenta da ceftriaxona.

O halo de inibição confirmou que não houve crescimento de *S. aureus* nas amostras incorporadas com ceftriaxona e na quitosana pura, indicando que a carga do fármaco dentro da matriz polimérica dificulta a adesão de bactérias.

A atividade hemolítica não apresentou toxicidade para os eritrócitos, indicando a possível aplicação para o desenvolvimento de biomateriais na engenharia de tecidos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a possibilidade de aplicação como um biomaterial, trabalhos futuros podem ser realizados com o intuito de avaliar a eficiência neste estudo. Dentre eles: Ensaaios para avaliar o seu comportamento mecânico, como módulo de tração e elasticidade, tensão máxima de tração e deformação dos biomateriais a base de colágeno e quitosana. Estudos biológicos *in vitro* utilizando células para verificar a biocompatibilidade e estudos *in vivo* para avaliar a atividade cicatrizante de lesões das matrizes poliméricas.

8 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, L. C. et al. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 87B, n. 1, p. 264–285, 1 out. 2008.
- ABRAMOVIĆ, B. F. et al. Experimental and computational study of hydrolysis and photolysis of antibiotic ceftriaxone: Degradation kinetics, pathways, and toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144991, 10 maio 2021.
- ABRAMOVIĆ, B. F.; UZELAC, M. M.; FINČUR, N. L. Photocatalytic degradation of thiotriazinone, stable hydrolysis product of antibiotic ceftriaxone. **Acta Periodica Technologica**, v. 50, n. 50, p. 1–11, 2019.
- ACOSTA, N. et al. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 145–153, 1 jan. 1993.
- ADEKOGBE, I.; GHANEM, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7241–7250, 1 dez. 2005.
- ALAGHA, A.; NOURALLAH, A.; HARIRI, S. Characterization of dexamethasone loaded collagen-chitosan sponge and in vitro release study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101449, 1 fev. 2020.
- ALÉSSIO, P. V. DE. ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE CEFTRIAXONA SÓDICA. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**. p. 1-114, 24 fev. 2012.
- ALEXANDRE, A. C. S.; FARIA, C. R.; SANTOS, L. J. DOS. Otimização da extração de colágeno a partir de tendões bovinos pela metodologia de superfície de resposta / Optimization of conditions for extraction of collagen from bovine tendon by response surface methodology. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 38–48, 30 dez. 2017.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2227–2236, 7 jul. 2010.

- ANDONEGI, M. et al. Structure-properties relationship of chitosan/collagen films with potential for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 237, p. 116159, 1 jun. 2020.
- ARMAKOVIĆ, S. J. et al. Photocatalytic degradation of 4-amino-6-chlorobenzene-1,3-disulfonamide stable hydrolysis product of hydrochlorothiazide: Detection of intermediates and their toxicity. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 916–924, 1 fev. 2018.
- AUTIAN, J. Biological Model Systems for the Testing of the Toxicity of Biomaterials. p. 181–203, 1975.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, v. 53, n. 1, p. 171–188, 1 abr. 2014.
- BARNES, M. J.; KNIGHT, C. G.; FARNDAL, R. W. The collagen-platelet interaction. **Current Opinion in Hematology**, v. 5, n. 5, p. 314–320, 1 set. 1998.
- BROWN, M. A.; DAYA, M. R.; WORLEY, J. A. Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System. **Journal of Emergency Medicine**, v. 37, n. 1, p. 1–7, 1 jul. 2009.
- BULMUS, V. A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 93, n. 2, p. 105–120, 5 dez. 2003.
- C TANGSADTHAKUN, S. K. N. S. T. B. S. D. Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. **Journal of metals, materials and minerals**, v. 16, n. 1, p. 37–44, 1 nov. 2006.
- CHEN, J. P.; CHANG, G. Y.; CHEN, J. K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 313–314, p. 183–188, 1 fev. 2008.
- CRISTINA, R. Collagen and Its Derivatives: Characteristics and Applications in Meat Products. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 1, p. 65–74, 2013.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 1 abr. 2013.
- DE CASTRO, K. C. et al. Obtention and Characterization of Collagen and Chitosan Based Cements for Bone Regeneration. Part 1: Extraction and Characterization of Collagen. **Materials Science Forum**, v. 775–776, n. November, p. 29–33, 2014.

- DE LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.
- DENKBAS, E. B.; OTTENBRITE, R. M. Perspectives on: Chitosan Drug Delivery Systems Based on their Geometries. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, n. 4, p. 351–368, 26 jul. 2006.
- DOS SANTOS ALVES, K. A velocidade da difusão das moléculas de fármaco do interior para o interior da matriz hidrofóbica do polimérica é menor que a velocidade de dissolução permitindo a liberação lenta do fármaco. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, p. 1-100, 24 fev. 2008.
- EBRAHIMI, S. et al. Enhanced bactericidal effect of ceftriaxone drug encapsulated in nanostructured lipid carrier against gram-negative Escherichia coli bacteria: Drug formulation, optimization, and cell culture study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 28, 10 fev. 2020.
- EL-BAGARY, R. I. et al. Stability Indicating Chromatographic Methods For Simultaneous Determination of Ceftriaxone Sodium and Sulbactam Sodium in their Combined Dosage Form. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 14, n. 5, p. 461–474, 3 jul. 2018.
- EL-SHABOURY, S. R. et al. Analysis of cephalosporin antibiotics *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **Elsevier**, p. 1-19, 21 set. 2007.
- FERNANDES, L. L. et al. Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. **Polimeros**, v. 21, n. 1, p. 1–6, 2011.
- FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45(2), p. 113–136, 1998.
- FUJIOKA, K. Protein release from collagen matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 247–266, 1998.
- GAUTIERI, A. et al. Viscoelastic properties of model segments of collagen molecules. **Matrix Biology**, v. 31, n. 2, p. 141–149, 1 mar. 2012.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Biomaterials Market Size Worth \$348.4 Billion By 2027**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biomaterials-market>>. Acesso em: 5 maio. 2020.
- GRUND, S.; BAUER, M.; FISCHER, D. Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 3, p. B61–B87, 1 mar. 2011.

- GUO, R. et al. Collagen-cellulose nanocrystal scaffolds containing curcumin-loaded microspheres on infected full-thickness burns repair. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 12, p. 3544–3555, 1 dez. 2017.
- GUO, S. et al. Enhanced effects of electrospun collagen-chitosan nanofiber membranes on guided bone regeneration. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 2, p. 155–168, 22 jan. 2019.
- GUO, Z. et al. Fabrication of silver-incorporated TiO₂ nanotubes and evaluation on its antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 137, p. 464–467, 15 dez. 2014.
- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874–875, 1 out. 1961.
- HUBBELL, J. A. **Biomaterials in tissue engineering** *Bio/Technology*, Nature Publishing Group, v.13, p. 565-576, 1995.
- HUSSAIN, K. et al. Synthesis of pH responsive, photocrosslinked gelatin-based hydrogel system for control release of ceftriaxone. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 238, p. 105101, 1 ago. 2021.
- ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering *Journal of Polymers and the Environment*, **Springer New York LLC**, v.25, p. 854-866, 1 set. 2017.
- JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review *Carbohydrate Polymers*, **Elsevier**, v. 2, p. 227-232, 5 set. 2010.
- KACZMAREK, B.; SIONKOWSKA, A.; OSYCZKA, A. M. Physicochemical properties of scaffolds based on mixtures of chitosan, collagen and glycosaminoglycans with nano-hydroxyapatite addition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1880–1883, 15 out. 2018.
- KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **Elsevier**, v. 3, p. 420-430, 1 mar. 2009.
- KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–6084, dez. 2004.
- KUMAR, S. et al. Synthesis and optimization of ceftriaxone-loaded solid lipid nanocarriers. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 200, p. 126–132, 1 out. 2016.
- LEEDY, M. R. et al. Use of chitosan as a bioactive implant coating for bone-implant applications. **Advances in Polymer Science**, v. 244, n. 1, p. 129–166, 2011.

- LI, Q. et al. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, n. 4, p. 370–397, 26 out. 1992.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.
- ME NIMNI, R. H. Collagen: Biochemistry, biomechanics, biotechnology, **United States**. N. p., 1988. Web.
- MUTHUKUMAR, T. et al. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 207–212, 1 jan. 2014.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone *Carbohydrate Polymers*, **Elsevier**, v. 2, p. 167-182, 17 mar. 2009.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 8-9, p. 762-798, 1 ago. 2007.
- O'BRIEN, F. J. **Biomaterials & scaffolds for tissue engineering** *Materials Today*, Elsevier, v. 14, p. 88-95, 1 mar. 2011.
- OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249–252, 15 ago. 2002.
- PAKRAVAN, M.; HEUZEY, M. C.; AJJI, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. **Polymer**, v. 52, n. 21, p. 4813–4824, 29 set. 2011.
- PALANIVELU, R.; RUBAN KUMAR, A. Synthesis, characterization, in vitro anti-proliferative and hemolytic activity of hydroxyapatite. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 434–438, 2014.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 16 mar. 2010.
- PARK, P. J. et al. Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 5, p. 529–533, 28 out. 2004.
- PEPPAS, N. A.; LANGER, R. New challenges in biomaterials. **Science**, v. 263, n. 5154, p. 1715–1720, 25 mar. 1994.
- PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems *Journal of Controlled Release*, **Elsevier**, v. 190, p. 75-81, 28 set. 2014.

- PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 22 dez. 1989.
- PEREZ-PUYANA, V. et al. Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 262–269, 15 out. 2019.
- RAHMAN, S. et al. Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone. **Progress in Biomaterials 2019 8:3**, v. 8, n. 3, p. 137–154, 29 maio 2019.
- REZAILI, M.; ORYAN, S.; JAVERI, A. Curcumin nanoparticles incorporated collagen-chitosan scaffold promotes cutaneous wound healing through regulation of TGF- β 1/Smad7 gene expression. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 347–357, 1 maio 2019.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1 jun. 1987a.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1 jun. 1987b.
- RUSZCZAK, Z.; FRIESS, W. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1679–1698, 28 nov. 2003.
- SATISH KUMAR, T.; VIJAYA RAMU, D.; SAMPATH KUMAR, N. S. Preparation and characterization of biodegradable collagen-Chitosan scaffolds. **Materials Today: Proceedings**. Elsevier, v. 19, n. 6, p. 2587-2590, 1 jan. 2019.
- SIN MUN, L. et al. Lau Sin Mun, Masrina Mohd Nadzir, Shiplu Roy Chowdhury, Mohd Fauzi Mh Busra, Azlina Harun Kamaruddin, Gong Wee Jie. **Article in International Journal of ADVANCED AND APPLIED SCIENCES**, v. 6, n. 12, p. 58–66, 2019.
- SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, 1 fev. 2004.
- SIONKOWSKA, A.; KACZMAREK, B. Preparation and characterization of composites based on the blends of collagen, chitosan and hyaluronic acid with nano-

hydroxyapatite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 658–666, 1 set. 2017.

SIONKOWSKA, A.; KACZMAREK, B.; GADZALA-KOPCIUCH, R. Gentamicin release from chitosan and collagen composites. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 353–359, 1 out. 2016.

SIZELAND, K. H. et al. Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures. **Materialia**, v. 3, p. 90–96, 1 nov. 2018.

SOCRATES, R. et al. Biomimetic fabrication of mineralized composite films of nanosilver loaded native fibrillar collagen and chitosan. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 357–366, 1 jun. 2019.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial Action of Chitosan. **Food Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 257–272, 1992.

TARAVEL, M. N.; DOMARD, A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. **Biomaterials**, v. 14, n. 12, p. 930–938, 1 out. 1993.

TARAVEL, M. N.; DOMARD, A. Collagen and its interaction with chitosan. II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. **Biomaterials**, v. 16, n. 11, p. 865–871, 1 jul. 1995.

TARAVEL, M. N.; DOMARD, A. Collagen and its interactions with chitosan: III. Some biological and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 17, n. 4, p. 451–455, 1 fev. 1996.

TELI, M. D.; SHEIKH, J. Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1195–1200, 1 jun. 2012.

TONHI, E.; DE GUZZI PLEPIS, A. M. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 943–948, nov. 2002.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–3198, 1999.

VALENZUELA-ROJO, R. D. et al. Antibacterial, mechanical and physical properties of collagen - chitosan sponges from aquatic source. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, p. 100218, 1 mar. 2020.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Development of a Flax/Polypropylene Composite with Optimal Mechanical Characteristics by Fiber and Matrix Modification. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 15, n. 4, p. 281–300, 18 jul. 2002.

WANG, X. H. et al. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3213–3220, 1 ago. 2003.

YANG, L. et al. Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 955–962, 1 mar. 2008.

YOUNES, I. et al. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, 18 ago. 2014.