



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
PROCESSOS**

**ELIZA JULIANA DA COSTA EULÁLIO**

**MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUERCETINA PARA APLICAÇÃO  
EM ULCERAÇÕES EPITELIAIS: DESENVOLVIMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO.**

**CAMPINA GRANDE-PB  
2016**

**ELIZA JULIANA DA COSTA EULÁLIO**

**MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUERCETINA PARA APLICAÇÃO  
EM ULCERAÇÕES EPITELIAIS: DESENVOLVIMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO.**

Trabalho de tese apresentado à Banca Examinadora do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

ORIENTADOR: Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

**CAMPINA GRANDE-PB  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- C957p Eulálio, Eliza Juliana da Costa.  
Membranas de quitosana e quercetina para aplicação em  
ulcerações epiteliais : desenvolvimento e caracterização / Eliza  
Juliana da Costa Eulálio – Campina Grande-PB, 2016.  
156. il. color.
- Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade  
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia,  
2016.  
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".  
Referências.
1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Quercetina. 4. Feridas  
Diabéticas. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.
- CDU 620.1:616-7(043.2)

ELIZA JULIANA DA COSTA EULÁLIO

MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUERCETINA PARA  
APLICAÇÃO EM ULCERAÇÕES EPITELIAIS: DESENVOLVIMENTO  
E CARACTERIZAÇÃO.

Tese Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

*Marcus Vinicius Lia Fook*

Prof.<sup>o</sup>. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
(Orientador/ UFCG)

*Adriana Lima de Holanda*

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Adriana Lima de Holanda  
(Examinadora Externa/ FCM-CG)

*Carmem Dolores de Sá Catão*

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Carmem Dolores de Sá Catão  
(Examinadora Externa/ UFCG)

*Maria Roberta de Oliveira Pinto*

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Roberta de Oliveira Pinto  
(Examinadora Externa/ UEPB)

*Rossemberg Cardoso Barbosa*

Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>o</sup>. Rossemberg Cardoso Barbosa  
(Examinador/ Pesquisador UAEMA/ UFCG)

CAMPINA GRANDE-PB  
2016

Dedico este trabalho à minha família, pelo estímulo, carinho e compreensão dispensados neste momento da minha vida, em especial a minha filha Luiza e ao meu filho João Rafael, por serem as estrelas que iluminam e que muito me fortaleceram para concluir esse ciclo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser presença constante na minha vida, por nunca me desamparar em momentos difíceis, pela força, garra e determinação concedidos para vencer os obstáculos e estar aqui neste momento.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcus Vinícius Lia Fook pela oportunidade, incentivo, amizade e por acreditar e confiar em minha capacidade de desenvolver esse trabalho.

Ao meu co-orientador, Rossemberg Cardoso pela paciência, amizade, cooperação e auxílio indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Lima de Holanda, Carmem Dolores de Sá Catão, Maria Roberta Dias Oliveira, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas ricas contribuições dadas para refinamento desta tese.

A minha mãe Ana Lúcia, minha musa inspiradora, peça fundamental nesta trajetória, que nunca mediu esforços na educação dos filhos e hoje se dedica a criação da minha filha Luiza, me substituindo em muitos momentos de ausência, necessários para conclusão deste processo.

Ao meu esposo Raphael, amigo, incentivador e companheiro desde o início desta jornada, que esteve sempre na torcida, com pensamentos e palavras positivas.

À minha filha Luiza, minha estrelinha responsável pelos meus sorrisos mais verdadeiros, por me apresentar o amor mais sublime e intenso e por ser através dele que me fortaleci em muitos momentos para concluir esta etapa. E ao meu filho João Rafael, que me deu uma energia indescritível para que eu obtivesse o êxito esperado.

Aos meus irmãos Priscila e Rostand pela força, carinho, apoio e presença constante em minha vida.

A minha amiga Karina pela amizade, pelas palavras de incentivo e apoio.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos pelo conhecimento adquirido neste processo de doutoramento.

A todos os técnicos do laboratório pela realização dos ensaios de caracterização.

Ao Grupo de Biomateriais da UFCG pelos conhecimentos compartilhados, saibam que, de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho, em especial a Isabella Almeida que me auxiliou em alguns experimentos nos quais não pude estar presente devido à gestação.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

**INTRODUÇÃO** A Diabetes Mellitus consiste em uma doença crônica que aumenta entre brasileiros, tendo direta relação com os fatores de risco do mundo moderno. A principal complicação desta patologia são as úlceras, de difícil tratamento, pela cicatrização lentificada e pela ineficácia de alguns curativos. O avanço na área dos Biomateriais tem favorecido o desenvolvimento de produtos com tal finalidade, sendo a quitosana um polímero promissor e de extrema relevância, que pode ter sua ação terapêutica potencializada com a incorporação de fármacos, a exemplo da quercetina, um flavonóide com função anti-inflamatória comprovada. **OBJETIVO** Desenvolver membranas de quitosana incorporadas com quercetina, para uso em pacientes com ulcerações epiteliais, em especial, para aplicação em feridas diabéticas. **METODOLOGIA** Esta pesquisa foi desenvolvida no Certbio (UFCG), classificada como experimental, foram produzidas 500 membranas, obtidas nas duas fases do trabalho: Fase Exploratória e Fase Experimental. Os dados foram analisados através da estatística descritiva, após os ensaios de caracterização: MEV, EDS, FTIR, DRX, Termogravimetria (Tg), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Ensaio de Citotoxicidade. **RESULTADOS** Os resultados da Fase Exploratória evidenciaram que, embora houvesse a incorporação da quercetina na matriz polimérica da quitosana, o contato desta com a solução básica (Hidróxido de Sódio e Hidróxido de Amônio) resultou na formação de um sal, confirmado após observação dos outros ensaios, houve também a formação de aglomerados devido a concentração elevada de fármaco, concluindo-se que não apresentaram características potenciais para aplicabilidade do produto em feridas diabéticas. Os resultados da Fase Experimental evidenciaram incorporação de quercetina na matriz da quitosana, em ambas as metodologias (X e Y), contudo na que houve reticulação em TPP (X), o fármaco ficou disperso homogeneamente, os difratogramas revelaram alteração da cristalinidade da membrana com a presença da quercetina, reforçando a interação entre ambos. As análises de TG e de DSC evidenciaram que a reticulação em TPP alterou o comportamento térmico da membrana de quitosana/quercetina, aumentando a estabilidade do compósito e a quercetina contribuiu, de forma discreta, para as alterações das curvas de calor. O ensaio de citotoxicidade apontou que as membranas com TPP têm viabilidade para serem utilizadas como biomaterial. **CONCLUSÕES** Concluiu-se, que a metodologia considerada válida e eficaz para a obtenção de membranas de quitosana/quercetina, foi a X, onde houve a reticulação em TPP, com potencial para ser testada *in vivo* e contribuir para regeneração tecidual e o combate ao processo inflamatório presente nas feridas diabéticas. Sugere-se que, novos ensaios sejam realizados, a fim de aprimorar algumas das características finais do produto, contudo parâmetros fundamentais das variáveis já foram estabelecidos nesse estudo.

Palavras-chave: 1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Quercetina 4. Feridas Diabéticas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** to Diabetes Mellitus is a chronic disease which is increasing among the Brazilians; it is directly related to the modern world risk factors. The main complications of this disease are ulcers, hard treatment, slowed healing and the ineffectiveness of some curatives. The advance in the field of biomaterials has favored the development of products for this purpose, chitosan is a promising and very relevant polymer, which may have its enhanced therapeutic action with the incorporation of drugs, such as quercetin, a flavonoid with a proven anti-inflammatory function. **OBJECTIVE** Developing chitosan membranes incorporated with quercetin, for use in patients with epithelial ulcerations, in particular for use in diabetic wounds. **METHODOLOGY** The present research was developed in Certbio (UFCG), it was classified as experimental and it was produced 500 membranes obtained in the two work phases: Exploratory and Experimental phases. Data were analyzed using descriptive statistics, after the characterization tests: SEM, EDS, FTIR, XRD, thermogravimetry (Tg), Analysis of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Cytotoxicity Assay. **RESULTS** The results of the exploration phase showed that although there was the incorporation of quercetin in the polymer matrix of chitosan, its contact with the basic solution (Sodium Hydroxide and Ammonium Hydroxide) resulted in the formation of a salt, confirmed after observation of other tests, there was also the formation of agglomerates due to the drug high concentration. It was concluded that it showed no potential features for the applicability of the product in diabetic wounds the results from experiment showed quercetin incorporated in the chitosan matrix in both methodologies (X and Y), but there was the crosslinking of TPP (X), the drug was dispersed homogeneously, the diffraction showed crystallinity change of membrane in the presence of quercetin, strengthening the interaction between them. The analysis of TG and DSC showed that crosslinking in TPP changed the thermal behavior of the membrane of chitosan / quercetin, increasing the stability of the composite and quercetin contributed discreetly to changes in heat curves. The cytotoxicity assay showed that membranes with TPP have the possibility to be used as a biomaterial. **CONCLUSIONS** It was concluded that the methodology considered valid and effective for obtaining chitosan membranes / quercetin was X, where there was crosslinking in TPP, with the potential to be tested in vivo and contribute to tissue regeneration and combating inflammatory process present in diabetic wounds. It is suggested that new tests are carried out in order to improve some of the final characteristics of the product, however basic parameters of the variables have already been established in this study.

Keywords: 1. Biomaterials. 2. Chitosan. 3. Quercetin 4. Diabetic Wounds.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 6 - Estruturas da pele.....	28
Figura 7 - Processo inflamatório das feridas. ....	31
Figura 8 - Fase proliferativa: angiogênese e epitelização.....	32
Figura 9 - Fatores que retardam a cicatrização. ....	33
Figura 10 - Fármacos usados na cicatrização de feridas. ....	34
Figura 11 - Diversas aplicações da quitosana. ....	37
Figura 12 - Aplicação da quitosana na área biomédica. ....	38
Figura 13 - Estrutura química da Quitosana. ....	39
Figura 14 - Estrutura química da Quitina. ....	39
Figura 15 - Desacetilização da quitina originando a quitosana.....	39
Figura 16 - Estrutura básica dos flavonóides.....	47
Figura 17 - Principais classes de flavonóides e descrição de suas características básicas.....	48
Figura 18 - Estrutura química da quercetina. ....	49
Figura 19 - Fontes de quercetina. (a) Alimentos ricos em quercetina; (b) Arinca Montana; (c) Quercetina pó/ forma industrializada. ....	50
Figura 20 - Processo de preparação da solução de quitosana.....	59
Figura 21 - Adição de NaOH na solução de quitosana (a); separação da quitosana: uma quitosana neutralizada e uma não neutralizada (b). ....	60
Figura 22 - Pesagem das concentrações de quercetina.....	61
Figura 23 - Adição da quercetina na solução de quitosana neutralizada, seguida da agitação magnética. ....	61
Figura 24 - Finalização das membranas tipo A. ....	62
Figura 25 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo A. ....	63
Figura 26 – Solução de quitosana/ quercetina das membranas tipo B, à esquerda; solução das membranas tipo A, à direita.....	64
Figura 27 - Processo de neutralização com NaOH das membranas do tipo B. ....	65

Figura 28 - Lavagem das membranas do tipo B após neutralização com NaOH.....	65
Figura 29 - Processo de secagem das membranas do tipo B. ....	66
Figura 30 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo B. ....	66
Figura 31 - Processo de agitação magnética da solução e evaporação do metanol.	68
Figura 32 - Solução final (quitosana/ quercetina/ metanol) (a) e dispensação em placas petri (b). ....	68
Figura 33 - Processo de neutralização por atmosfera de amônia das membranas tipo C. ....	69
Figura 34 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo C. ....	70
Figura 35 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo D. ....	71
Figura 36 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo E. ....	74
Figura 37 - Membranas tipo E finalizadas. ....	75
Figura 46 - Micrografia da Quercetina em pó com aumento de 1000X (a) e 5000X (b). ....	77
Figura 47 - MEV da Membrana QQ 20mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X. ....	78
Figura 48 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg. ....	78
Figura 49 - MEV da Membrana QQ 30mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X. ....	79
Figura 50 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg. ....	79
Figura 51 - MEV da Membrana QQ 50mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X. ....	80
Figura 52 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 50mg. ....	80
Figura 53 - MEV da Membrana QQ 20mg (+) - a) 1000 X, b) 5000X. ....	81
Figura 54 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg. ....	81
Figura 55 - MEV da Membrana QQ 30mg (+) - a) 1000 X, b) 5000X. ....	82

Figura 56 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg.....	82
Figura 57 - MEV da Membrana QQM 20mg - a) 1000 X, b) 5000X. ....	83
Figura 58 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg.....	84
Figura 59 - MEV da Membrana QQM 30mg - a) 1000 X, b) 5000X. ....	84
Figura 60 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg.....	85
Figura 61 - MEV da Membrana QQM 50 mg - a) 1000 X, b) 5000X. ....	85
Figura 62 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 50mg.....	86
Figura 63 - Espectro da quercetina. ....	87
Figura 64 - Espectro da quitosana. ....	89
Figura 65 - Espectros das membranas de quitosana A (N) e B (+) e do acetato de sódio (b).....	90
Figura 66 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 20 mg. ....	91
Figura 67 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 30 mg. ....	92
Figura 68 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 50 mg. ....	93
Figura 69 - Difratoograma de raios X para (a) JCPDS 43-1695 e (b) fármaco quercetina. ....	94
Figura 70 - Difratoograma da quercetina.....	95
Figura 71 - Difratoograma da quitosana.....	95
Figura 72 - Difratoograma das membranas de quitosana.....	96
Figura 73 - Difratoogramas das membranas obtidas pela metodologia A.....	97
Figura 74 - Difratoogramas das membranas obtidas pela metodologia B.....	98
Figura 75 - Difratoogramas das membranas obtidas pela metodologia C. ....	99
Figura 76 - Difratoogramas das membranas obtidas pela metodologia D. ....	100
Figura 39 - Finalização das membranas e preparação para secagem. ....	105
Figura 40 - Observação das membranas que não secaram e a formação de aglomerados. ....	105

Figura 41 - Membranas tipo X (a) finalizadas e protegidas da luz (b).....	106
Figura 42 - Procedimento de reticulação da membrana de quitosana/ quercetina.	107
Figura 43 - Imersão das membranas em TPP e etapas subsequentes. ....	108
Figura 44 - Preparação das membranas X para o processo de secagem. ....	109
Figura 45 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipos X e Y. ....	110
Figura 77 - Microscopia Eletrônica de Varredura da Membrana QUIX – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X. ....	111
Figura 78 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana Tipo X. ....	112
Figura 79 - Micrografias das membranas quitosana/ quercetina denominadas: QQ2 (mg) X – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X; QQ5 (mg) X – d) 500 X, e) 1000 X e f) 3000X; QQ10 (mg) X – g) 500 X, h) 1000 X e i)3000 X.....	113
Figura 80 - EDS e Percentual de Massa das membranas: QQ2 X – a); QQ5 X – b); QQ10 X- c).....	114
Figura 81 - MEV da Membrana QUI Y – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X. ....	115
Figura 82 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana Tipo Y. ....	116
Figura 83 - Micrografias das membranas quitosana/ quercetina denominadas: QQ2 (mg) Y – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X; QQ5 (mg) Y – d) 500 X, e) 1000 X e f) 3000X; QQ10 (mg) Y – g) 500 X, h) 1000 X e i)3000 X.....	117
Figura 84 - EDS e Percentual de Massa das membranas híbridas: QQ2 (mg) Y – a); QQ5 (mg) Y – b); QQ10 (mg) Y- c). ....	118
Figura 85 - Espectros do TPP. ....	119
Figura 86 - Espectros das membranas desenvolvidas pela Metodologia X: QUI X (a); QQ2 (mg) X; QQ5 (mg) X; QQ10 (mg) X.....	120
Figura 87 - Espectros das membranas desenvolvidas pela Metodologia Y: QUI Y (a); QQ2 (mg) Y; QQ5 (mg) Y; QQ10 (mg) Y.....	122
Figura 88 - Difractogramas das membranas obtidas pela metodologia X: quitosana X (a); quitosana/ quercetina 2 mg (b); quitosana/ quercetina 5 mg (c); quitosana/ quercetina 10 mg (d).....	124
Figura 89 - Difractogramas das membranas obtidas pela metodologia Y: quitosana Y (a); quitosana/ quercetina 2 mg (b); quitosana/ quercetina 5 mg (c); quitosana/ quercetina 10 mg (d).....	125

Figura 90 - Difratoograma do Acetato de Quitosana. ....	126
Figura 91 - Análise termogravimétrica da membrana de quitosana X. ....	127
Figura 92 - Análise TG das membranas do tipo QQ2 (mg) X; QQ5 (mg) X e QQ10 (mg) X. ....	128
Figura 93 - Análise termogravimétrica da membrana do tipo quitosana tipo Y. ....	131
Figura 94 - Análise termogravimétrica das membranas QQ2 mg (a); QQ5 mg (b) e QQ10 mg (c). ....	132
Figura 95 - Análise de DSC das membranas de quitosana obtidas pela metodologia X (a) e Y (b). ....	135
Figura 96 - Análise de DSC das membranas de quitosana/ quercetina obtidas pela metodologia X: quitosana/ quercetina 2 mg (a); quitosana/ quercetina 10 mg (b). .	136
Figura 97 - Análise de DSC das membranas de quitosana/ quercetina obtidas pela metodologia Y: quitosana/ quercetina 2 mg (a); quitosana/ quercetina 10 mg (b). .	138
Figura 98 - Viabilidade celular dos macrófagos: QUI X; QUI 10X; QUI Y; QUI 10Y. ....	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de Neuropatias desenvolvidas no paciente com Diabetes. ....	23
Tabela 2 - Avaliação e classificação das úlceras do pé diabético. ....	27
Tabela 3 - Características da quercetina. ....	49
Tabela 11 - Bandas de absorção da quitosana e quercetina. ....	57
Tabela 4 - Membranas de quitosana neutralizada incorporadas com quercetina através do método A. ....	62
Tabela 5 – Membranas de quitosana incorporadas com quercetina e neutralizadas em placa através do método B. ....	64
Tabela 6 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina em metanol, e neutralizadas em atmosfera de amônia através do método C. ....	67
Tabela 7 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina/ metanol, não neutralizadas, através do método D. ....	71
Tabela 8 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina em metanol, através do método E. ....	73
Tabela 12 - Atribuições de frequências vibracionais observadas na quercetina. ....	87
Tabela 13 - Bandas de absorção no FTIR da quercetina. ....	88
Tabela 14 - Bandas de absorção no FTIR da quitosana. ....	89
Tabela 9 - Relação quercetina/ácido acético utilizada para obtenção das membranas X e Y. ....	104
Tabela 15 - Principais picos de difração de raios-X da quercetina. ....	125
Tabela 16 - Temperatura de pico e perda de massa total obtida pela curva TG das membranas X. ....	130
Tabela 17 - Temperatura de pico obtida pela curva TG das membranas Y. ....	133
Tabela 18 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana X e Y obtidos por DSC. ....	136
Tabela 19 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana/ quercetina do tipo X obtidos por DSC. ....	137
Tabela 20 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana/ quercetina do tipo Y obtidos por DSC. ....	139

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Observações preliminares vistas no desenvolvimento das membranas de quitosana incorporadas em quercetina através das metodologias A, B, C e D.....	72
Quadro 2 - Síntese das variáveis trabalhadas nas metodologias A, B, C, D e E. ....	76
Quadro 3 - Codificação das Membranas de quitosana/ quercetina. ....	107

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DO DIABETES MELLITUS.....	21
3.2	ÚLCERAS DIABÉTICAS .....	25
3.3	PELE .....	28
3.4	O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO .....	29
<b>3.4.1</b>	<b>Fase Inflamatória</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Fase Proliferativa</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Fase Reparadora, Maturação e Remodelação Tecidual</b> .....	<b>32</b>
3.5	CONDUTAS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DE ÚLCERAS .....	34
3.6	QUITOSANA .....	38
<b>3.6.1</b>	<b>Aplicação da Quitosana como um Biomaterial</b> .....	<b>41</b>
3.7	BIOMATERIAIS .....	43
3.8	FLAVONÓIDES .....	46
3.9	QUERCETINA: EFEITOS E PROPRIEDADES .....	48
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>54</b>
4.1	LOCAL DA PESQUISA .....	54
4.4	MATERIAS.....	54
4.5	ETAPAS DA PESQUISA.....	55
4.6	PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	55
4.7	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	55
<b>4.7.1</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>55</b>



4.7.2	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	56
4.7.3	Difração de Raios X (DRX) .....	56
4.7.4	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	56
4.7.5	Estudo Térmico: curva de TG e DSC.....	57
4.7.6	Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos .....	58
5	FASE EXPLORATÓRIA.....	59
5.1.1	Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo A .....	59
5.1.2	Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo B .....	63
5.1.3	Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo C .....	67
5.1.4	Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo D .....	70
5.1.5	Método proposto para o desenvolvimento das membranas Tipo E73	
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO: FASE EXPLORATÓRIA .....	76
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) .....	77
5.2.2	Micrografias das Membranas Tipo A.....	77
5.2.3	Micrografias das Membranas Tipo B.....	80
5.2.4	Micrografias das Membranas Tipo C.....	83
5.2.5	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	86
5.2.6	Espectros das Membranas de Quitosana Tipo A e Tipo B .....	89
5.2.7	Espectroscopia por Difração de Raios X .....	94
6	FASE EXPERIMENTAL.....	104
6.1	MÉTODOS.....	104
6.1.1	Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo X e Y .....	104
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO: FASE EXPERIMENTAL .....	111
6.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) .....	111

<b>6.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Ftir) .....</b>	<b>119</b>
<b>6.2.3 Espectroscopia por Difração de Raios X.....</b>	<b>123</b>
<b>6.2.4 Análise Termogravimétrica (Tga).....</b>	<b>126</b>
<b>6.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....</b>	<b>134</b>
<b>6.2.5 Avaliação de Viabilidade Celular dos Macrófagos.....</b>	<b>139</b>
<b>6.3 SÍNTESE DOS RESULTADOS .....</b>	<b>141</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>144</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>146</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são hoje responsáveis por altas taxas de morbidade e de mortalidade em muitos países, constituindo o principal problema de saúde pública e tendo como fatores relacionados ao aumento dessa prevalência, a transição epidemiológica, o tabagismo, os alimentos com altas taxas de gorduras trans e saturadas, o sal e o açúcar em excesso, o sedentarismo, bem como o consumo excessivo de álcool, entre outros (SCHMIDT et al., 2011).

As patologias que fazem parte desse grupo, conforme a Organização Mundial de Saúde – OMS, (2011) são, predominantemente, as doenças cardiovasculares, doenças mentais, hipertensão arterial, câncer, doenças respiratórias crônicas, danos hepáticos e renais e diabetes, responsáveis por gerar impactos múltiplos, em termos de limitação à qualidade de vida, à produtividade e à funcionalidade dos pacientes e também representa um potencializador do aumento dos custos da saúde.

Dados recentes e nacionalmente representativos mostram elevação das taxas do diabetes entre brasileiros de 20 anos de idade ou mais, havendo relação direta com a epidemia da obesidade e o maior acesso a testes diagnósticos (NEIVA, 2013). Existem diversas complicações crônicas do diabetes, dentre as quais se ressalta a insuficiência vascular periférica, a neuropatia periférica e a neuropatia autonômica, que associadas às infecções, são os precursores dos eventos ulcerativos, de gangrena e das amputações nos membros inferiores. Grossi (1998) diz que a presença de úlceras nos pés é a principal causa de internação de pacientes diabéticos e corresponde a 6% das hospitalizações nos Estados Unidos.

A presença de neuropatia periférica predispõe a lesões que terão cicatrização mais lenta, tanto em decorrência das alterações na vascularização periférica quanto das alterações metabólicas que decorrem do diabetes. Como qualquer tipo de úlcera, as que ocorrem no pé diabético poderão ser colonizadas por bactérias que habitam a pele, fazendo com que a ocorrência de infecção seja frequente e o controle desta pelo sistema imune mais difícil, aspectos que predispõem o paciente a morte devido ao risco elevado de sepse (SADER; DURAZZO, 2003).

A escolha do curativo a ser utilizado nessas patologias deve ser baseada em fatores como eficácia, segurança e custo, de forma que o paciente possa mantê-lo e,

assim, conseguir resultado positivo, pois as lesões apresentam cicatrização demorada, na maioria dos casos, que compromete sua qualidade de vida (FRADE et al., 2011).

Os biomateriais são definidos como aqueles materiais não vivos utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico. Muitos deles são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, pois não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica, além de apresentarem disponibilidade ilimitada. Pesquisadores têm mostrado interesse no desenvolvimento e uso de novos materiais capazes favorecer a regeneração tecidual e a melhora da inflamação, a fim de promover a melhora do estado geral da úlcera. (SPIN NETO et al., 2008).

Santos et al (2011) dizem que as coberturas com biomateriais temporários mais utilizados para tratamento de tais enfermidades cutâneas são: hidrogel, curativo com alginato de cálcio, filme de poliuretano, curativo de hidrocolóide, papaína, gaze impregnada de petrolato, gaze impregnada de parafina, apósito absorvente, curativo com nanopartículas de prata, gaze tradicional, etc.

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas três décadas, com aplicações diversas, cabendo ressaltar na área de engenharia tecidual, na qual esta pode ser permeada por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas. Propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, propriedades de adsorção, permitem que esta seja utilizada como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo para liberação controlada de fármaco (SPIN NETO et al., 2008).

A quitosana constitui-se uma um polímero natural que vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênico, além de ser economicamente viável, por ser derivada da carapaça, casca ou caixa de revestimento de crustáceos, um polissacarídeo abundante na natureza e potencialmente eficaz (MUZZARELLI et al., 1997).

A quercetina, semelhante a quitosana, possui propriedades biológicas relevantes, como ação antihipertensiva, antiaterogênica, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica, antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória e é definida como um importante flavonóide, encontrado numa grande quantidade de alimentos como cebola e maçã, de característica lipossolúvel, no entanto, as pesquisas têm focado o potencial antioxidante da quercetina na dieta humana e pouco tem se investigado seu potencial anti-inflamatório (MOON et al., 2008; VICENTINI, 2009).

Baseado no que foi exposto, acredita-se que o desenvolvimento de uma membrana, de quercetina e quitosana, para aplicação tópica sobre as úlceras epiteliais, especificamente para aplicação na ferida do paciente diabético, poderia combater à inflamação e favorecer o estímulo à regeneração tecidual, já que ambas as substâncias possuem aplicações relevantes e comprovada eficácia, e que se trataria de uma pesquisa inédita na área, por agregar dois compostos naturais, considerado de grande valia no âmbito da saúde pública, nos chamados países em desenvolvimento, na busca de conceber um produto terapêutico efetivo para o tratamento de tais patologias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver membranas de quitosana incorporadas com quercetina, para uso em pacientes com ulcerações epiteliais, em especial, para aplicação em feridas diabéticas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver membranas de quitosana e membranas de quitosana-quercetina.
- Caracterizar, morfológicamente e fisico-quimicamente as membranas de quitosana e o complexo quitosa/ quercetina.
- Avaliar a incorporação da quercetina na membrana de quitosana com e sem a presença do Tripolifosfato de Sódio (TPP).
- Desenvolver metodologia válida e eficaz para a confecção das membranas.
- Realizar estudo de citotoxicidade.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DO DIABETES MELLITUS

A prevalência do Diabetes Mellitus (DM) está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em vários países, particularmente nos em desenvolvimento. Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi estimado em 35 milhões para o ano 2000 e projetado para 64 milhões em 2025. Nos países em desenvolvimento, estima-se que o aumento seja observado em todas as faixas etárias, principalmente no grupo de 45-64 anos onde sua prevalência deverá triplicar, duplicando nas faixas etárias de 20-44 e 65, isto é, tornar-se-á um problema de saúde pública inespecífico a faixas etárias mais avançadas, mas sim um mal crônico da população adulta (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

Por ser considerada uma patologia com característica de cronicidade, ela requer maior necessidade de cuidados médicos, em médio e longo prazo, uma vez que está associada a maior incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputações não traumáticas de membros inferiores, constatando-se um crescente número nas hospitalizações por diabetes, em proporções superiores às hospitalizações por todas as causas. Apresenta grande associação com a obesidade, o envelhecimento populacional e história familiar de diabetes, gerando ônus econômico e social, tanto para o indivíduo como para a sociedade, além de incapacitações, perda de produtividade de vida e risco de morte prematura (FREIRE, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) define o Diabetes Mellitus como uma síndrome decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da mesma exercer adequadamente suas ações, caracterizada pela hiperglicemia crônica e alteração no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Os sintomas característicos da doença são: polidipsia, poliúria, alterações visuais, perda de peso, aumento do apetite, impotência sexual, infecções fúngicas na pele e unhas, distúrbios cardíacos e renais, feridas, especialmente nos membros inferiores, que demoram a cicatrizar e neuropatias diabéticas provocadas pelo comprometimento das terminações nervosas (MIRANZI et al., 2008). São vários os fatores de risco

para o desenvolvimento da doença, dentre os quais, destacam-se: idade superior a 45 anos, obesidade, história familiar em parentes de 1º grau, diabetes gestacional, hipertensão arterial sistêmica; alterações prévias de glicemia, etc. (GROSS ET AL., 2002).

O pâncreas produz dois hormônios importantes na regulação da taxa de glicose (açúcar) no sangue: a insulina e o glucagon. A insulina facilita a entrada da glicose nas células (onde ela será utilizada para a produção de energia) e o armazenamento no fígado, na forma de glicogênio. Ela retira o excesso de glicose do sangue, mandando-o para dentro das células ou do fígado. A falta ou a baixa produção de insulina provoca o diabetes, doença caracterizada pelo excesso de glicose no sangue (hiperglicemia). (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

Quanto à classificação, o DM tipo I é responsável por cerca de 5% a 10% de todos os casos, ocorre quando o pâncreas produz pouca ou nenhuma insulina. A instalação da doença ocorre mais na infância e adolescência ou antes dos 30 anos de idade. Há uma destruição das células  $\beta$  pancreáticas e seu tratamento exige o uso de insulina para impedir a cetoacidose diabética (PRATT; CORNELLY, 2006).

Já o DM tipo II é responsável por mais de 90% dos casos de DM, não tem componente autoimune, acontece em geral após os 30 anos, em indivíduos com história familiar positiva. O tratamento em geral envolve dieta e agentes hipoglicemiantes orais, sem necessidade do uso de insulina, que, se necessário, deve ocorrer pelo menos cinco anos após o diagnóstico para configurar que não há dependência como no DM tipo I (KATZUNG, 2006).

O Diabetes Gestacional ocorre durante a gravidez e, na maior parte dos casos, é provocado pelo aumento excessivo de peso da mãe. Há ainda o diabetes associado a outras patologias como as pancreatites alcoólicas, uso de certos medicamentos, etc (NEIVA, 2013).

Uma das alterações mais relevantes observadas na clínica da DM, estão as doenças vasculares, causadoras de considerável morbimortalidade inerentes à doença, afetando quase todos os tecidos corporais, seja em maior ou em menor grau; dentre essas complicações crônicas, uma das mais graves constitui as lesões nos pés, denominada na nomenclatura clínica de *pé diabético* (BRASIL, 2013).

O pé diabético define-se como uma entidade clínica, de base neuropática, induzida pela hiperglicemia sustentada, com prévio traumatismo desencadeante,



que se produz a ulceração do pé; existem dois tipos: o neuropático - cerca de 65% dos casos, e o neuroisquêmico - em 35% dos casos. A “síndrome do pé diabético” engloba um número considerável de condições patológicas, incluindo a neuropatia, a neuroartropatia de Charcot, a ulceração do pé, a osteomielite e, finalmente e potencialmente prevenível, a amputação (DUARTE; GONÇALVES, 2011).

O risco de um diabético desenvolver úlcera de pé ao longo da vida chega a atingir 25% e acredita-se que, a cada 30 segundos, ocorre uma amputação do membro inferior, resultando em aumento da morbidade e da mortalidade, além de ter consequências econômicas substanciais (KATZUNG, 2006).

Dois teorias merecem destaque para elucidar o desencadeamento das neuropatias diabéticas: a **vascular**, na qual a microangiopatia levaria à isquemia, que causaria a lesão do nervo; e a **bioquímica**, na qual o aumento de substâncias tóxicas causaria lesão no nervo, tendo como consequência, o desenvolvimento de tipos de neuropatias, descritos na Tabela 01, segundo Caiafa et al (2011).

Tabela 1 - Tipos de Neuropatias desenvolvidas no paciente com Diabetes.

<b>TIPOS DE NEUROPATIA</b>	<b>QUADRO CLÍNICO</b>
<b>NEUROPATIA MOTORA</b>	Acarreta atrofia muscular do pé, que desencadeia deformidades e alterações dos pontos de pressão na região plantar, sobrecarregando algumas regiões, que com a marcha, evolui para ulceração.
<b>NEUROPATIA SENSITIVA</b>	Acarreta perda gradual da sensibilidade tátil e dolorosa, que torna os pés vulneráveis a traumas, denominada de “perda da sensação protetora”.
<b>NEUROPATIA AUTÔNOMICA</b>	Acarreta a anidrose, que causa o ressecamento da pele, a formação de fissuras, e alterações no crescimento das unhas que, se constituem em importantes portas de entrada para infecções.

Fonte: Grifo da autora (2014)

Observa-se assim, que a neuropatia seria o resultado da danificação crônica dos nervos periféricos dos membros inferiores, podendo acarretar em distúrbios motores, sensoriais e autonômicos, responsáveis por grandes sequelas físicas e funcionais, nos pacientes diabéticos (DIAS; CARNEIRO, 2000). A figura 01 retrata os tipos distintos de neuropatias.

Figura 1 - Tipos de Neuropatias desenvolvidas no Diabetes.



Fonte: Adaptado de Caiafa et al. (2011).

A principal complicação advinda das neuropatias seria a amputação do membro, com grande potencial de diminuir a funcionalidade do paciente, elevar o risco de óbito, se não tratada adequadamente, e em tempo hábil (BRASIL, 2001). A Figura 02 mostra os fatores associados às úlceras nos pés em pacientes diabéticos.

Figura 2 - Fatores associados à ocorrência de úlceras em diabéticos.

<b>FATORES</b>	
Úlcera, amputação prévia	
Neuropatia	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sensitiva/ Motora/ Autonômica</li> </ul>
Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Calçado inadequado</li> <li>▪ Caminhar descalço</li> <li>▪ Quedas, acidentes</li> <li>▪ Objetos no interior dos sapatos</li> </ul>
Biomecânica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Limitação da mobilidade articular</li> <li>▪ Proeminências ósseas</li> <li>▪ Deformidades no pé</li> <li>▪ Calos</li> </ul>
Doença vascular periférica	
Condição socioeconômica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Baixa posição social</li> <li>▪ Acesso precário ao sistema de saúde</li> <li>▪ Não adesão ao tratamento</li> <li>▪ Negligência</li> <li>▪ Educação terapêutica precária</li> </ul>

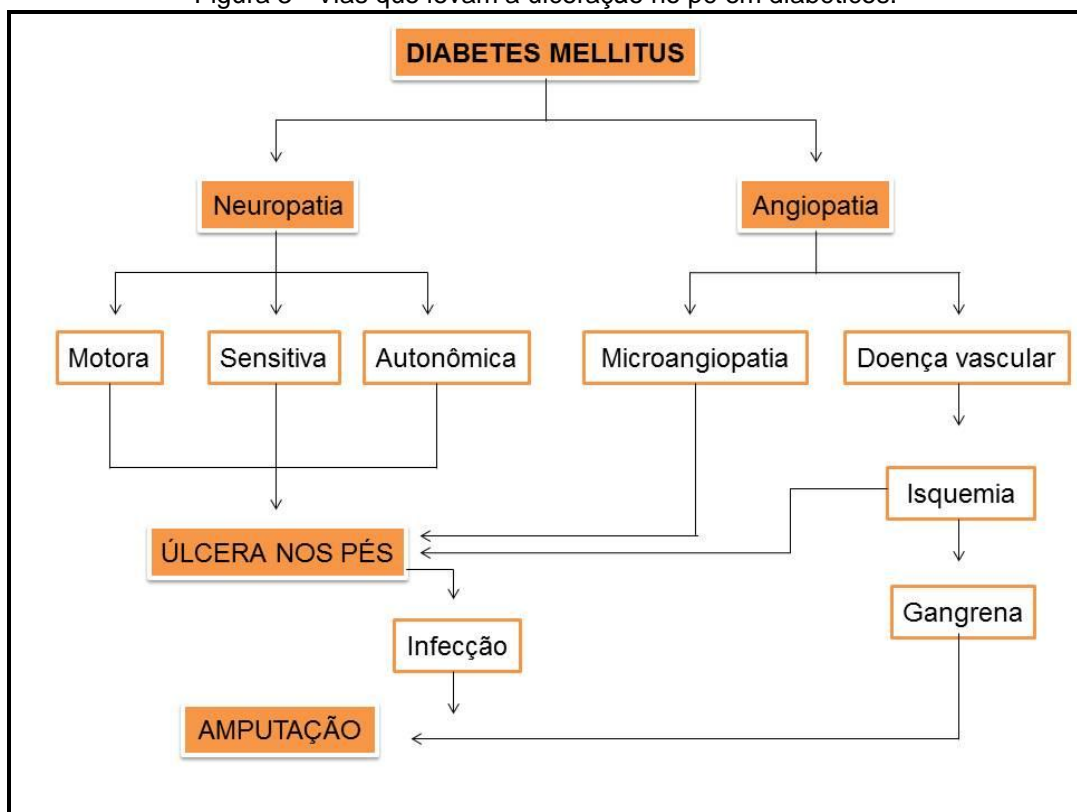
Fonte: BRASIL (2001).

Convém frisar que, na maioria dos casos, as lesões dos membros inferiores em diabéticos podem ser evitadas, e 50% das amputações podem ser prevenidas através da implementação de ações educativas orientadas por profissionais capacitados, para os diabéticos e seus familiares, objetivando um efetivo controle metabólico, e, sendo considerada uma das ferramentas mais efetivas para prevenir as sequelas e suas complicações (SILVA, 2009).

### 3.2 ÚLCERAS DIABÉTICAS

As lesões do pé diabético frequentemente resultam de uma combinação entre dois ou mais fatores de risco, ocorrendo concomitantemente. Os caminhos que levam à ulceração são apresentados de forma esquematizada na Figura 03. Convém ressaltar que a infecção raramente é a causa direta de uma úlcera, no entanto, uma vez que esta já acometido por uma infecção, o risco de uma amputação subsequente é relativamente maior (GROSS et al., 2002; (GROSSI, 1998).

Figura 3 - Vias que levam a ulceração no pé em diabéticos.



Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

Úlcera é uma interrupção na solução de continuidade da epiderme e estruturas profundas da derme que causa alterações na função fisiológica dos tecidos afetados, ou seja, houve um dano tecidual que não foi sequenciado por um processo de cicatrização organizado e oportuno suficiente para produzir integridade anatômica e funcional dos tecidos lesados. Existem vários tipos de úlceras crônicas, como úlceras de pressão, vasculares, de pé diabético, e outros tipos de feridas (O'MEARA et al., 2000).

Além de etiologias distintas, as úlceras podem ser classificadas quanto ao tempo de reparação em agudas e crônicas, e de acordo com a profundidade, em graus: I, II, III e IV, de forma correspondente à extensão da parede tissular envolvida: epiderme, derme, tela subcutânea e tecidos mais profundos, como músculos, tendões, ossos e outros (LAMPE, 2001).

O paciente com úlcera crônica geralmente apresenta uma série de fatores que impedem o processo curativo, a exemplo da presença de diabetes, que inibe a cicatrização organizada da ferida. A prescrição e tratamento das úlceras crônicas incluem muitas estratégias, incluindo vários tipos de curativos, agentes antimicrobianos, fisioterapia e estratégias educacionais, etc. (SILVA, 2009).

Brasil (2001) ressalta que o tipo, a localização, a causa e as características de uma úlcera devem ser aspectos considerados quando da seleção da estratégia de tratamento mais apropriado. As análises dos resultados e da abordagem das úlceras nos pés só podem ser conduzidas se as lesões estiverem. Na Tabela 2 estão expostos itens de avaliação de úlceras do pé diabético.

Sabe-se que, a cicatrização das úlceras em pacientes diabéticos é limitada por múltiplos fatores, como por exemplo, os fatores socioeconômicos, o acesso ao sistema de saúde e a adesão ao tratamento. De forma global, o tratamento constitui-se de algumas etapas, tais como: a limpeza da ferida, escolha de um produto adequado ao estágio de cicatrização em que se encontra a úlcera, associado à aplicação de uma terapia compressiva (BARBOSA, 2011).

Convém ressaltar que o tratamento para as úlceras é longo, fato que onera o sistema público de saúde, além das limitações impostas pela lesão contribuir para afastar os pacientes, muitas vezes ainda em idade produtiva, de suas atividades laborais (OLIVEIRA et al., 2012).

Tabela 2 - Avaliação e classificação das úlceras do pé diabético.

<b>ITENS DE AVALIAÇÃO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>QUANTO À PERFUSÃO</b>	
• <b>Grau 1</b>	Sem sinais ou sintomas de isquemia no pé afetado.
• <b>Grau 2</b>	Com sinais e sintomas de isquemia do membro, porém, não crítica.
• <b>Grau 3</b>	Isquemia crítica do membro afetado.
<b>QUANTO À PROFUNDIDADE</b>	
• <b>Grau 1</b>	Úlcera superficial que não atinge estruturas além da derme.
• <b>Grau 2</b>	Úlcera profunda, passa da derme para estruturas subcutâneas, fáscia, músculo ou tendão.
• <b>Grau 3</b>	Envolve todas as camadas do pé, incluindo osso e/ou articulação.
<b>QUANTO À INFECÇÃO</b>	
• <b>Grau 1</b>	Sem sinais ou sintomas de infecção.
• <b>Grau 2</b>	Infecção limitada à pele e subcutâneo, porém poupa os tecidos profundos e não há sinais sistêmicos; 2 dos itens abaixo devem estar presentes: Edema local; Eritema > 0,5-2cm ao redor da úlcera; Flutuação ou Dor local; Calor local e/ou Secreção purulenta.
• <b>Grau 3</b>	Eritema > 2 cm; Mais um dos itens descritos anteriormente (edema, flutuação, calor ou secreção purulenta); Infecção envolvendo estruturas mais profundas da pele e tecido subcutâneo, tais como: abscesso, osteomielite, artrite séptica ou fasciite. Sem sinais de resposta inflamatória sistêmica.
• <b>Grau 4</b>	Infecção associada a dois ou mais dos seguintes sinais de resposta sistêmica: Temperatura > 38 ou < 36 graus Celsius; Frequência cardíaca > 90 bpm; Frequência respiratória > 20 ipm; Leucócitos >12.000 ou < 4.000/mm <sup>3</sup>
<b>QUANTO À SENSAÇÃO</b>	
• <b>Grau 1</b>	Sem perda da sensação protetora do pé.
• <b>Grau 2</b>	Perda da sensação protetora.
<b>QUANTO À EXTENSÃO</b>	As úlceras devem ser medidas em cm <sup>2</sup> , se possível, após debridamento, por isso, poderão se multiplicar os valores dos maiores diâmetros perpendicularmente ou usar uma transparência em rede milimetrada, que é mais precisa para tal mensuração.

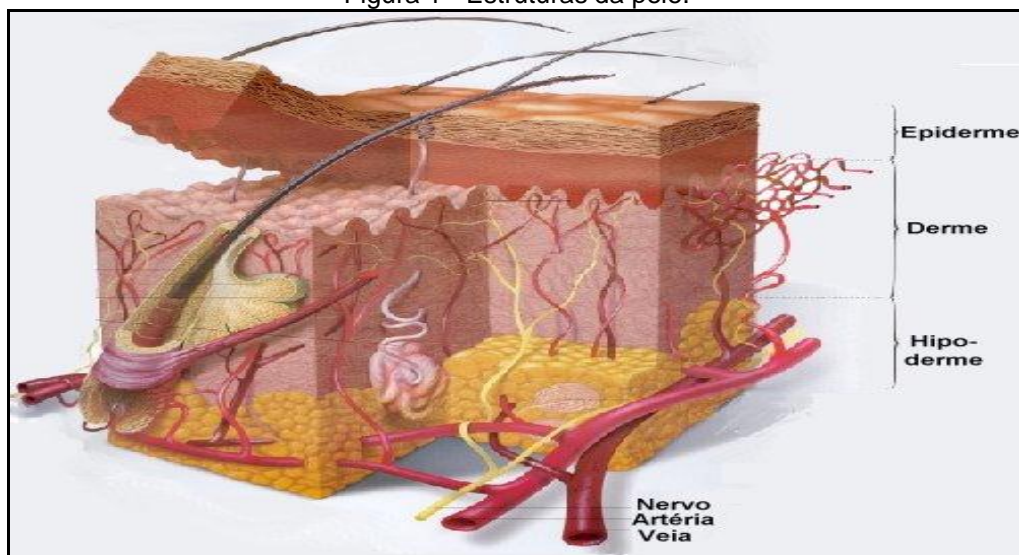
Fonte: Adaptação da autora do Consenso Internacional de Pé Diabético (2011).

### 3.3 PELE

A pele recobre o corpo, protegendo-o contra o atrito, a perda de água, a invasão de microorganismos e a radiação ultravioleta. Tem papel na percepção sensorial (tato, calor, pressão e dor), na síntese de vitamina D, na termorregulação, na excreção de íons e na secreção de lipídios protetores, estando integrada com diversos sistemas corporais, de maneira que permite o equilíbrio dinâmico de todo o organismo e o equilíbrio deste com o ambiente externo. (BARBOSA, 2011; TORTORA; GRABOWSKI, 2007).

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é um epitélio de revestimento e encontra-se firmemente acoplada ao tecido conjuntivo subjacente do qual recebe suporte, a derme. Abaixo da derme reside um tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme, que contém gordura (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELLES, 2010). (Figura 6).

Figura 1 - Estruturas da pele.



Fonte: Silva et al. (2010).

A epiderme é a camada mais externa das duas principais camadas da pele; ela é discretamente ácida, recoberta por epitélio queratinizado, sendo este, sustentado pela derme e pelo tecido conjuntivo subjacente; contém melanócitos que confere cor à pele, cabelo e pelos; é considerada a camada que protege a pele

contra o ambiente externo, encontrada ainda, as células de Langerhans suprabasais e as células de Merkel basais, que são células neuroendócrinas as quais atuam na proliferação de queratinócitos e parecem ter papel na regulação de doenças cutâneas (BOULAIS et al., 2009). A derme é a camada mais espessa, composta por fibras de colágeno e elastina. (BARBOSA, 2011).

Na superfície epitelial externa da epiderme encontra-se o estrato córneo, que é uma camada de células mortas, queratinosas e que funciona como uma barreira eficaz contra micro-organismos patogênicos, além de controlar a permeação de componentes; quando essa barreira protetora é lacerada, tem-se o que se chama de ferida (FERNANDES; BRAZ, 2002).

Convém ressaltar que a pele humana apresenta pH levemente ácido (4,6 - 5,8), aspecto este que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície; além dessa barreira de proteção, as secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, importante propriedade, uma vez que o pH da pele é frequentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial microorganismos (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Os mecanismos de defesa presentes na pele variam então, desde a secreção sebácea, com ação protetora e antimicrobiana, até as mais específicas e complexas funções imunológicas, que é potencializada pela função dos anexos cutâneos: os pêlos, cabelos, músculo eretor do pêlo, unhas, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (RODRIGUES, 2013).

### 3.4 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização de feridas envolve diferentes estágios, sendo a compreensão desse processo de grande importância, uma vez que a evolução da ferida depende do tratamento adequado de cada fase. A restauração dos tecidos pode ocorrer de duas maneiras: 1) A partir da regeneração, através da recomposição da atividade funcional do tecido; ou 2) Através da cicatrização, com restabelecimento da homeostasia do tecido e consequente perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (GOMES; CARVALHO; LIMA; 2009).

A lesão tissular, seja de qualquer natureza (física, química ou biológica), estimula rapidamente diversos processos metabólicos que buscam recuperar o tecido, desencadeando uma série de eventos que, de forma sintética, se traduzem como rubor, tumor, calor e dor, como resultado da ativação de células nervosas, vasculares, estromais e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química (JORGE; DANTAS, 2003).

Desta forma conclui-se que a cicatrização representa um processo complexo e sistêmico que exige que o organismo ative, produza e iniba um número considerável de componentes celulares e moleculares que se organizam com o objetivo de contribuir para o processo de restauração (BORGES et al., 2001).

Independente da etiologia que cause a lesão do tecido e gere ruptura na pele, na membrana ou qualquer estrutura do corpo ocasionado por um agente físico, químico ou biológico, a cicatrização segue um determinado curso e é dividida em três fases que compõem diferentes terminologias: fase exsudativa ou inflamatória; fase proliferativa ou fibroblástica; e fase de maturação (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

### **3.4.1 Fase Inflamatória**

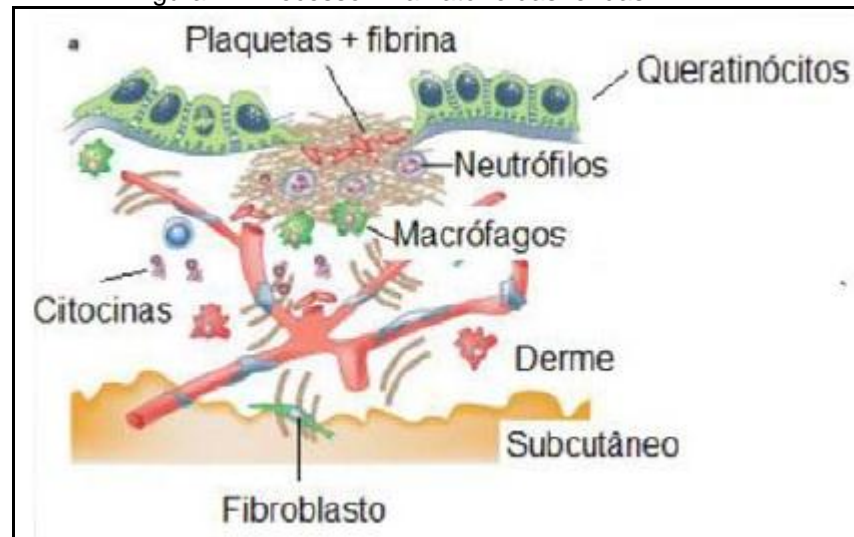
Essa fase é caracterizada pelos sinais comuns do processo inflamatório: calor, rubor, dor e edema e começa imediatamente após o início da lesão tecidual se estendendo por um período de três a seis dias, tempo que o organismo é estimulado a utilizar complexos mecânicos para a formação de trombos através da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação, debridamento da ferida e a defesa contra infecções com o objetivo de realizar a restauração tecidual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Logo após a lesão, há liberação de substâncias vasoconstritoras pelas membranas celulares (tromboxana A2 e prostaglandinas). Tanto o endotélio lesado, como as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, que têm papel fundamental na cicatrização, que atraem neutrófilos à ferida. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a



quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). A Figura 7 explana essa fase.

Figura 2 - Processo inflamatório das feridas.



Fonte: Guia feridas (2011).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão, atraídos por substâncias quimiotáticas, auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (THEORET, 2005).

Os macrófagos então migram para a ferida após 48 - 96 horas da lesão e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação, com papel fundamental no término do debridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa. Diante disso, esta fase do processo cicatricial tem como finalidade, preparar o local afetado para o crescimento de tecido reparado. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

### 3.4.2 Fase Proliferativa

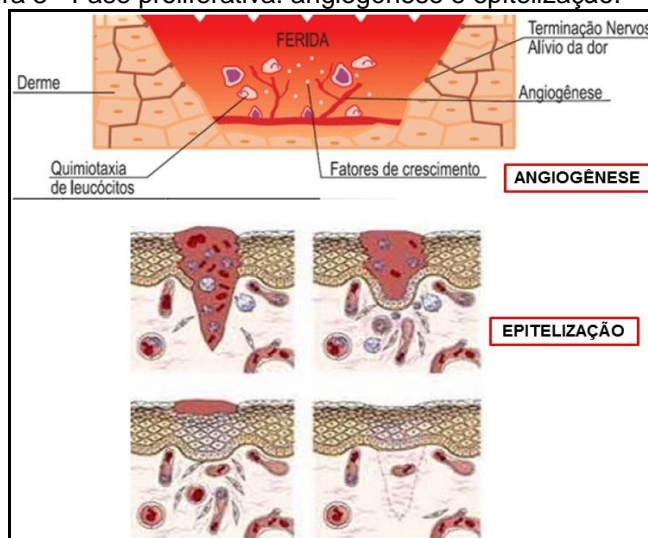
Nesta fase, a mitose celular se estende por aproximadamente três semanas, com a função básica de desenvolver o tecido de granulação composto por capilares

e a reconstituição da matriz extracelular, com deposição de colágeno, fibronectina e outros componentes protéicos, tendo como principais agentes estimulantes, as células endoteliais, os fibroblastos e os queratinócitos (ARAÚJO, 2010).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e caracteriza-se pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada através da formação de novos vasos sanguíneos. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa que promovem a contração da ferida. (NEVES et al., 2013).

A fase proliferativa busca a epitelização; se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas nesse período; se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). Essa fase está exposta na Figura 8.

Figura 3 - Fase proliferativa: angiogênese e epitelização.



Fonte: Fonte: Guia feridas (2011).

### 3.4.3 Fase Reparadora, Maturação e Remodelação Tecidual

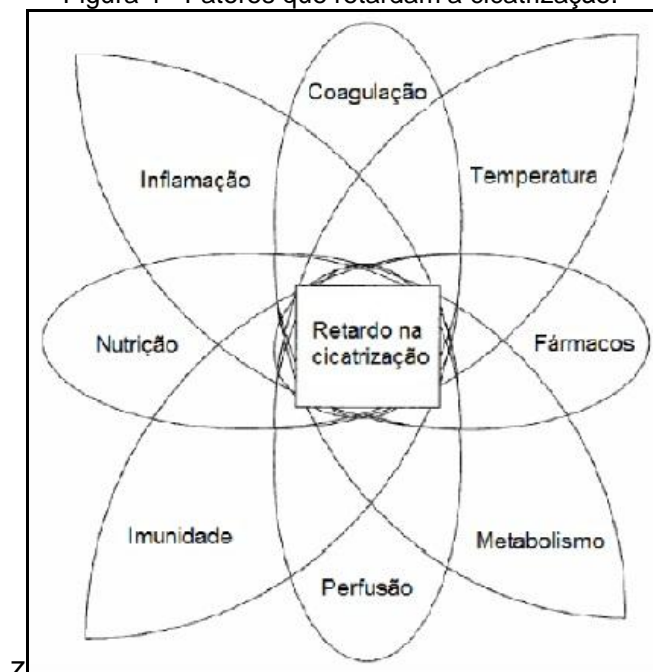
Esta fase tem início aproximadamente na terceira semana após a ocorrência da ferida e pode se estender até dois anos, dependendo do grau de comprometimento, extensão e local da lesão. Nesta fase ocorrem à diminuição

progressiva da vascularização, dos fibroblastos, o aumento da força tênsil e a reorientação das fibras de colágeno. À medida que as estruturas sofrem maturação, o volume da cicatriz diminui gradualmente e a coloração da ferida passa do vermelho para o róseo pálido que caracteriza o processo cicatricial (PINTO, 2007).

Diante disso, uma ferida é considerada cicatrizada quando o processo de maturação restabelece a continuidade da pele lhe proporcionando força suficiente para suas atividades normais (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2010).

Considera-se assim, que o processo de cicatrização é um processo complexo e, nessa perspectiva, vários são os fatores apontados que dificultam a cicatrização, dentre eles, os fatores intrínsecos, como a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), diminuição do Óxido Nítrico (NO), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (GFs) e das proteínas da via de sinalização da insulina e alguns fatores externos que também retardam o processo de cicatrização, como expostos na Figura 9 (BLANES, 2002).

Figura 4 - Fatores que retardam a cicatrização.



Fonte: Guia feridas (2011).

### 3.5 CONDUITAS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DE ÚLCERAS

A restauração da pele ocorre por meio de um processo dinâmico, contínuo, complexo e interdependente, composto por uma série de fases sobrepostas, ou seja, trata-se de um processo biológico de reparação de injúrias causadas ao organismo, que abrange uma gama de processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos. Viu-se que o surgimento de uma ferida desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas com objetivo de reparação tecidual, no entanto, em pacientes diabéticos, este reparo é lentificado (PEREIRA; VERAS; SILVEIRA, 2005).

Há uma ampla categoria de fármacos utilizados no tratamento de feridas, a exemplo dos anticoagulantes, os antiplaquetários, os hemorreológicos que favorecem o processo de regeneração dos tecidos e induzem à cicatrização. A Figura 10 retrata a classe terapêutica dos principais fármacos usados, bem como os mecanismos e os respectivos efeitos. Além desses, os glicocorticoides também são alternativas de medicação sistêmica para tais patologias (GUIA DE FERIDAS, 2011).

Figura 5 - Fármacos usados na cicatrização de feridas.

Classe terapêutica/ fármacos	Exemplos de marcas (medicamentos de referência)	Mecanismo	Efeito na cicatrização
Anticoagulantes (ex. varfarina)	Marevan, Coumadin	Inibição da síntese de vitamina K-dependente de fatores de coagulação.	↓ Hemostasia e inflamação
Antiplaquetários (ex. anti-inflamatórios não esteroidais, incluindo coxibes)	Aspirina (ácido acetilsalicílico), Cataflan, Voltaren (Diclofenaco), Feldene (Piroxicam), Celebra (Celecoxibe)	Inibição da COX (ciclooxigenase) – Síntese de derivados do ácido araquidônico (ex. prostaglandinas, tromboxana A2)	↓ Hemostasia e inflamação
Fármacos hemorreológicos (pentoxifilina)	Trental	Múltiplos mecanismos. Aumento da perfusão tecidual	Melhora da cicatrização de feridas isquêmicas.

Fonte: Guia feridas (2011).

O tratamento efetivo das feridas diabéticas dependerá da eliminação ou do controle dos fatores que causaram ou que mantêm a ferida aberta, da promoção das melhores condições sistêmicas e da escolha de terapia tópica adequada. Essas três ações representam “os princípios do tratamento de feridas” (PROTOCOLO DE CUIDADO DE FERIDAS, 2008).

Uma forma de auxiliar na cicatrização da lesão é a preparação do leito da ferida. É aceito que as lesões ulceradas de membro inferiores devem ser debridadas para permitir um bom tecido de granulação e uma adequada epitelização. Existem diversas formas de debridar uma ferida, através de métodos químicos, autolíticos e mecânicos que são utilizados associados com o curativo compressivo, prática esta realizada pela equipe de enfermagem (ALDUNATE et al., 2010).

Curativos formam um importante segmento do mercado mundial de produtos médicos e farmacêuticos. No passado, sua função primária era a de permitir a evaporação dos exsudatos e prevenir a entrada de bactérias na ferida. Os curativos modernos, por outro lado, baseiam-se no conceito de criar um ambiente ótimo para a movimentação das células epiteliais, para promover o fechamento da ferida, que incluem: um ambiente úmido ao redor da lesão, circulação efetiva de oxigênio para ajudar na regeneração das células, dos tecidos e reduzir a quantidade de bactérias (BOATENG et al., 2008).

Algumas características importantes e que devem ser consideradas na concepção de um curativo são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a mucoadesividade (RATNER et al., 2004).

A seleção correta e a aplicação de um curativo é necessária e representa uma fase importante para o sucesso terapêutico; requer uma avaliação completa da ferida, do seu grau de contaminação, dos fatores locais e sistêmicos e da presença de exsudato, como forma de agilizar o processo de cicatrização e proteger a ferida contra a ação de agentes externos físicos, mecânicos ou biológicos, tendo com objetivo reduzir, prevenir e/ou minimizar os riscos de complicações decorrentes (LIMA; ARAÚJO, 2013).

Até o ano de 2005, existia mais de 2000 produtos para tratamento de feridas disponível no mercado, dificultando a escolha correta do curativo, uma vez que, para o tratamento de lesão de pele é necessário conhecer as categorias, suas atuação,

indicação, contraindicações, vantagens e desvantagens dos produtos (DEALEY, 2001).

A escolha do curativo deve ainda ser baseada em fatores como eficácia, segurança e custo, de forma que o paciente possa mantê-lo e, assim, conseguir obter resultado positivo, pois as lesões apresentam uma cicatrização muito demorada na maioria dos casos, especialmente entre pacientes portadores de doenças crônicas como a Diabetes Mellitus (FRADE et al., 2011).

Assim sendo, a busca por tratamentos mais eficientes que possam contribuir para a cicatrização precoce é de interesse público, representando um desafio para os profissionais envolvidos no processo do reparo tecidual e vem se consolidando como linha de pesquisa interdisciplinar de relevância acadêmica, econômica e social.

Santos et al (2011) dizem que as coberturas temporárias mais utilizadas para tratamento de tais enfermidades cutâneas são: hidrogel, curativo com alginato de cálcio, filme de poliuretano, curativo de hidrocolóide, papaína, gaze impregnada de petrolato, gaze impregnada de parafina, apósito absorvente, curativo com nanopartículas de prata, gaze tradicional, etc, porém a maioria possui alto custo e sua escolha dependerá de cada tipo de úlcera e de cada fase específica da cicatrização (SANCHEZ, 2012).

Os avanços tecnológicos têm evidenciado novas formas de tratamento para acelerar o processo de cicatrização, diminuindo a frequência da troca do curativo e promovendo maior conforto ao paciente, sendo a área de Biomateriais bastante promissora nesta ótica (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Os biomateriais são definidos como aqueles materiais não vivos utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico. Muitos deles são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, pois não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica, além de apresentarem disponibilidade ilimitada. Pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais capazes favorecer a regeneração tecidual e a melhora da inflamação, a fim de promover a melhora do estado geral da ferida (SPIN NETO et al., 2008).

Outros polímeros naturais mais estudados para a regeneração da pele estão os alginatos, o ácido hialurônico, a celulose, o colágeno, a gelatina e seus derivados e a quitosana. Esses polímeros podem ser usados como agentes gelificantes,

excipientes para dar consistência a cremes, matrizes em adesivos, curativos tipo esponja, géis, membranas e adesivos em sistemas de liberação transdérmica (SILVA et al., 2008).

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído nas últimas décadas, com aplicações diversas, cabendo ressaltar a área de engenharia tecidual, na qual esta pode ser permeada por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas. Propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, propriedades de adsorção, permitem que esta seja utilizada como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções (SPIN NETO et al., 2008).

Os polímeros têm sido extensamente empregados como curativos porque possuem a capacidade de proteger as feridas de infecções secundárias e proporcionar um ambiente hidratado que auxilia no processo de cura, além de que este material pode permanecer na lesão sem causar trauma, atuando como alternativa ideal pelas propriedades que possuem e que aceleram o processo de cicatrização de feridas. (NEVES et al., 2013).

Por se tratar de um polímero natural e abundante, de baixa toxicidade e conjugar de ricas propriedades industriais e farmacêuticas, a quitosana se destaca como biomaterial atraente para usos diversos e com eficácia comprovada. A Figura 11 apresenta algumas aplicações da quitosana em diferentes áreas (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001).

Figura 6 - Diversas aplicações da quitosana.

<b>ÁREA INDUSTRIAL</b>	<b>SAÚDE/ NUTRICIONAL</b>
Purificação de água residual de indústrias	Agente absorvedor de gordura
Estabilizante de gordura no preparo de alimentos	Regeneração de ferimentos
Estabilizante de aromas	Auxiliar no controle da pressão arterial
Reserva de troca iônica	Regenerador de estrutura óssea
Aditivos de cosméticos e shampoos	Redução de nível de ácido úrico
Proteção bactericida de sementes	Bactericida/ Antiviral
Estabilizante de frutas e verduras	Inibe a formação de placas bacterianas
Agente imobilizante de micro-organismos	Membranas artificiais

Fonte: Milioli (2011).

Muitas aplicações para a quitosana como biomaterial já foram propostas, tendo sido observado que os oligossacarídeos da quitosana possuem um efeito estimulante sobre os macrófagos e, tanto a quitosana como a quitina, atraem os neutrófilos tanto *in vitro*, como *in vivo*, o que é essencial para a cura da lesão cutânea; outros estudos mostraram que membranas de quitosana não são citotóxicas, quando testadas com fibroblastos (SILVA *et al.*, 2008) e queratinócitos (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Estudos clínicos já provaram que feridas humanas tratadas com membranas de quitosana cicatrizam mais rápido (SANTOS *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2006). A Figura 12 mostra algumas das principais aplicações da quitosana na área biomédica.

Figura 7 - Aplicação da quitosana na área biomédica.

Aplicações Biomédicas Potenciais	Principais Características
Suturas	Biocompatível
Pele artificial	Biodegradável
Reconstrução óssea	Renovável
Lentes de contato para córnea	Forma filme
Excipiente ou carreador para liberação controlada de fármacos em humanos e animais	Agente hidratante
Material para encapsulamento	Não-tóxico
	Hidrolisado pela lisozima
	Cicatrizante
	Eficiente contra bactérias, vírus e fungos

Fonte: Rinaudo (2006)

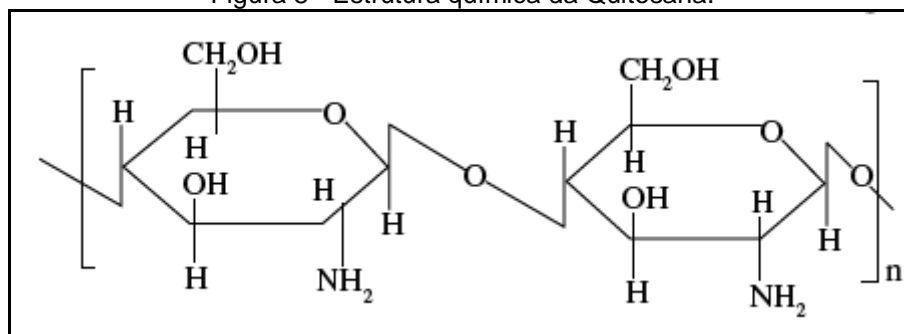
### 3.6 QUITOSANA

A quitosana (ver Figura 13) é um biopolímero hidrofílico, natural, de baixo custo, renovável e obtido a partir da quitina (ver Figura 14), termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento e que designa um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente. (SPIN NETO *et al.*, 2008).



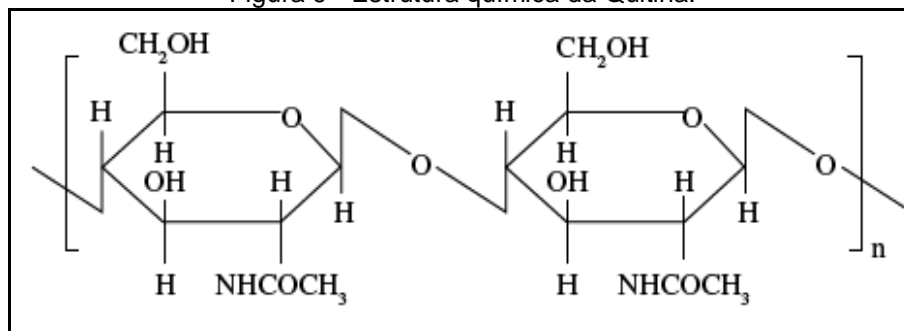
Toda a quitina comercialmente produzida é obtida dos resíduos das indústrias de alimentícias de processamento de crustáceos, que descarta diariamente toneladas desse material. Partindo-se da matéria-prima bruta, após lavagem abundante, banhos ácidos retiram todo o conteúdo mineral das cascas, e banhos básicos promovem sua desproteínização, aliada a uma leve desacetilação. A quitosana é então originada a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, como evidencia a Figura 15 (CAMPANA FILHO et al., 2007).

Figura 8 - Estrutura química da Quitosana.



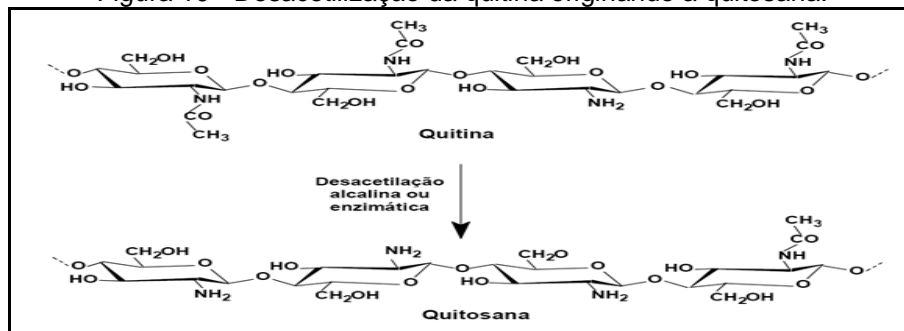
Fonte: Campana Filho et al. (2007).

Figura 9 - Estrutura química da Quitina.



Fonte: Campana Filho et al. (2007).

Figura 10 - Desacetilação da quitina originando a quitosana.



Fonte: Campana Filho et al. (2007).

A quitosana é um polissacarídeo constituído de unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (Figura 15), unidas por ligações  $\beta$ -1,4, formando uma longa cadeia linear composta de três grupos funcionais reativos, um grupo amino e dois grupos hidroxilas primário e secundário nas posições dos carbonos C-2, C-3 e C-6 respectivamente. Esta pode ser encontrada na natureza, particularmente como constituinte da parede celular de alguns fungos especialmente nas espécies do gênero *Mucor*, mas também pode ser obtida industrialmente através da hidrólise alcalina ou hidrólise enzimática dos grupos N-acetil-D-glicosamina (N-desacetilação) da quitina (NEVES et al., 2013).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Através de experimentos de difração de raios-X, foram encontradas quatro polimorfos do polímero, sendo três formas hidratadas e uma anidra (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008).

A modificação química desses grupos funcionais reativos: um grupo amino e dois grupos hidroxila, um primário e um secundário gera inúmeros derivados da quitosana, aumentando o leque de aplicações do polímero. A natureza química da quitosana também possibilita modificações covalentes e iônicas, as quais permitem fazer adequações de suas propriedades mecânicas e biológicas de acordo com a aplicação (KIM et al., 2007).

As propriedades físico-químicas da quitosana frequentemente mais analisadas são o grau de desacetilação, massa molar, viscosidade e grau de polimerização. A área de aplicação deste polímero depende, principalmente, deste conjunto de propriedades. Comparada a muitos outros polímeros naturais, a quitosana tem a vantagem de possuir carga positiva, o que confere à mesma propriedade de mucoadesividade (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

A quitosana normalmente é insolúvel em soluções aquosas, com pH superior a 7, entretanto, em ácidos, os grupos amino livres são protonados e a molécula torna-se altamente solúvel em pH ácido. Algumas aplicações farmacêuticas da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. (ARANAZ et al, 2009).

### 3.6.1 Aplicação da Quitosana como um Biomaterial

O emprego de quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura, na indústria de alimentos, até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas, cabendo ressaltar o emprego na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas (AKNCBAY, SENEL; AY, 2007).

A quitosana constitui-se um polímero natural que vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos. É considerada ainda, uma substância particularmente indicada para aplicações biomédicas, pois conjuga propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, além de ser economicamente viável, por ser derivada do segundo biomaterial mais abundante na natureza, a quitina, além de ser potencialmente eficaz (MUZZARELLI et al., 1997).

A aplicabilidade da quitosana como biomaterial se estende desde a produção de lentes de contato, membranas artificiais, implantes, agente hemostático, tratamento de lesões de pele – queimaduras e feridas, bactericida e fungicida, etc. (DALLAN, 2005). Pelo seu componente hipoalergênico, filmes de quitosana auxiliam na cicatrização, pois acelera a reposição celular, recuperando, rapidamente, tecidos lesados (HIROUYUKI et al., 1998). As propriedades cicatrizantes e antimicrobianas da quitosana são atribuídas, provavelmente, as características de seus produtos de degradação enzimática, os oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, que são totalmente absorvíveis pelo organismo (DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2010).

Atribui-se à quitosana atividade antimicrobiana, visto que esse polímero provoca a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, dentre outros. Estudos recentes revelam, entretanto, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo, onde os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das gram-positivas, acredita-se que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula bacteriana que acabam por inibir

a absorção de nutrientes, enquanto que a quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

O efeito coagulante corresponde a outro efeito da quitosana, que reduz o tempo de coagulação sanguínea, contribui para agregação plaquetária, além da capacidade de agregar, também, os eritrócitos. Convém mencionar que a agregação plaquetária proporciona a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), provavelmente pelo dano causado às membranas plaquetárias pela forte agregação induzida, principalmente, pela quitosana, sendo tais fatores citocinas liberadas pelas plaquetas, que desempenham importante papel no processo de cicatrização (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A propriedade de biodegradabilidade se deve à metabolização da quitosana por algumas enzimas humanas, como por exemplo, a lisozima, característica esta imprescindível para ser utilizada como biomaterial, que é a susceptibilidade a uma reação de hidrólise enzimática. Convém ressaltar que a quitosana tem facilidade de formar filmes e membranas, permitindo aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento (SOUSA, 2012).

É reportada na literatura, a potente ação analgésica tópica tanto da quitina quanto da quitosana, que pode ser decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a  $\text{NH}_3^+$ . Muitos pesquisadores reportam a utilização de produtos a base de quitosana para a regeneração de tecidos como: peles artificiais, hidrogéis, fibras, filmes, esponjas e curativos devido a sua capacidade de auxiliar no combate a infecções. Na área farmacêutica, a quitosana vem sendo utilizada como um excipiente para modificar a liberação de fármacos em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica (OKAMOTO et al.; 2002).

Alguns investigadores têm reportado que a quitina e quitosana induzem a analgesia, onde foi verificado que a quitosana forneceu uma sensação refrescante, agradável e calmante tópico quando aplicada em feridas abertas. Observou-se, em animais, que a quitina e quitosana aceleraram a cicatrização de feridas, reduz a frequência de tratamento, diminui a dor e protege a superfície da ferida (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Alguns autores citam que a quitosana fomenta o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente<sup>47</sup>. Este comportamento tem sido aproveitado para os estudos em engenharia de tecidos, sendo a quitosana utilizada em trabalhos de regeneração da pele, do tecido ósseo e cartilaginoso e na preparação de pele artificial (SPIN NETO et al., 2008).

Ozanski e Andrade (2012) reforçam que a quitosana por ter carga positiva, é mucoadesiva, conseqüentemente, pode ser usada na pele lesionada sem efeitos colaterais, além de ser extensivamente utilizada em aplicações de sistemas de liberação prolongada de fármacos, devido as suas relevantes propriedades: biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, propriedades biológicas, potente ação analgésica tópica, atividade antimicrobiana, efeito coagulante, aceleração da cicatrização, tratamento de osteoartrite, efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico, redução de peso, dentre outras (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

### 3.7 BIOMATERIAIS

Os materiais têm sido importante para a sobrevivência humana desde milênios de anos atrás, mas nessa época o uso era limitado a materiais de origem natural, utilizados de forma original, contudo, na atualidade, com os avanços da ciência e da tecnologia, novas possibilidades de materiais estão sendo amplamente utilizados no cotidiano, de forma diversificada e modificados à necessidade de aplicação, sendo classificados por classes de materiais (PASSOS, 2012).

Dentre as classes de materiais, os biomateriais destacam-se pela sua aplicabilidade na área médica ou biomédica, já que sua interação com o sistema biológico ocorre harmoniosamente; pode-se dizer que biomateriais são materiais desenvolvidos com a finalidade de substituir a matéria viva (órgãos ou tecidos), englobando qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada para este fim (SPIN NETO et al., 2008).

Gil e Ferreira (2006), dizem que “biomaterial é por definição todo material, natural ou não, que utilizado em aplicações biomédicas impliquem em interação com o sistema biológico”; esses são classificados, quanto ao tipo de material, em

polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e biopolímeros (macromoléculas naturais), que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (RIOS, 2005).

O conceito supracitado vem sendo expandido nos últimos anos, por exemplo, com relação ao tipo de interação com sistemas biológicos, compreendendo materiais capazes não somente de tratar distúrbios em um órgão ou em uma dada função do corpo, mas também de estimular ou substituir qualquer tecido, incluindo, portanto, materiais bioativos. Dependendo da aplicabilidade desejada, tal material deve apresentar características adequadas quanto à porosidade, não toxicidade, resistência à tensão, flexibilidade e elasticidade, biocompatibilidade, sendo em alguns casos, necessário que o material seja também biodegradável e bioabsorvível (PEREIRA; VASCONCELOS; OREFICE, 1999).

De forma didática, os biomateriais podem ser classificados de três formas, de acordo com o comportamento biológico: 1) Bioinertes - Materiais que desenvolvem mínima resposta ao tecido biológico; 2) Bioativos - Materiais que estimulam o crescimento de tecidos a partir de sua superfície e 3) Bioabsorvíveis - Materiais que após a degradação são absorvidos pelo organismo e que neste período induzem a formação de tecido (PARK; LAKES, 2007).

Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo material para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, microcápsulas ou soluções (SPIN NETO et al., 2008).

A diversidade das aplicações dos biomateriais, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (KAWACHI et al., 2000).

Spin Neto et al. (2008) dizem que os “Sistemas de liberação de fármacos” (“*Drug-delivery systems*”) surgiram na década de oitenta e representam biomateriais

utilizados pela indústria como agentes facilitadores na entrega de drogas sistêmicas ou locais, capazes de proporcionar taxas de liberação controladas e prolongadas dessas drogas, de maneira a se obter uma resposta ótima com o mínimo de efeitos colaterais.

A quitosana, por ser um biomaterial seletivamente permeável, surgiu como matriz polimérica relevante como meio de liberação de medicamentos, na mucosa oral e gastrintestinal, canais radiculares, dentinas cariadas ou bolsas periodontais, e os estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram com o uso da quitosana nesta aplicação, visto que representa uma promissora substância capaz de atuar agente de liberação de fármacos, não sendo ainda desenvolvidos sistemas tópicos para reforçar seu potencial anti-inflamatório e cicatricial e aplicar em feridas diabéticas (JE; KIM, 2006).

Como visto, os avanços na área dos Biomateriais e especificamente no desenvolvimento das aplicações biomédicas da quitosana propiciou enorme impacto na área da saúde e da bioengenharia, e conseqüentemente repercutiu na melhoria da qualidade de vida das pessoas, no entanto faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que ampliem a aplicabilidade da quitosana como biomaterial na concepção de adesivos tópicos, aplicados na ferida, com incorporação de fármacos, objetivando melhor resposta anti-inflamatória e melhora do quadro clínico no geral.

Alguns autores já investigaram a eficácia da combinação da quitosana com outros materiais, de modo a promover uma cura mais rápida que a quitosana pura no tratamento de feridas (FERNANDES, 2009). Filmes biodegradáveis de quitosana com alginato promoveram a aceleração do fechamento da ferida em ratos (KHOR; LIR 2003). HIRANO et al. (2001) mostraram, em seu estudo, que fibras de quitosana recobertas o ácido hialurônico, sulfatos de condroitina c e a heparina possuíam menor resistência mecânica, mas liberavam o glicosaminoglicano, acelerando a cura.

Dentre os diversos compostos que podem ser usados com esta finalidade, que concorre para minimizar os efeitos inflamatórios e concorre para restabelecer o tecido lesado, destaca-se a quercetina, definida como um importante flavonóide, encontrado em maior quantidade nos alimentos como cebola e maçã, de característica lipossolúvel, apresentando diversas propriedades biológicas, como ação antihipertensiva, antiaterogênica, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica,

antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (MOON et al., 2008; VICENTINI, 2009).

A atividade antiinflamatória da quercetina tem sido atribuída ao efeito inibitório sobre diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, e, dentre as diferentes tecnologias disponíveis para promover a liberação prolongada de um princípio ativo, os sistemas matriciais constituem alternativa potente, havendo diversos polímeros que podem ser empregados em formulações de medicamentos para constituição de sistemas matriciais, como etilcelulose, polietileno, cloreto de polivinila, metilcelulose, alginato de sódio, carboximetilcelulose sódica, carbômeros e a quitosana (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; FRAGA et al., 2010).

Acredita-se que, ao associar as propriedades da quitosana como sistema matricial polimérico, juntamente com suas outras ricas propriedades, às características da quercetina, poderia resultar num biomaterial de resolutividade e de baixo custo, capaz de favorecer os fatores de crescimento e minimizar os efeitos da inflamação da ferida, de forma que, o efeito antibactericida de ambos os compósitos tem grande potencial de impedir a colonização do sítio da ferida por bactérias que geralmente favorece as amputações e até o óbito entre tais pacientes.

### 3.8 FLAVONÓIDES

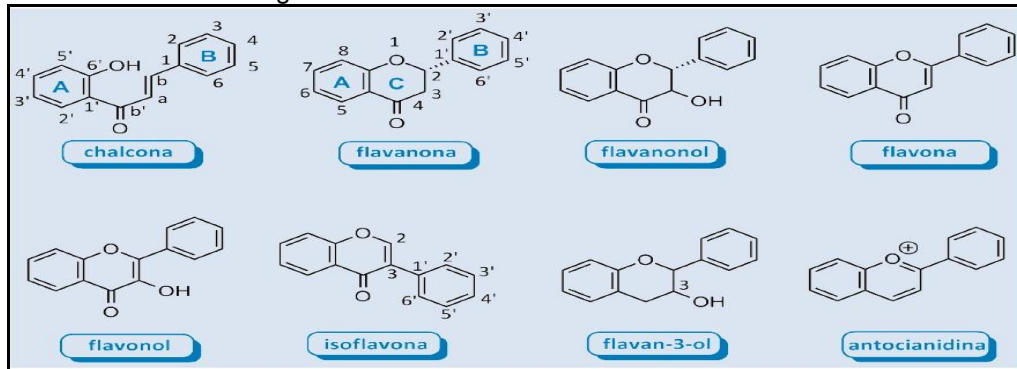
Os flavonóides são compostos polifenólicos, presentes em todas as plantas vasculares. Os cerca de 4000 compostos identificados derivam do mesmo precursor, a 2-hidroxicalcona (GOMES, 2010). Eles representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuída no reino vegetal. São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (WIESE, 2008).

Quanto à estrutura, os flavonóides possuem em comum, dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si por um anel heterocíclico (anel C). Com base no estado de oxidação, hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, nos grupos funcionais ligados ao anel C e da ligação dos anéis B e C, estes podem ser divididos em sete classes: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis,



isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas, sendo a quercetina pertencente à classe dos flavonóis, como ilustra a Figura 16 (DORNAS et al., 2007).

Figura 11 - Estrutura básica dos flavonóides.



Fonte: Adaptado de Dornas et al. (2007).

Os flavonóides foram considerados por muito tempo, como inertes e não essenciais à saúde humana, entretanto, nos últimos anos, tem se comprovado que estes interagem os sistemas biológicos dos mamíferos, apresentando atividade antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antimitótica e com efeitos anticarcinogênicos e antiproliferativos. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias deste tipo (BÜRGER, 2006).

Estes compostos polifenólicos constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto básico, tendo nessa estrutura anéis aromáticos  $C_6-C_3-C_6$ . O esqueleto  $C_{15}$  dos flavonoides é bioenergeticamente derivado do fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) e três unidades de acetato ( $C_6$ ). Portanto, flavonóides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal, podendo haver facilmente interconversão entre eles (LOPES et al., 2000).

Os flavonóides agregam compostos que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul. A Figura 17 apresenta algumas das principais classes de flavonóides, assim como alguns dos seus principais representantes e características.

Figura 12 - Principais classes de flavonóides e descrição de suas características básicas.

CLASSES	COLORAÇÃO	EXEMPLOS	COMENTÁRIOS
Antocianinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina; Delfinidina; Peonidina.	Antocianinas estão predominantemente em frutas e flores e provavelmente foram os primeiros flavonóides a serem isolados – provenientes de pigmentos florais, conforme indicam seus próprios nomes. São usadas como corantes.
Flavanas (mono, bi e triflavans)	Incolor	Catequina; Epicatequina Luteoforol; Procianidina. Theaflavina	Flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes e bebidas como chás e água de coco. O sabor peculiar de algumas bebidas, frutas, chás e vinhos é devido, principalmente, à presença das biflavanas.
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido.	Hesperidina; Naringenina.	Flavanonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Amarelo pálido	Apigenina; Luteolina; Diosmetina; Tangeretina; Nobiletina	Flavonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. Mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais. Conferem o pigmento amarelo em flores. Os compostos mais comuns são a apigenina e a luteolina.
Flavonóis	Amarelo pálido	Quercetina; Rutina; Mirsetina; Kaempferol	Os flavonóis estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas. A quercetina é o principal representante da classe.
Isoflavonóides	Incolor	Daidzeína; Genisteína.	Isoflavonóides são encontrados quase que exclusivamente em legumes, particularmente na soja.

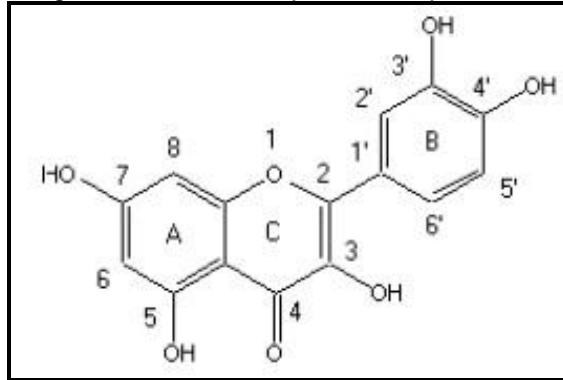
Fonte: Adaptado de Peterson e Dwyer (1998).

Dentre os flavonóides mais frequentes encontrados na natureza, destaca-se a quercetina. A quercetina, é abundante em cebolas (280 – 490 mg/kg), repolho crespo (110 mg/kg), brócolis (30 mg/kg) e feijão (45 – 60 mg/kg). Em frutas, é comum em maçãs (20 – 70 mg/kg), damasco (25 mg/kg). No vinho tinto, sua concentração varia de 5 a 15 mg/L, em chás escuros, 10 – 25 mg/L (BÜRGER, 2006).

### 3.9 QUERCETINA: EFEITOS E PROPRIEDADES

A quercetina (3,5,7,3',4' pentahidroxi flavona) foi isolada e biologicamente identificada em 1936 por Szent-Gyorgy; ela pertence à classe dos flavonóis, e é o flavonóide encontrado em maior quantidade nos alimentos, com característica de lipossolubilidade e pode ter açúcares ligados à molécula (ALVES et al., 2010). A estrutura química da quercetina está representada pela Figura 18 e as suas características na Tabela 3.

Figura 13 - Estrutura química da quercetina.



Fonte: Vicentini (2009).

Tabela 3 - Características da quercetina.

**CARACTERÍSTICAS DA QUERCETINA**

<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
<b>Massa molar</b>	302,236 g / mol
<b>Aparência</b>	Pó cristalino amarelo
<b>Densidade</b>	1,799 g / cm <sup>3</sup>
<b>Temperatura de decomposição</b>	316 ° C
<b>Solubilidade em água</b>	Praticamente insolúvel em água

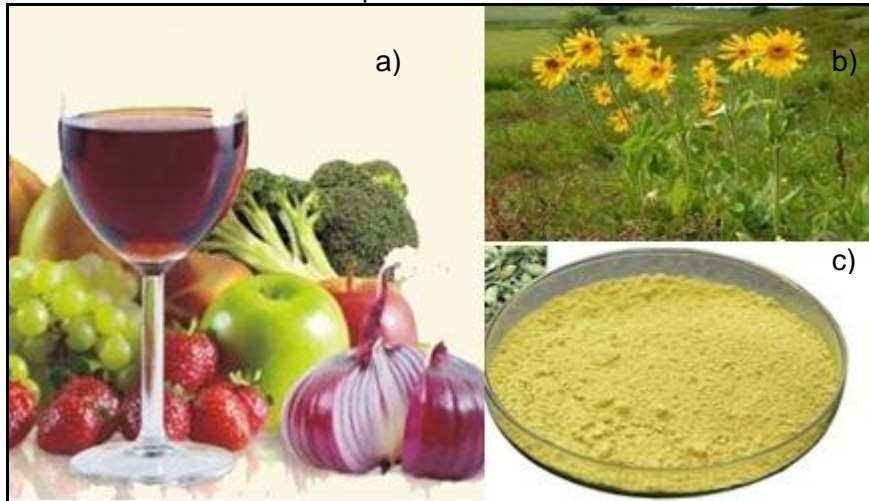
Fonte: Adaptado de Vicentini (2009).

Encontram-se altas concentrações de quercetina em cebola (284-486 mg/ kg), couve (100 mg/kg), vagem (32-45 mg/ kg), brócolis (30 mg/ kg), repolho(14 mg/ kg) e tomate (8mg/ kg). Entre as frutas estudadas, a concentração média de quercetina encontrada foi de 15 mg/ kg, sendo que na maçã esta foi maior, entre 21 e 72 mg/ kg. Em bebidas, como a cerveja, café, achocolatado e vinho branco, o teor foi de aproximadamente 1 mg/ l. Já, para o vinho tinto, o teor observado foi de 4 -16 ml/ l, suco de limão 7 mg/ l, suco de tomate 3 mg/ l e nos demais sucos 5 mg/l. O chá preto é a bebida que apresenta maior concentração da mesma, em torno de 10-25 mg/l (HERTOG et al.,1993).

A quercetina também está presente na planta *Arnica Montana*, uma erva originária das regiões montanhosas da Europa, muito famosa por seu uso externo em lesões musculares, dores, entorses, artrites, sendo da família *Asteraceae*, que apresenta inflorescências terminais grandes, eretas, ramificadas com numerosos capítulos pequenos, cultivada em bordaduras ou em canteiros a pleno sol.

(MARQUES, 2006). Sua forma industrializada apresenta a coloração amarela e é comercializada sob a forma de pó. (Ver Figura 19).

Figura 14 - Fontes de quercetina. (a) Alimentos ricos em quercetina; (b) Arinca Montana; (c) Quercetina pó/ forma industrializada.



A quercetina apresenta diversas propriedades biológicas, como ação antihipertensiva, antiaterogênica, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica, antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória (FORMICA; REGELSON, 1995; MOON et al., 2008).

A atividade anti-inflamatória da quercetina tem sido atribuída ao seu efeito inibitório sobre diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, tais como: formação de leucotrienos, expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, produção de óxido nítrico por macrófagos, desgranulação de neutrófilos e mastócitos (FILHO, 2005).

Ainda não foram totalmente elucidados os mecanismos moleculares envolvidos no efeito anti-inflamatório da quercetina, mas investigações sugerem que as vias da tirosina quinase possam ser possíveis alvos farmacológico, além disso, a capacidade da quercetina em inibir a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, importante na ativação de genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias, também foi observada após utilização desta substância, conforme ressalta Vicentini (2009).

A quercetina é considerada um composto anticarcinogênico valioso, sendo relatada atividade antiproliferativa *in vitro* deste flavonóide contra células

cancerígenas do ovário, mama e estômago, em estudos conduzidos por Scambia et al. (1990); Yanagihara et al. (1993). Pesquisas desenvolvidas evidenciaram que o consumo rotineiro de alimentos ricos em quercetina pode ser benéfico na prevenção e controle de alguns tipos de câncer (DIAS, 2005; MALTA et al., 2006; MORAES, 2007).

O potencial dos flavonóides na quimioterapia do câncer tem sido comprovado através da capacidade de interagir sobre a gênese da doença, bloqueando o estágio de promoção, através da inibição da síntese da ornitina-descarboxilase e da inibição da expressão da proteína BCRP, presente no câncer de mama. Dentre os flavonóides estudados, todos apresentaram atividade anticâncer relatada pela medicina chinesa, como capazes de inibir a angiogênese de culturas de células endoteliais da veia umbilical humana, sendo este efeito proporcional ao número de hidroxilas. Para a quercetina, foram descritas, ainda, a inibição da incidência de papilomas de pele em cobaias e a inibição de fibrossarcoma induzido em camundongos (MORAES, 2007).

Casagrande et al. (2006) constataram os efeitos benéficos do uso tópico da quercetina na diminuição dos danos oxidativos causados pela Radiação Ultra Violeta (RUV) na pele, no entanto, deve ser considerado o uso de outras estratégias capazes de promover aumento na penetração da quercetina pela pele, a fim de otimizar a sua ação terapêutica.

O elevado efeito antioxidante da quercetina pode ser atribuído à redução do ânion superóxido e de radicais gerados durante a peroxidação lipídica. Esta capacidade antioxidante está, por sua vez, relacionada com a estrutura química desses compostos, que é capaz de eliminar radicais livres como hidroxil, peroxil e ânions superóxidos e quelar metais de transição que, quando livres, aumentam a formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) (VICENTINI, 2009; SILVA, 2011).

Existe limitação do uso da quercetina por via oral devido à sua baixa biodisponibilidade, visto que os primeiros estudos com quercetina em humanos sugeriram uma biodisponibilidade muito baixa após uma única dose oral, de aproximadamente 2%, no entanto, vários estudos têm buscado distintas estratégias farmacotécnicas, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral da quercetina e aproveitar o seu potencial terapêutico (ROGÉRIO et al., 2010; DORA et al., 2011).

Geralmente a quercetina está presente nas plantas na forma glicosídica, ou seja, ligada covalentemente a uma molécula de açúcar (glicose, ramnose ou rutinose) por meio de uma ligação  $\beta$ -glicosídica. A ligação da quercetina com uma molécula de açúcar afeta a sua solubilidade e absorção; a ligação  $\beta$ -glicosídica é resistente à hidrólise pelas enzimas pancreáticas, oferecendo uma barreira no processo de absorção intestinal, fato este que se associa a baixa disponibilidade da quercetina (ALVES et al., 2010).

Poucos estudos têm sido conduzidos quanto à distribuição tecidual da quercetina após administração oral, e nenhum estudo avaliou tal distribuição em humanos. Em ratos e em porcos, a quercetina e produtos afins são distribuídos nos tecidos, nos pulmões, no cérebro, tecido adiposo, rins, intestino delgado, coração e no baço (BIEGER et al., 2008; DE BOER et al., 2005).

A administração oral da quercetina aglicona, em pacientes saudáveis, demonstrou taxa de absorção entre 36 e 53%, tempo de meia-vida de 20 a 72 horas. A principal rota de eliminação da quercetina (23-81%) foi com a exalação de dióxido de carbono, uma vez que a eliminação urinária e fecal, juntas, foi inferior a 10%; logo, em função da baixa absorção intestinal da quercetina e de seu rápido metabolismo sistêmico, pode ser viável sua administração por um via alternativa à via oral (COSTA, 2005).

Em virtude da estrutura peculiar, a quercetina é considerada lipofílica e demonstra uma pronunciada instabilidade química de acordo com o pH: ela sofre auto oxidação em soluções orgânicas e aquosas que apresentam pH superior a 8,0; Em pH inferior a 5,0, a quercetina encontra-se na forma neutra ou com carga elétrica positiva; abaixo de pH 4,0, ao menos duas espécies iônicas estão presentes na solução aquosa, uma vez que ocorre a dissociação dos grupos hidroxila, fato que também promove à auto oxidação da quercetina. A ordem preferencial da desprotonação dos grupos hidroxila é: 5-OH, 3-OH, 3'-OH, 7-OH e 4'-OH. Sendo assim, as hidroxilas encontradas nos carbonos 5 e 3 são desprotonadas em pH abaixo dos encontrados fisiologicamente, indicando que somente as hidroxilas de outras posições podem ser desprotonadas em pH fisiológico (SILVA, 2011).

As propriedades físicoquímicas da quercetina podem variar entre diferentes lotes do polifenol, uma vez que este pode ser encontrado em formas polimórficas diversas. Borghetti et al. (2006) observaram a presença de três formas polimórficas

ao analisar quatro amostras distintas de quercetina disponíveis comercialmente, apresentando formas distintas de cristais, e diferentes perfis de difração de raios-X, evidenciando divergência na forma cristalina entre as amostras deste flavonóide, que se reflete na variação da solubilidade em água das amostras de quercetina. A transformação polimórfica pode ser mediada por solventes, por estresse mecânico, ou pela temperatura, e afeta grandemente as características de morfologia, solubilidade, estabilidade, e conseqüentemente, a biodisponibilidade (SRINIVAS et al., 2010).

Alguns estudos já realizados comprovam essa função antiinflamatória da quercetina, a exemplo desta ter sido o composto mais importante na redução do edema da pata de rato induzida por carragenina (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; FILHO, 2005; WIESE, 2008).

Outro ensaio sobre inflamação das vias aéreas constatou que o flavonoide quercetina (10 mg/kg), após administração por via parenteral, reduziu o recrutamento de eosinófilos e a formação de leucotrienos indutores de broncoconstrição, em modelo de asma induzida em camundongos, sendo considerado um promissor princípio ativo para o desenvolvimento de uma nova terapia antiasma (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009), no entanto, ainda não foram desenvolvidos estudos que comprovem a eficácia da quercetina em aplicações tópicas, para fins antiinflamatórios e cicatricial, necessitando da realização de bioensaios que ajudem a elucidar a aplicação deste princípio ativo, para o uso terapêutico em úlceras diabéticas, despertando o interesse de várias áreas do conhecimento, a exemplo da área da saúde, tecnologia, engenharia, dentre outras.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais – Certbio, que está localizado no Bloco CJ3, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no período de outubro de 2013 a novembro de 2014.

### 4.2 TIPO DA PESQUISA

Esse estudo é classificado como uma Pesquisa Experimental. Para Gil (2007), a pesquisa experimental consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto.

### 4.3 AMOSTRA

Foram realizados ensaios em triplicata, totalizando em média, a produção de 500 membranas.

### 4.4 MATERIAS

Foram utilizados os seguintes materiais para a obtenção das membranas: **BIOPOLÍMERO** - Quitosana de Baixo Peso Molecular (Sigma Aldrich®); **FLAVONÓIDE** - Quercetina (Sigma Aldrich®); **REAGENTES** - Ácido Acético Glacial (Vetec® Química Fina LTDA); Álcool a 70%; Metanol; Água destilada; Hidróxido de Sódio (Vetec® Química Fina LTDA); Hidróxido de amônia; Tripolifosfato de sódio (Sigma Aldrich®); **OUTROS** - Balão de vidro; Pipetas e Pipetadores; Beckers; Bastão de vidro; Balança de alta precisão; Agitador mecânico e magnético; Termômetro; Phmêtro; Seringas; Placas de petri.



#### 4.5 ETAPAS DA PESQUISA

Esta pesquisa foi desenvolvida em duas etapas: a **Fase Exploratória**, que contém as etapas preliminares da pesquisa, ou seja, a busca de elaboração de metodologia válida para a obtenção das membranas de quitosana e quercetina e a **Fase Experimental**, onde foram desenvolvidas as membranas, já com o controle das variáveis existentes no processo de obtenção do produto final.

#### 4.6 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Os dados foram processados através de ferramentas da estatística descritiva, após análises dos ensaios de caracterização.

#### 4.7 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO

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

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução. A Microscopia Eletrônica analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações, fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica da superfície do sólido, necessária para se conhecer a superfície do material estudado (HOLANDA, 2011).

A caracterização, por MEV foi realizada no aparelho Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada Hitachi, modelo TM-1000, aumento máximo de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

#### **4.7.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)**

O EDS é um ensaio essencial no estudo de caracterização química de materiais, onde os elementos químicos presentes na amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitidos.

Para esta caracterização por EDX foi utilizado um aparelho acoplado ao microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI.

#### **4.7.3 Difração de Raios X (DRX)**

A Difração de raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Essa técnica é usada para se obter informações estruturais importantes sobre a cristalinidade de um composto qualquer, isto é, refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (KAHN, 2013).

As membranas deste estudo foram submetidas à análise por Difração de raios X (DRX), através de Aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação  $K\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA. As análises foram conduzidas a temperatura ambiente, e os filmes foram examinados em um intervalo de  $2\theta$  entre 4,0 e 60,0 graus a uma velocidade de 2°/min.

#### **4.7.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Essa técnica de caracterização é utilizada para obter informações sobre as bandas dos agrupamentos das moléculas e sobre os grupos atômicos que participam da estrutura química dos materiais que possuem frequências de vibração específicas (FOOK, 2005).

Esta análise foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer com faixa de varredura entre 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ .

Para a interpretação das bandas de absorção obtidas para os grupos presentes nos materiais utilizados (quitosana e quercetina), utilizaram-se dados da literatura, os quais são apresentados na Tabela 11.

Tabela 4 - Bandas de absorção da quitosana e quercetina.

LIGAÇÕES	FREQUÊNCIAS VIBRACIONAIS
O-H, N-H	3.331 cm <sup>-1</sup>
CH <sub>2</sub>	2.918 cm <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub>	2.880 cm <sup>-1</sup>
C=O	1.715 cm <sup>-1</sup>
N-H	1.553 cm <sup>-1</sup>
C-O	1.150 cm <sup>-1</sup>
CH <sub>2</sub>	1.407 cm <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub>	1.378 cm <sup>-1</sup>
$\nu(\text{C-O-C})$	1.152 cm <sup>-1</sup>
$\nu(\text{C-O})$	1.057 cm <sup>-1</sup>
$\nu(\text{C-O})$	1.027 cm <sup>-1</sup>
$\nu(\text{C-O-C})$	895 cm <sup>-1</sup>

Fonte: Costa (2005); Holanda (2011).

#### 4.7.5 Estudo Térmico: curva de TG e DSC

A termogravimetria é a técnica de análise térmica em que a variação de massa da amostra é determinada como uma função da temperatura, ou tempo de aquecimento, utilizando um programa controlado de temperatura. Nas curvas TG, a perda de massa é caracterizada por duas temperaturas (no eixo horizontal)  $T_i$  e  $T_f$ , sendo  $T_i$  a temperatura inicial de decomposição e  $T_f$  é a temperatura final. A temperatura inicial de decomposição é a temperatura na qual a variação de massa acumulada atinge o valor que a termobalança é capaz de detectar. A temperatura final é a temperatura na qual a variação de massa acumulada atinge seu valor máximo de degradação, correspondendo ao término da reação. A diferença entre essas duas temperaturas ( $T_f - T_i$ ) é chamada de intervalo de reação, conforme Giolito e Ionashiro (1980)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) avalia a diferença da temperatura fornecida a uma substância sob um material de referência. As curvas

foram analisadas em atmosfera de dinâmica de nitrogênio ( $50\text{mL min}^{-1}$ ) usando amostras de 2 mg e razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$  para análise de transições de fase nos compósitos, quitosana/quercetina, numa faixa de temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  até  $400^{\circ}\text{C}$ . Foi realizado com aparelho DSCQ20 (TA Instruments, EUA).

#### **4.7.6 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos**

Neste teste foram realizados ensaios quantitativos para avaliar a viabilidade celular, partindo-se do princípio de que as células viáveis, uma vez em contato com macrófagos, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas, havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, que pode ser detectado pela leitura da absorvância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é importante para avaliar a biocompatibilidade dos materiais usados na área de saúde e após ser comprovada sua não toxicidade, se dar continuidade aos estudos realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007).

## 5 FASE EXPLORATÓRIA

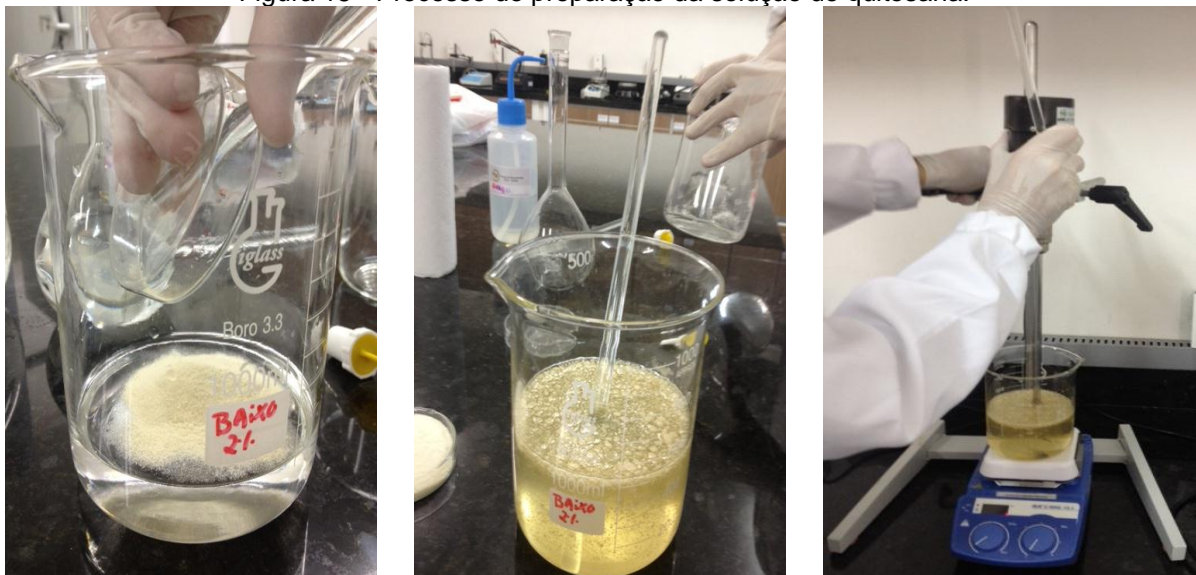
Nesta seção do trabalho serão descritos os métodos utilizados, os resultados preliminares e as conclusões parciais obtidas na obtenção das membranas de quitosana/ quercetina, confeccionadas na fase exploratória da pesquisa, denominadas membranas tipo: A, B, C, D e E.

### 5.1 MÉTODOS

#### 5.1.1 Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo A

A solução de quitosana foi preparada através da dissolução de 10 g de quitosana de baixo peso molecular em 500 ml de uma solução a 1% de ácido acético glacial (v/v); em seguida, homogeneizada com bastão de vidro, foi para o agitador mecânico por 2 horas, finalizando com temperatura de, aproximadamente, 45,0°C, obtendo-se ao final, uma solução de quitosana de 2% (m/v) (ver Figura 20).

Figura 15 - Processo de preparação da solução de quitosana.

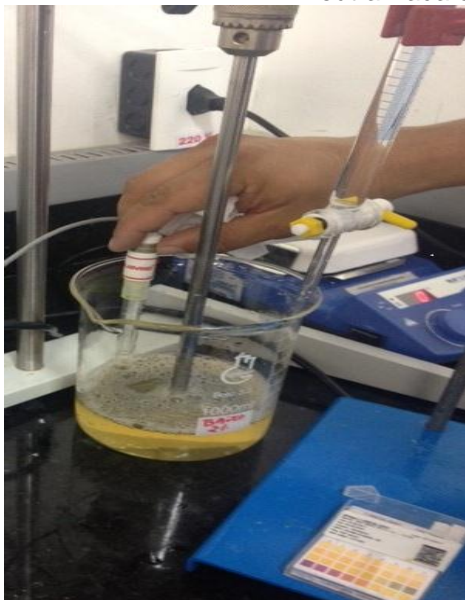


Fonte: Pesquisa direta (2013).

Ao término do processo supracitado, o pH da solução polimérica foi medido e atingiu 3,95. Nesse momento, a solução foi então dividida em dois recipientes (A e

B), onde em um recipiente se adicionou um volume de 30 ml de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 molar, chegando a um pH de 5,0 sob agitação, denominada de solução N (ver Figura 21); para a preparação do hidróxido de sódio foi adicionado 40 g da base em 1 L de água destilada; no recipiente B, não foi adicionado NaOH, denominada de solução B.

Figura 16 - Adição de NaOH na solução de quitosana (a); separação da quitosana: uma quitosana neutralizada e uma não neutralizada (b).



(a)

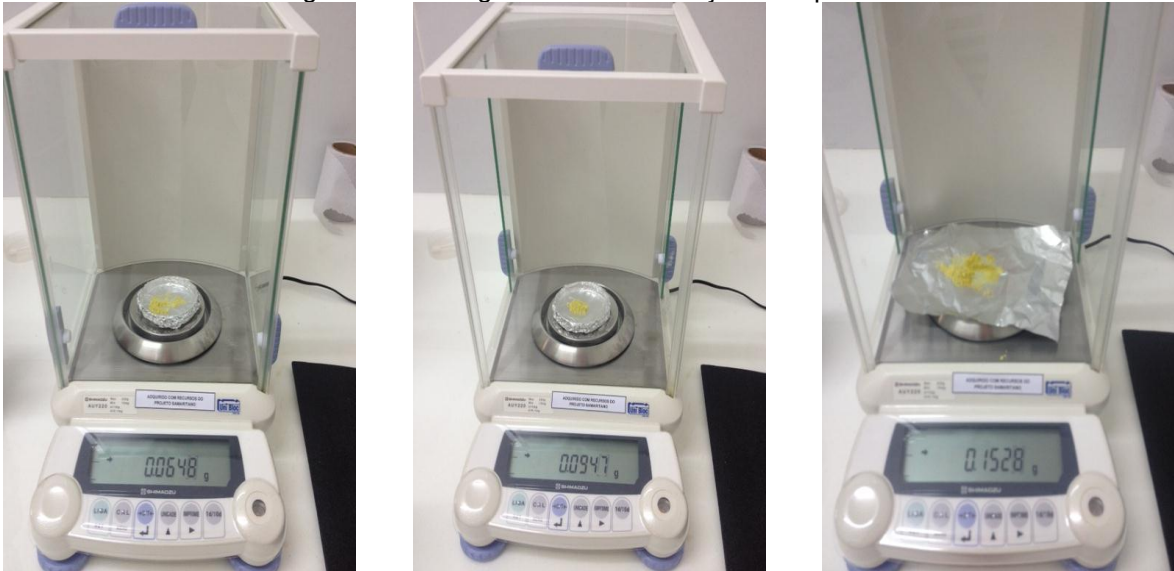


(b)

Fonte: Pesquisa direta (2013).

A quercetina foi pesada em balança de alta precisão, em três concentrações nessa etapa do estudo: 20 mg, 30 mg e 50 mg. Foram produzidas três membranas de cada concentração, e, para tal, pesou-se 60 mg (0,06g) de quercetina para 60 ml de quitosana; 90 mg (0,09g) de quercetina para 60 ml de quitosana e 150 mg (0,15g) de quercetina para o mesmo volume de quitosana, como evidencia a Figura 22.

Figura 17 - Pesagem das concentrações de quercetina.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

A quercetina é solúvel em ácido acético glacial, semelhantemente à quitosana, assim sendo, adicionou-se o pó de quercetina diretamente na solução de quitosana já preparada, buscando-se homogeneidade através da mistura com bastão de vidro por 10 minutos e 20 minutos sob agitação magnética, com 300 rpm, para potencializar a mistura do pó na solução de quitosana (ver Figura 23).

Figura 18 - Adição da quercetina na solução de quitosana neutralizada, seguida da agitação magnética.



Fonte: Pesquisa direta (2013).



Ao término do processo supracitado, o volume de 20 ml da solução foi vertido em placa petri, tendo sido produzidas 12 membranas, abaixo especificadas, denominadas de QN, QQN20, QQN30 e QQN50, conforme evidencia a Tabela 4 e o processo está expresso na Figura 24.

Tabela 5 - Membranas de quitosana neutralizada incorporadas com quercetina através do método A.

<b>MEMBRANAS PRODUZIDAS</b>	<b>ESPECIFICAÇÕES</b>	<b>QUANTIDADE</b>
<b>QUITOSANA 2%</b>	QN	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 20 mg</b>	QQN20	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 30 mg</b>	QQN30	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 50 mg</b>	QQN50	03 – 20 ml por placa

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 19 - Finalização das membranas tipo A.



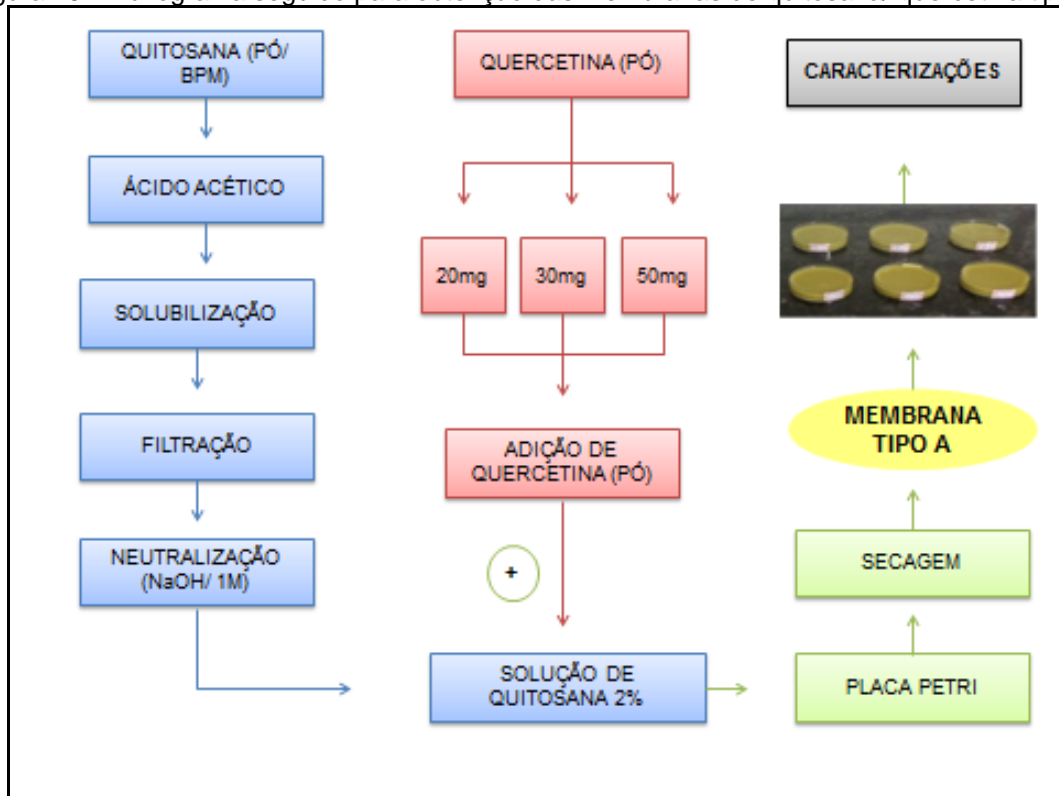
Fonte: Pesquisa direta (2013).

O último processo foi o da secagem, onde as 12 membranas permaneceram secando em temperatura média de 21°C por 48 horas, posteriormente ficaram na estufa, em temperatura ambiente por mais 48 horas, sendo depois retiradas e enviadas para as análises.

A Figura 25 expressa o fluxograma contendo o procedimento adotado para o desenvolvimento das membranas tipo A.



Figura 20 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo A.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

### 5.1.2 Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo B

As membranas do tipo B foram preparadas a partir da quitosana sem adição do hidróxido de sódio em solução, com o pH de 3,95. A diluição do pó da quercetina foi feita na solução de quitosana, nas três concentrações anteriormente já citadas; para tal, pesou-se 60 mg de quercetina para 60 ml de quitosana; 90 mg de quercetina para 60 ml de quitosana e 150 mg de quercetina para 60 ml de quitosana, já que em cada placa de petri foi colocado um volume de 20 ml de solução, conforme procedimento adotado nas membranas do tipo A.

Após a adição da quercetina na quitosana, procedeu-se com a mistura da solução em um Becker, com auxílio do bastão de vidro por 10 minutos, somado a mais 20 minutos que cada solução permaneceu no agitador magnético com 300 rpm, para obter melhor homogeneidade.

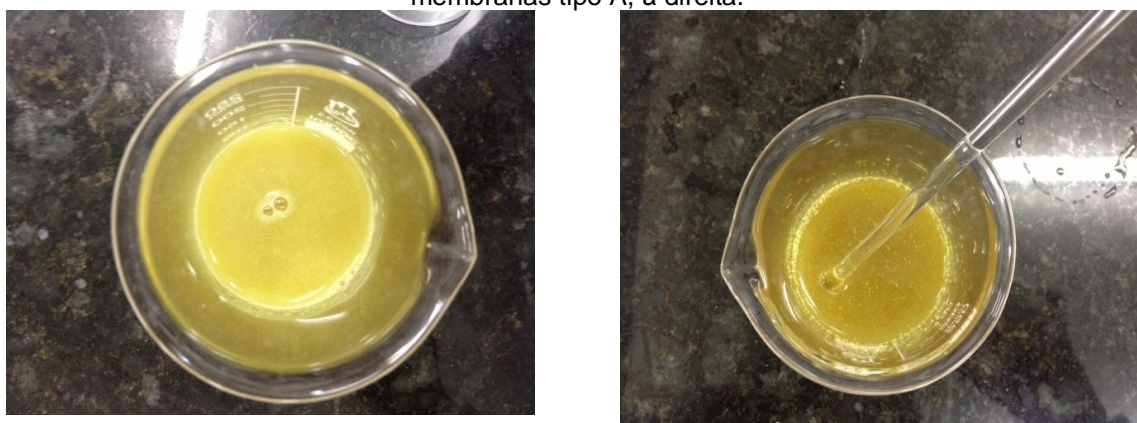
Foram produzidas 12 membranas, denominadas Q+, QQ20+, QQ30+ e QQ50+, conforme exposto na Tabela 5. A Figura 26 mostra a solução de quitosana/quercetina das membranas tipo A e do tipo B.

Tabela 6 – Membranas de quitosana incorporadas com quercetina e neutralizadas em placa através do método B.

MEMBRANAS PRODUZIDAS	ESPECIFICAÇÕES	QUANTIDADE
QUITOSANA 2%	Q+	03 – 20 ml por placa
QUITOSANA/ QUERCETINA 20 mg	QQ20+	03 – 20 ml por placa
QUITOSANA/ QUERCETINA 30 mg	QQ30+	03 – 20 ml por placa
QUITOSANA/ QUERCETINA 50 mg	QQ50+	03 – 20 ml por placa

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 21 – Solução de quitosana/ quercetina das membranas tipo B, à esquerda; solução das membranas tipo A, à direita.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

As membranas do tipo B secaram em temperatura, de aproximadamente 21°C, por 48 horas, em seguida foram para a estufa por mais 48 horas, sendo depois retiradas, seguindo o mesmo processo das membranas do tipo A.

Após secas, as membranas do tipo B foram neutralizadas com hidróxido de sódio a 1 molar, na própria placa petri; foi adicionado, com auxílio de uma seringa, 20 ml deste sal por placa, por 1 hora, observando-se macroscópica e imediatamente, o enrugamento das bordas das membranas, aumento da espessura e mudança de coloração, processo evidenciado na Figura 27.

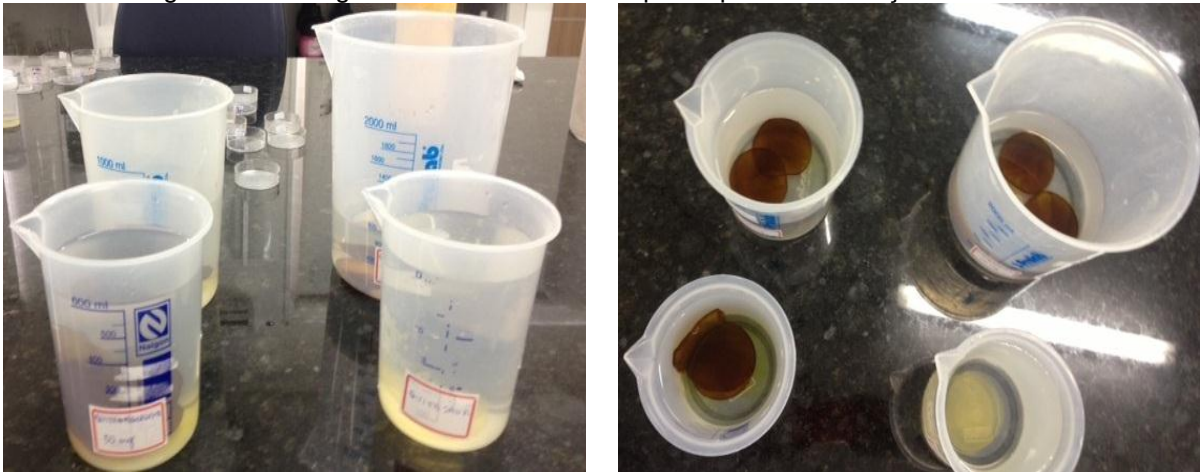
Figura 22 - Processo de neutralização com NaOH das membranas do tipo B.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Depois do contato por 1 hora entre as membranas e o NaOH, elas foram lavadas em água corrente para a retirada do produto; em seguida ficaram imersas em água destilada por 1 hora, em beckers, visando conferir maior fidedignidade aos resultados observados (ver Figura 28).

Figura 23 - Lavagem das membranas do tipo B após neutralização com NaOH.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Após retiradas do banho de imersão, as membranas B foram estiradas em cilindros e fixadas pelas bordas, a fim de facilitar o processo de secagem e o conseqüente envio destas para as análises, como visto na Figura 28. Após 4 horas em temperatura aproximada de 21°C, as membranas já estavam secas.

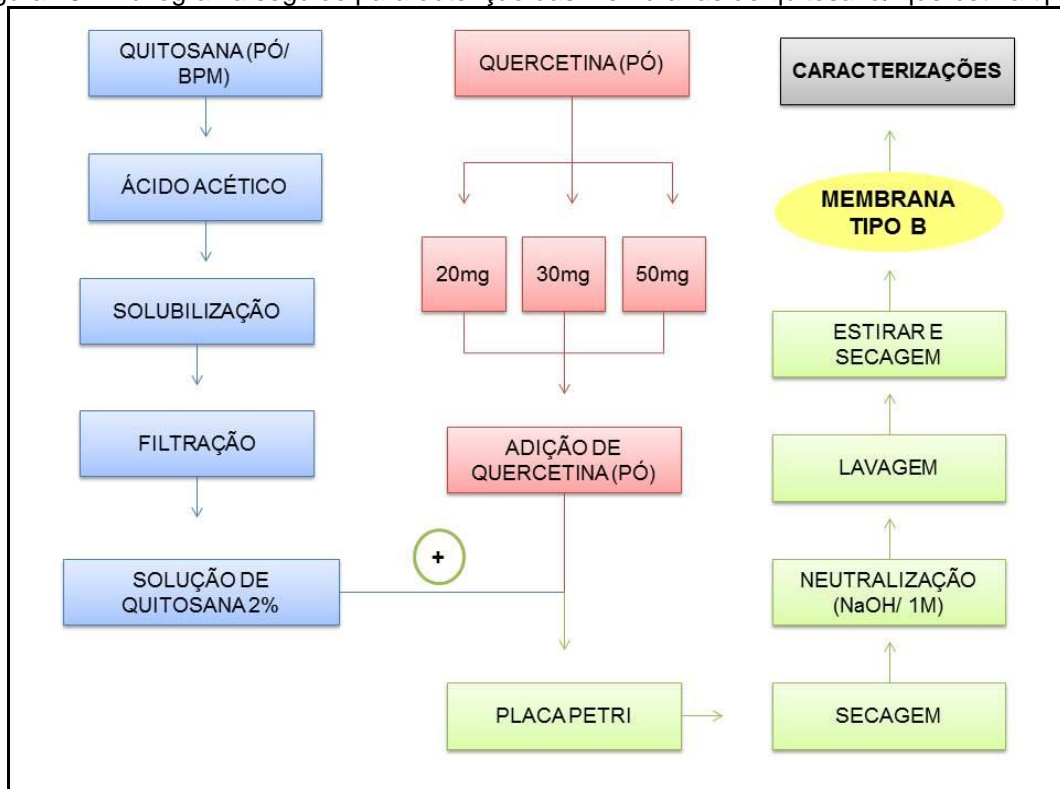
Figura 24 - Processo de secagem das membranas do tipo B.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Mediante o término do processo supracitado, as membranas do tipo B foram recortadas e enviadas para as análises pertinentes. A Figura 30 expressa as etapas seguidas para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo B.

Figura 25 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo B.



Fonte: Pesquisa direta (2013).



### 5.1.3 Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo C

Para a confecção das membranas do tipo C e D foi preparada uma nova solução de quitosana produzida a 2%, com pH final de 4,45 e temperatura de 51,0° C (a primeira solução teve pH de 3,95 e temperatura de 45,0 °C); não houve adição de nenhum solvente para a neutralização da solução de quitosana.

Pesquisas evidenciaram que a quercetina é melhor solubilizada em etanol ou metanol, sob agitação e leve aquecimento, assim sendo, a metodologia utilizada para a confecção das membranas do tipo C utilizou 3,45 mg de quercetina para 1 ml de metanol (ARANTES; AZEVEDO, 2011, SIMÕES et al., 2013).

Para as concentrações de quercetina de 20 mg, 30 mg e 50 mg foram usados, respectivamente, 5,8 ml, 8,7 ml e 14,5 ml de metanol, com as proporções apresentadas na Tabela 6.

Tabela 7 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina em metanol, e neutralizadas em atmosfera de amônia através do método C.

MEMBRANAS PRODUZIDAS	ESPECIFICAÇÕES	QUANTIDADE
<b>QUITOSANA 2%</b>	QM	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 20 mg/ METANOL (17,4 ml)</b>	QQM20	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 30 mg/ METANOL (26,1 ml)</b>	QQM30	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 50 mg/ METANOL (43,5 ml)</b>	QQM50	03 – 20 ml por placa

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Após pesagem da quercetina em balança, o pó foi adicionado ao metanol, utilizando-se um bastão de vidro para realizar a diluição, que em seguida foi para o agitador magnético por 20 minutos, seguindo o processo adotado nas membranas A e B.

Contudo, a agitação realizada desta maneira provocou a evaporação do álcool e conseqüente diminuição do volume final da solução, fatos evidenciados na Figura 31, sendo por isso, excluída a agitação magnética do processo de

preparação dessas membranas, dando preferência à homogeneidade feita manualmente com bastão de vidro.

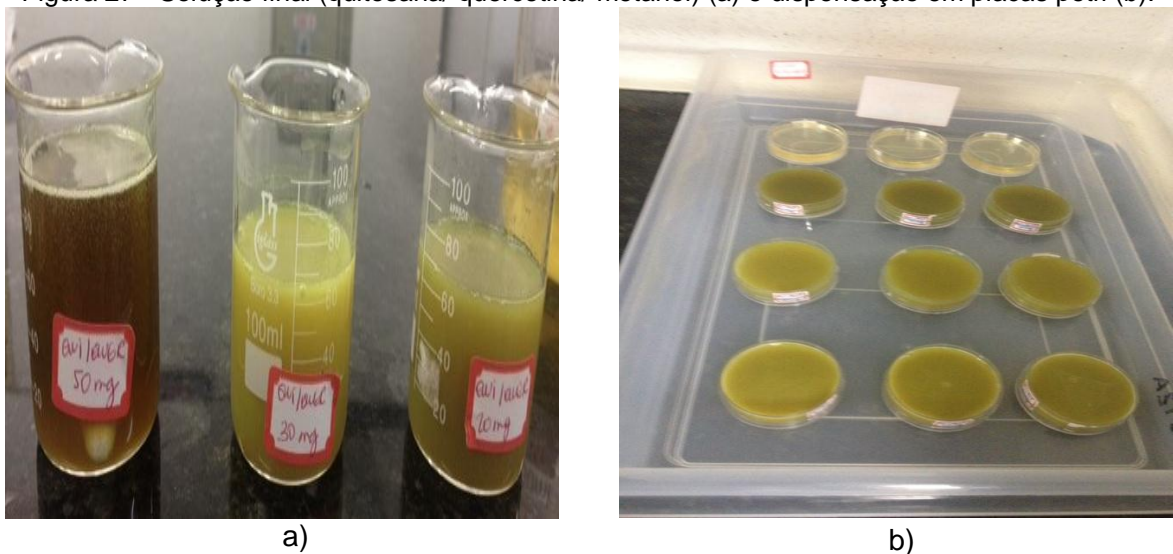
Figura 26 - Processo de agitação magnética da solução e evaporação do metanol.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Após o processo supracitado foi realizada a mistura da solução (quercetina/metanol) na quitosana, sendo dispensada, com auxílio de uma seringa, em placas petri, num volume de 20 ml por placa, situação esta evidenciada na Figura 32.

Figura 27 - Solução final (quitosana/ quercetina/ metanol) (a) e dispensação em placas petri (b).



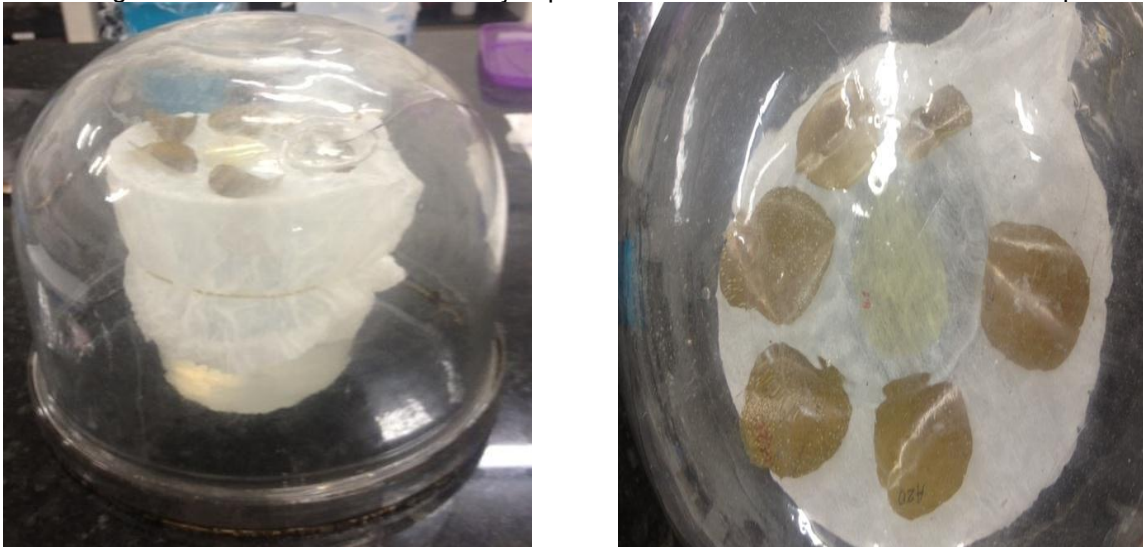
Fonte: Pesquisa direta (2013).

O processo de secagem das membranas do tipo C seguiu a mesma metodologia usada nas membranas anteriores, no entanto, foram neutralizadas por

processo diferente, denominado de neutralização por atmosfera de amônio, onde foi preparada uma solução contendo 10 ml de hidróxido de amônio em 500 ml de água destilada.

Para tal procedimento, colocou-se a solução de hidróxido de amônio em becker plástico, protegida do meio externo através de uma touca descartável, a qual foi fixada pelas bordas com liga elástica, como exposto na Figura 33. As membranas secas foram dispostas, lado a lado, na superfície, uma de cada concentração da quercetina, devido ao espaço físico restrito, isoladas com uma cúpula de vidro. Para a neutralização, as membranas tipo C passaram 23 horas, na superfície cilíndrica e após isso, ficaram em estufa a temperatura ambiente por 48 horas.

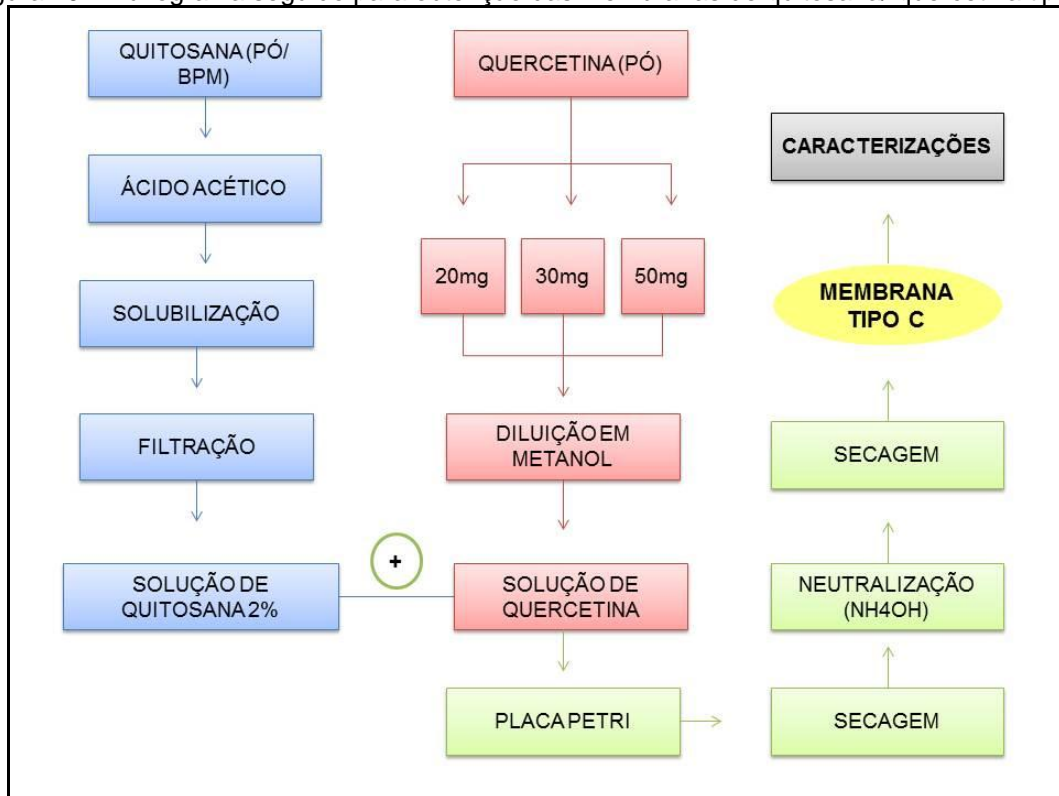
Figura 28 - Processo de neutralização por atmosfera de amônia das membranas tipo C.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Depois dos processos supracitados, as membranas foram recortadas e enviadas para as análises. A Figura 34 evidencia o fluxograma seguido para obtenção das membranas C.

Figura 29 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo C.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

#### 5.1.4 Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo D

As membranas do tipo D foram produzidas utilizando o metanol como solvente para diluição da quercetina, semelhante às membranas tipo C, com exceção de não terem sido submetidas a nenhum processo de neutralização, nem com hidróxido de sódio, nem por atmosfera de amônia.

Convém frisar que, quando a quercetina foi misturada ao metanol, nas três concentrações e volumes já conhecidos e explicitados no item anterior, foi medido o pH, que esteve aproximadamente em 5,0 em todas as soluções de quercetina diluída; ao adicionar a quitosana, o pH baixou para aproximadamente 4, provavelmente, porque a solução de quitosana utilizada tinha pH mais ácido (4,42).

As misturas realizadas, tanto da quercetina com o metanol, como destes com a quitosana se deram manualmente, com auxílio do bastão de vidro, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram dispensadas nas placas petri. As membranas do tipo D produzidas estão descritas na Tabela 7.



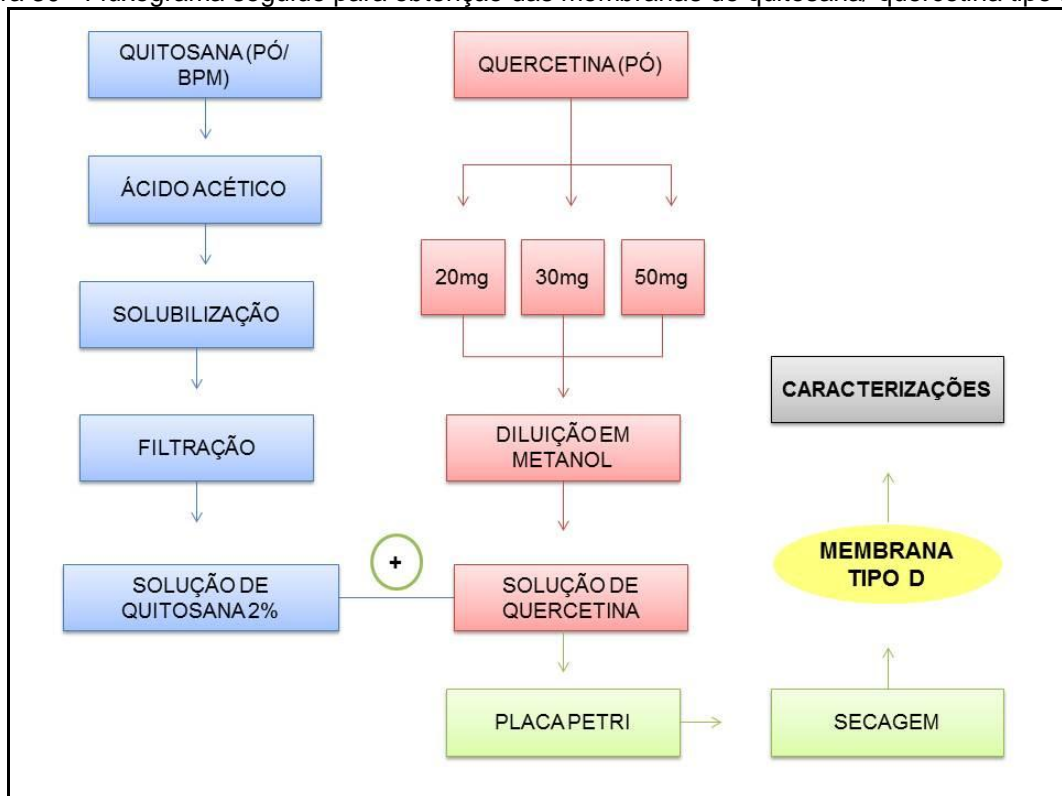
Tabela 8 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina/ metanol, não neutralizadas, através do método D.

MEMBRANAS PRODUZIDAS	ESPECIFICAÇÕES	QUANTIDADE
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 20 mg/ METANOL (17,4 ml)/ SEM NEUTRALIZAR</b>	QQM20sn	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 30 mg/ METANOL (26,1 ml)/ SEM NEUTRALIZAR</b>	QQM30sn	03 – 20 ml por placa
<b>QUITOSANA/ QUERCETINA 50 mg/ METANOL (43,5 ml)/ SEM NEUTRALIZAR</b>	QQM50sn	03 – 20 ml por placa

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Depois dos processos supracitados, as membranas foram recortadas e enviadas para as análises pertinentes. Na Figura 35 está o fluxograma contendo as etapas para o desenvolvimento das membranas tipo D.

Figura 30 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo D.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Durante o desenvolvimento das membranas de quitosana/ quercetina, através dos diversos métodos testados (A, B, C e D) foi possível constatar alguns pontos preliminares relevantes, que estão elencados no Quadro 1. Referem-se a observações/ mudanças macroscópicas, de coloração, textura, espessura, homogeneidade, dureza e estética, constituindo características que despertaram a necessidade de desenvolver outro método a ser seguido, que resultasse em um produto eficaz e com aplicação terapêutica resolutive, para cicatrização de feridas e propriedade anti- inflamatória.

Quadro 1 - Observações preliminares vistas no desenvolvimento das membranas de quitosana incorporadas em quercetina através das metodologias A, B, C e D.

<b>MÉTODOS</b>	<b>OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS</b>
<b>TIPO A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ao término das membranas do tipo A, observou-se presença de grânulos e bolhas, solução com coloração diferente da tonalidade do fármaco, além de apresentar uma solução final mais líquida que viscosa.</li> <li>▪ Formação de um pó na superfície das membranas após a secagem.</li> </ul>
<b>TIPO B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Constatou-se, após o processo de neutralização, mudança aparente na coloração das membranas, sugestivas de oxidação do fármaco, além de que, na lavagem das membranas, a água que escoava era amarela, onde provavelmente houve perda da quercetina.</li> <li>▪ Foi observado, após a secagem, que as membranas ficaram ressecadas, apresentaram-se retraídas, com superfície irregular, sem as ligas de fixação, havendo dificuldade para a seleção de membranas para os ensaios de caracterização.</li> </ul>
<b>TIPO C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A mudança do solvente para diluição da quercetina para o metanol resultou em membranas mais escuras, havendo associação que o pH elevado do álcool pode ter provocado a instabilidade química do fármaco. O processo de neutralização por atmosfera de amônia provocou o aparecimento de bolhas na superfície da membrana.</li> </ul>
<b>TIPO D</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ As membranas tipo D, que não foram neutralizadas, apresentaram-se com resistência mecânica frágil, desintegrando-se facilmente.</li> </ul>

Fonte: Pesquisa direta (2013).

A partir das constatações anteriores, buscaram-se possíveis justificativas que pudessem esclarecer os eventos ocorridos no processo de preparação das membranas obtidas nessa fase preliminar.

Silva et al. (2010) afirma que a quercetina é extensamente degradada em pH neutro e alcalino, em um processo dependente de oxigênio, pois ocorre ionização das hidroxilas do anel C (pirano), induzindo à formação de peróxidos intermediários e conseqüente produtos de degradação. Assim sendo, baseando-se no já exposto na literatura, estruturou-se o método E, controlando o valor do pH, além da modificação de algumas outras variáveis.

### 5.1.5 Método proposto para o desenvolvimento das membranas Tipo E

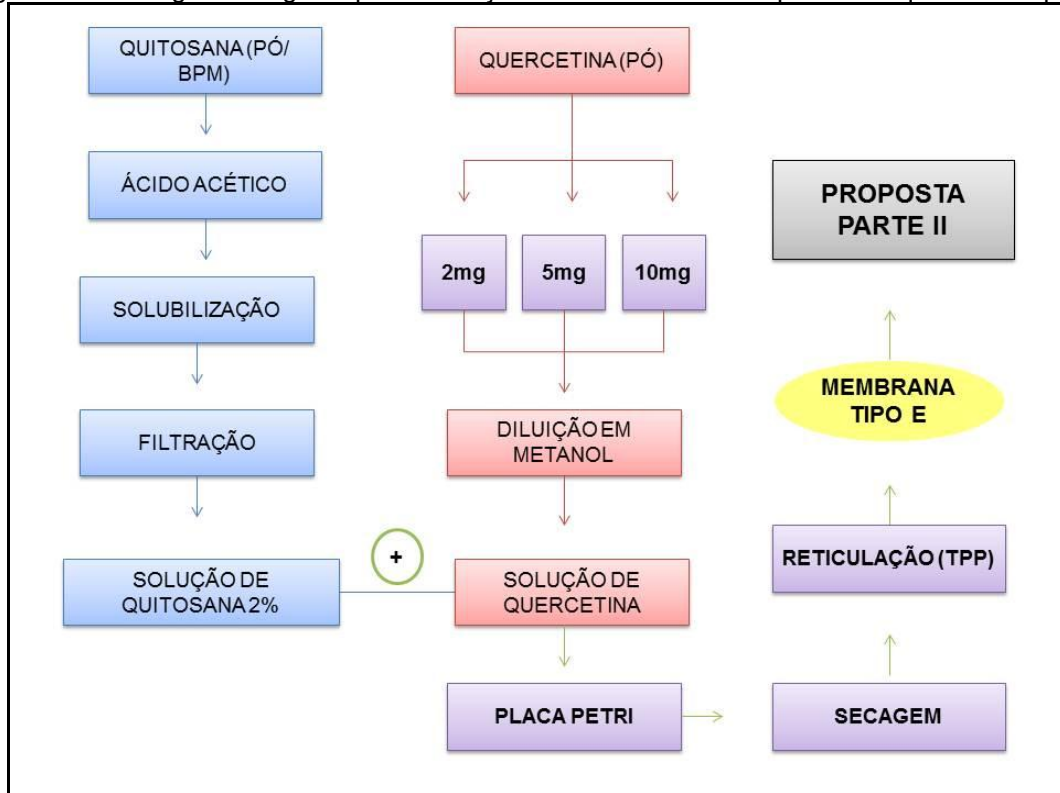
As membranas do tipo E foram produzidas a partir de uma solução de quitosana a 2%, com concentrações de quercetina reduzidas para: 2mg, 5 mg e 10 mg, já que foi observado, macroscopicamente, que as membranas preparadas nos métodos anteriores formavam aglomerados, resultando em filmes não homogêneos. O solvente utilizado foi o metanol, num volume de 10 ml, estabelecido para todas as concentrações de quercetina. O volume de solução final de quitosana/ quercetina vertidas nas placas petri foi de 10 ml por placa, diferentes das com 20 ml, que ficaram muito espessas. O fluxograma seguido para as membranas tipo E está exposto na Figura 36. A tabela 9 evidencia a síntese de tais membranas.

Tabela 9 - Membranas de quitosana, incorporadas com quercetina em metanol, através do método E.

MEMBRANAS PRODUZIDAS	ESPECIFICAÇÕES	QUANTIDADE
QUITOSANA/ QUERCETINA 2 mg/ METANOL (10 ml)	QQM2	03 – 10 ml por placa
QUITOSANA/ QUERCETINA 5 mg/ METANOL (10 ml)	QQM5	03 – 10 ml por placa
QUITOSANA/ QUERCETINA 10 mg/ METANOL (10ml)	QQM10	03 – 10 ml por placa

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 31 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipo E.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

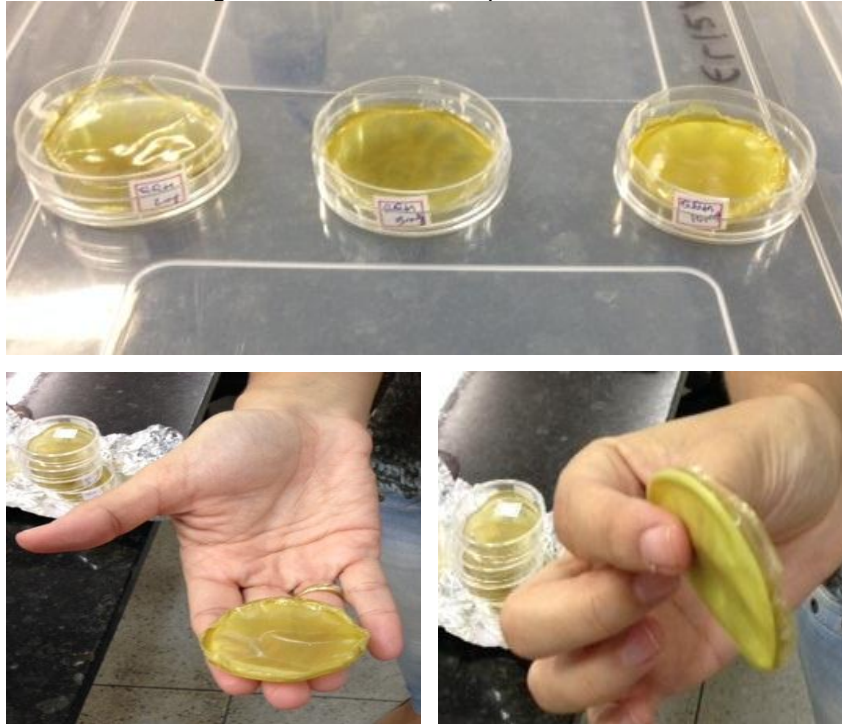
A solução de quitosana apresentou pH de 4,18 e o solvente (metanol) 7,34. Após realizar as misturas metanol/quercetina com diferentes concentrações, observou-se uma média de pH de 6,54. Em seguida, ao adicionar as misturas quercetina/metanol na solução de quitosana, a média do pH alterou para 4,63.

O processo de secagem utilizado nas membranas do tipo E foi distinto dos anteriores, o qual foi mantido sob refrigeração, aproximadamente 4° C por 7 dias e protegidas da luz ambiente.

Macroscopicamente, as membranas do tipo E mantiveram coloração semelhante à quercetina – amarelada -, resultando em um filme mais homogêneo e uniforme, no entanto, ficaram quebradiços, com resistência mecânica frágil. A fim de melhorar as características mecânicas dos filmes, eles foram imersos em água, situação em que expandiram e desmancharam; outro teste foi a imersão em etanol, fato este que não alterou as características dos filmes, e por fim, foi feito o teste de colocá-las em Tripolifosfato de Sódio (TPP) a 1% (v/v), por 30 minutos, tendo constatado o possível aumento da resistência mecânica do filme à tração manual e manutenção das características da membrana, ou seja, a aparência é de não ter

haver qualquer reação química indesejável. Observa-se, na Figura 37, mostra as membranas do tipo E finalizadas.

Figura 32 - Membranas tipo E finalizadas.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

O TPP é um solvente que age como reticulante, se ligando aos pontos livres de  $H^+$  do filme, conferindo-lhe uma possível neutralização aos filmes, tendo o pH de 9,0 (FERNANDES, 2009).

Assim sendo, o processo seguido para obtenção das membranas obtidas através das metodologias A, B, C e D foi otimizado e modificado, resultando no método E, o qual apresentou um produto com características e propriedades desejáveis (Figura 36). Após isso, o método foi novamente adaptado e passou a ser denominado Método X e Método Y, sendo desenvolvidas membranas através destes, que tiveram seus resultados expressos na Fase Experimental desse trabalho.

No Quadro 2 está expressa uma síntese das variáveis trabalhadas em cada metodologia desenvolvida na parte 1 deste trabalho, visando a obtenção de membranas de quitosana incorporadas com quercetina.

Quadro 2 - Síntese das variáveis trabalhadas nas metodologias A, B, C, D e E.

<b>MEMBRANAS</b>	<b>VARIÁVEIS</b>	<b>NEUTRALIZAÇÃO</b>
<b>TIPO A</b>	QUITOSANA BPM 2%; QUERCETINA – 20, 30 e 50 mg; SECAGEM EM TEMPERATURA AMBIENTE E EM ESTUFA; VOLUME DE 20 ml POR PLACA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adição de NaOH na solução de quitosana;</li> <li>▪ Adição da quercetina em solução.</li> </ul>
<b>TIPO B</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neutralização das membranas em placa petri com NaOH;</li> <li>▪ Adição da quercetina em solução.</li> </ul>
<b>TIPO C</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neutralização por Atmosfera de Amônia;</li> <li>▪ Solvente metanol.</li> </ul>
<b>TIPO D</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Não houve neutralização;</li> <li>▪ Solvente metanol.</li> </ul>
<b>TIPO E</b>	QUITOSANA BPM 2%; QUERCETINA – 2, 5 e 10 mg; SECAGEM SOB REFRIGERAÇÃO; VOLUME DE 10 ml POR PLACA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Não houve neutralização;</li> <li>▪ Solvente metanol;</li> <li>▪ Reticulação em TPP.</li> </ul>

Fonte: Pesquisa direta (2013).

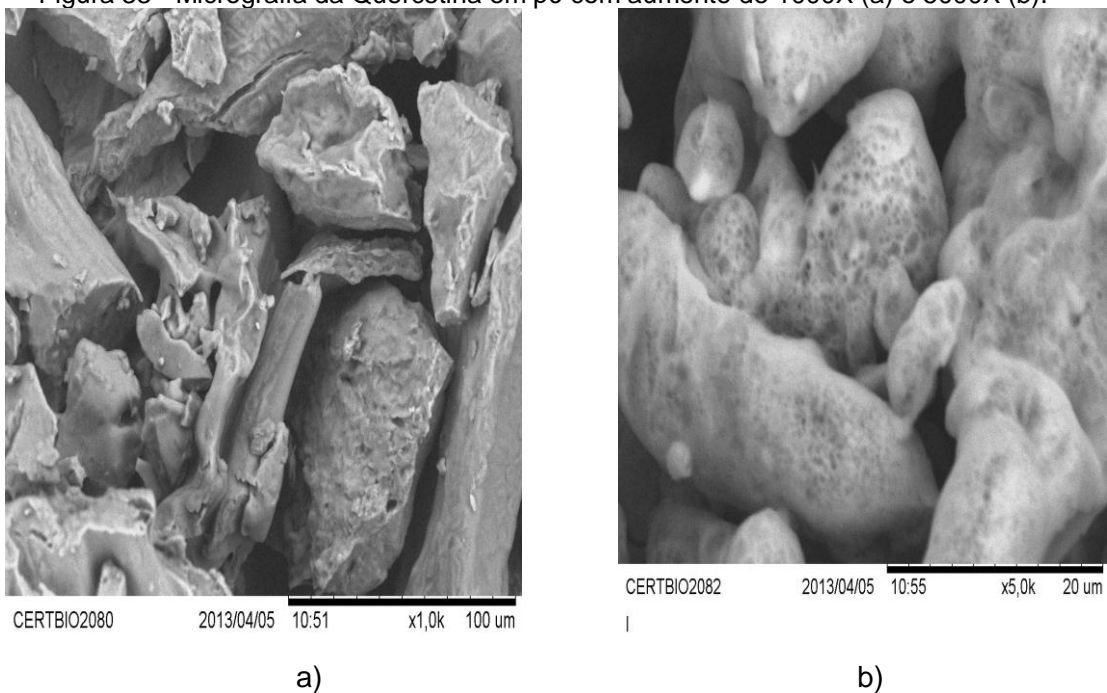
## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO: FASE EXPLORATÓRIA

Nesta seção do trabalho serão apresentados os obtidos na Fase Exploratória, através dos ensaios de: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios X (DRX).

### 5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Observa-se, na Figura 46, que a quercetina em pó apresenta partículas de tamanhos irregulares e variados, com forma pouco definida de bastões e geometria inespecífica, presença de poros, como observado na micrografia com aumento de 5000 X (b).

Figura 33 - Micrografia da Quercetina em pó com aumento de 1000X (a) e 5000X (b).



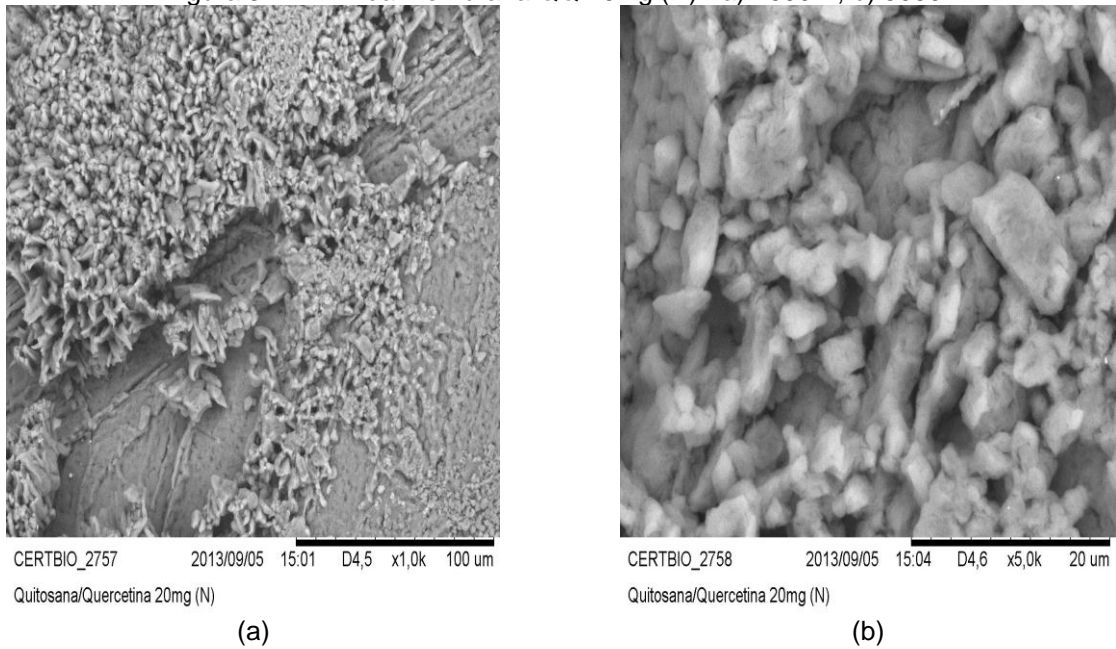
Fonte: Pesquisa direta (2013).

### 5.2.2 Micrografias das Membranas Tipo A

A Figura 47 ilustra as micrografias das membranas de quitosana com quercetina na concentração de 20 mg, com aumento de 1000 k (a) e de 5000 k (b) e a Figura 48 ilustra o EDS das mesmas amostras.

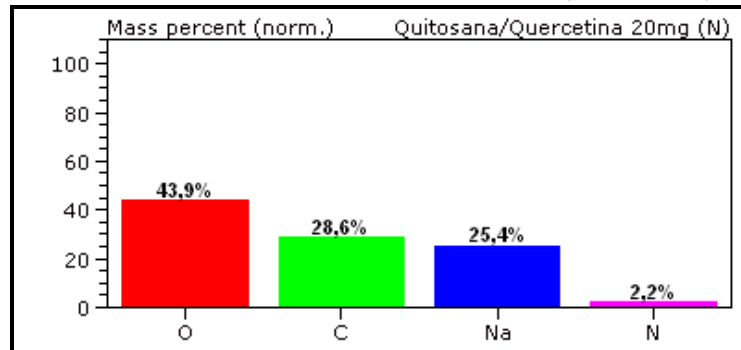
Observa-se, no espectro de EDS, a presença dos elementos Oxigênio (O) e Carbono (C), característicos da quitosana corroborando com Holanda (2011) e Sousa (2012), além do Sódio (Na), provavelmente resquício do processo de neutralização, já que para a confecção destas membranas, foi adicionado o Hidróxido de Sódio (NaOH) na solução de quitosana.

Figura 34 - MEV da Membrana QQ 20mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 35 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg.



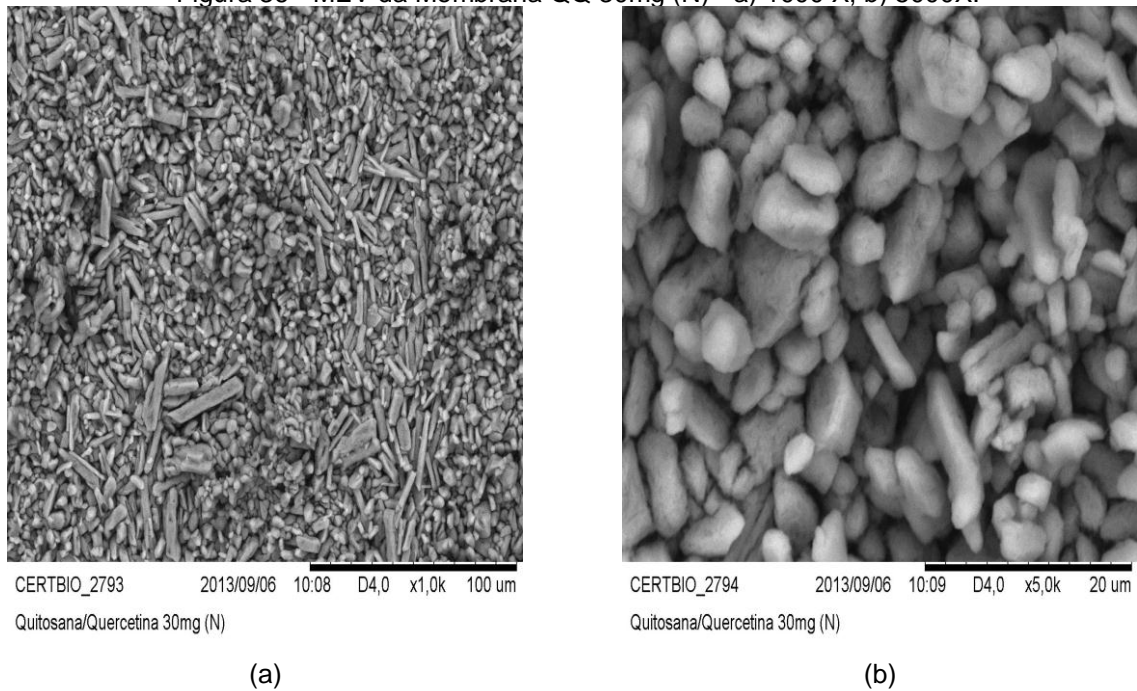
Fonte: Pesquisa direta (2013).

Foi observado que todas as membranas obtidas através desse processo de adição do Hidróxido de Sódio na solução de quitosana apresentaram, na superfície do filme, a formação de sal, possivelmente acetato de sódio, perceptível tanto macroscopicamente, quanto microscopicamente (Figura 46), fato que pode ser comprovado pelos resultados de EDS e FTIR.

Com relação à Figura 49, na qual a membrana apresenta concentração de quercetina de 30 mg, constatou-se, morfologia em forma de esferas e bastões, de tamanhos variados e distribuídos em toda superfície da membrana, fato este confirmado no aumento de 5000K, compatível com a estrutura da quercetina, somada a presença do acetato de sódio.

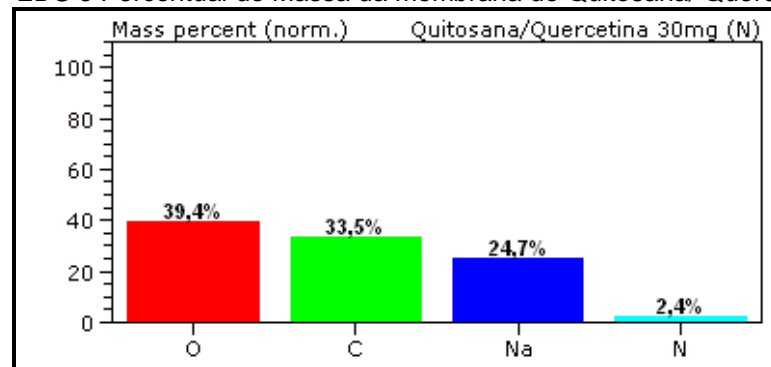


Figura 36 - MEV da Membrana QQ 30mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 37 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg.

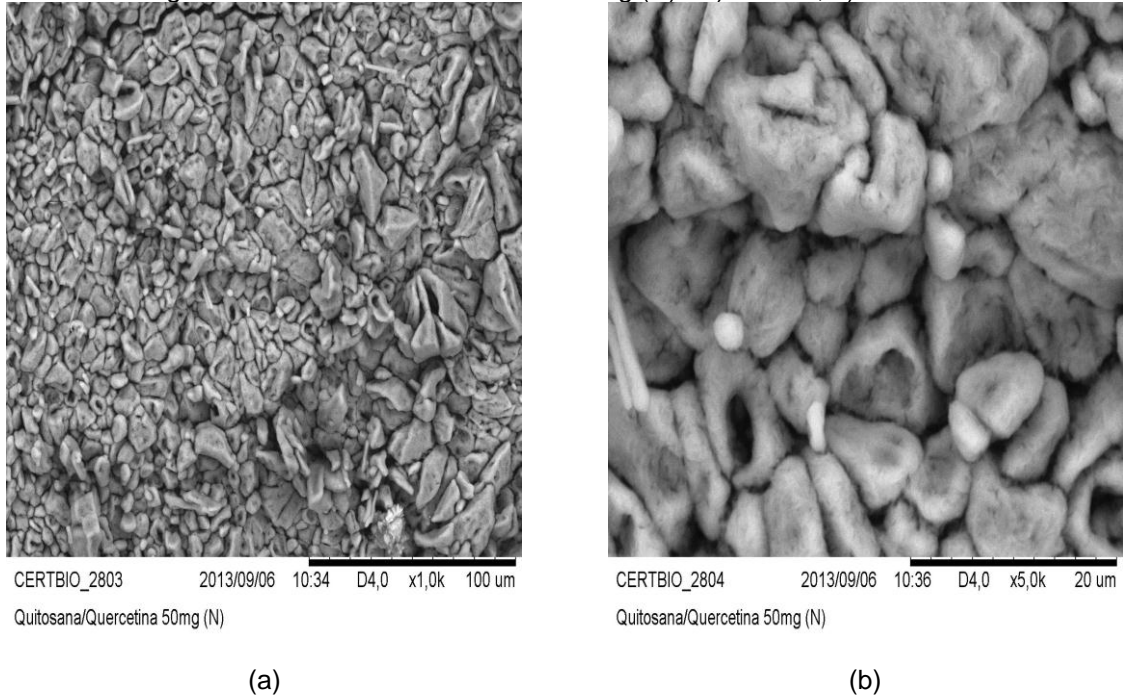


Fonte: Pesquisa direta (2013).

Destaca-se, na análise por EDS da Figura 50, a presença dos elementos Oxigênio (O) e Carbono (C), além do sódio (NaOH), fato este associado ao processo de adição do Hidróxido de Sódio na solução de quitosana.

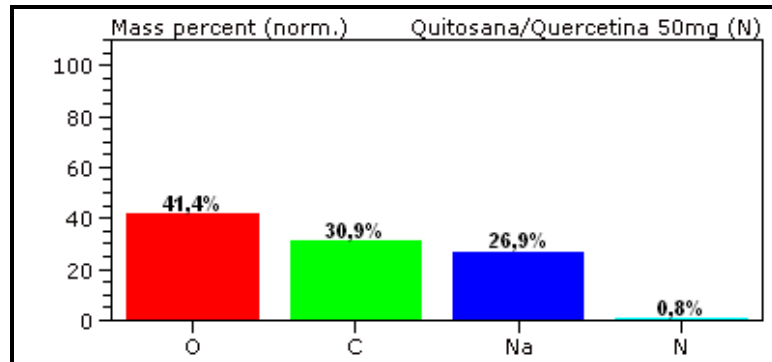
A Figura 51 ilustra as micrografias das membranas de quitosana/quercetina na concentração de 50 mg, o que permite observar uma superfície com maior quantidade de partículas, em formatos e dimensões variadas, no aumento de 1000k, o que também foi constatado no aumento de 5000k (b), bem mais evidente que nas micrografias de 20 e 30 mg, podendo inferir que quanto maior a concentração da quercetina, maior a quantidade deste pó na superfície da amostra.

Figura 38 - MEV da Membrana QQ 50mg (N) - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 39 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Qitosana/ Quercetina 50mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na análise de EDS representada na Figura 52 foram encontrados os elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), compatíveis com os elementos que constituem a quercetina e a quitosana, além da presença de uma maior quantidade de Sódio (Na).

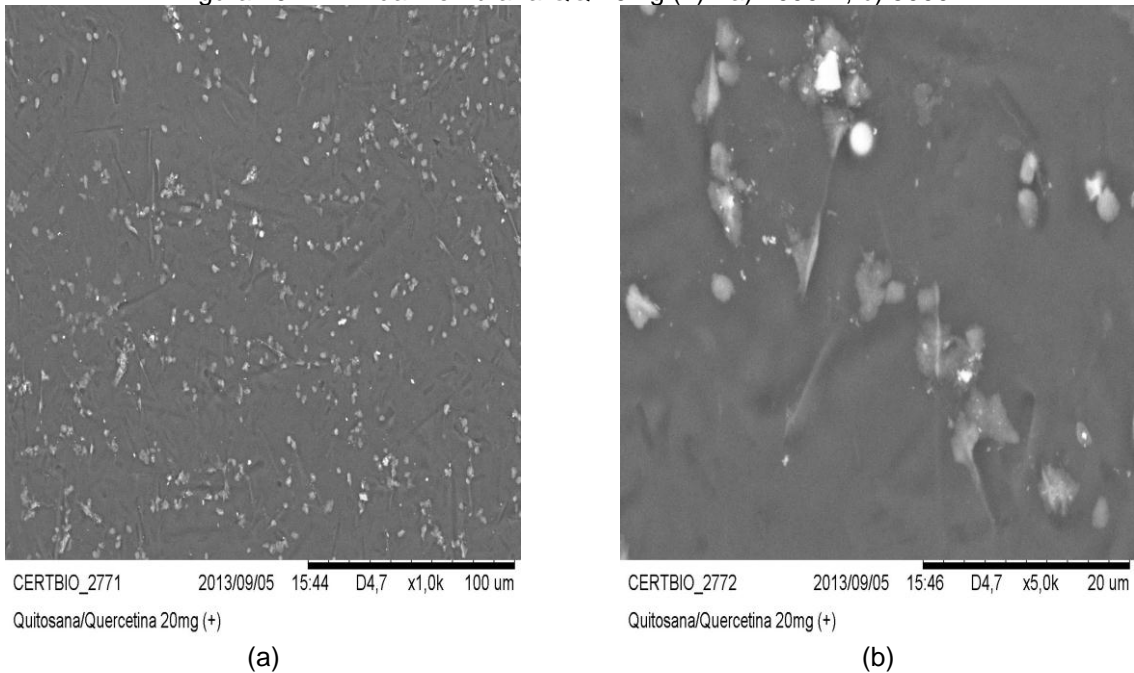
### 5.2.3 Micrografias das Membranas Tipo B

Observa-se, na Figura 53, a micrografia referente às membranas quitosana/quercetina, na concentração de 20 mg, as quais passaram pelo processo de

neutralização com Hidróxido de Sódio na placa petri, e que depois foram lavadas em água corrente e permaneceram imersas em água destilada por uma hora.

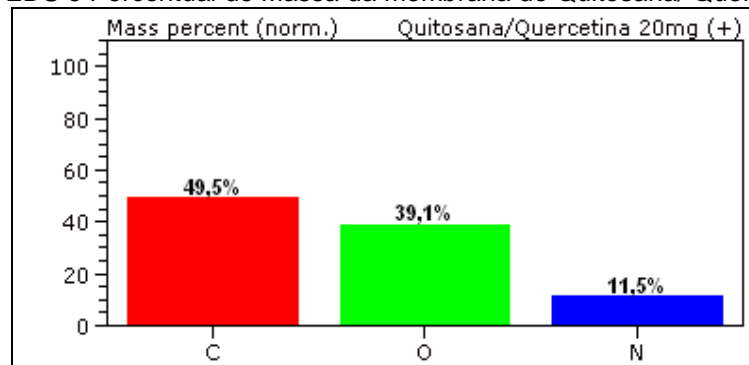
Com uma ampliação de 1000x (a), foi possível encontrar aglomerados, entre as quais estão espaços livres de fármaco, contendo, especialmente uma matriz homogênea, sem aglomerados; observa-se ainda, na ampliação de 5000x (b), que a superfície livre de aglomerados possui depressões estriadas que possivelmente seja devido a retirada do fármaco pelo processo de neutralização, pois a água utilizada para lavagem das membranas apresentou coloração semelhante à quercetina, ou seja, amarela (Figura 52).

Figura 40 - MEV da Membrana QQ 20mg (+) - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 41 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg.

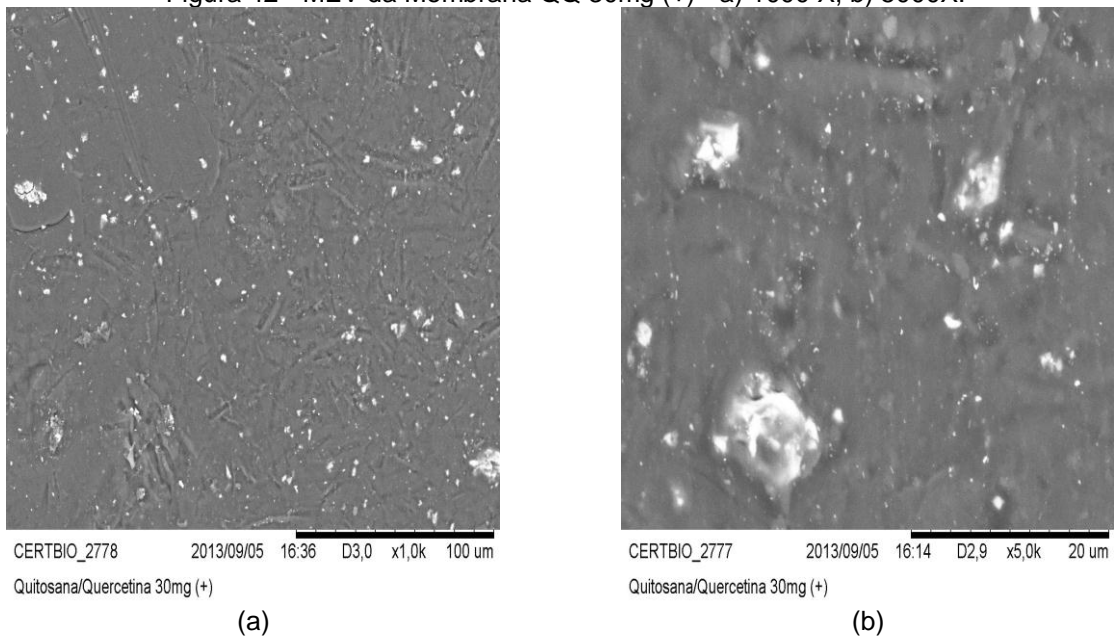


Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na análise de EDS foram detectados os elementos químicos: carbono, oxigênio e nitrogênio, que estão presentes na quercetina (Carbono e Oxigênio) e na quitosana (Carbono, Oxigênio e Nitrogênio), não tendo sido encontrado o sódio, possivelmente devido à efetividade do processo de lavagem (Figura 53).

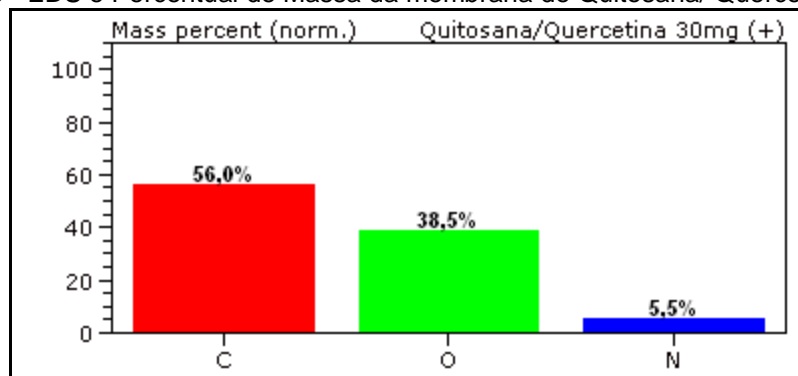
A micrografia da Figura 55 é referente às membranas quitosana/quercetina, na concentração de 30 mg de fármaco; constata-se que, em relação as micrografias das membranas com 20 mg de quercetina, nesta há mais aglomerados, quanto maior quantidade de fármaco no filme, aspecto confirmado no aumento de 5000x (b); visualiza-se ainda, maior quantidade de partículas dispersas na matriz polimérica.

Figura 42 - MEV da Membrana QQ 30mg (+) - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 43 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

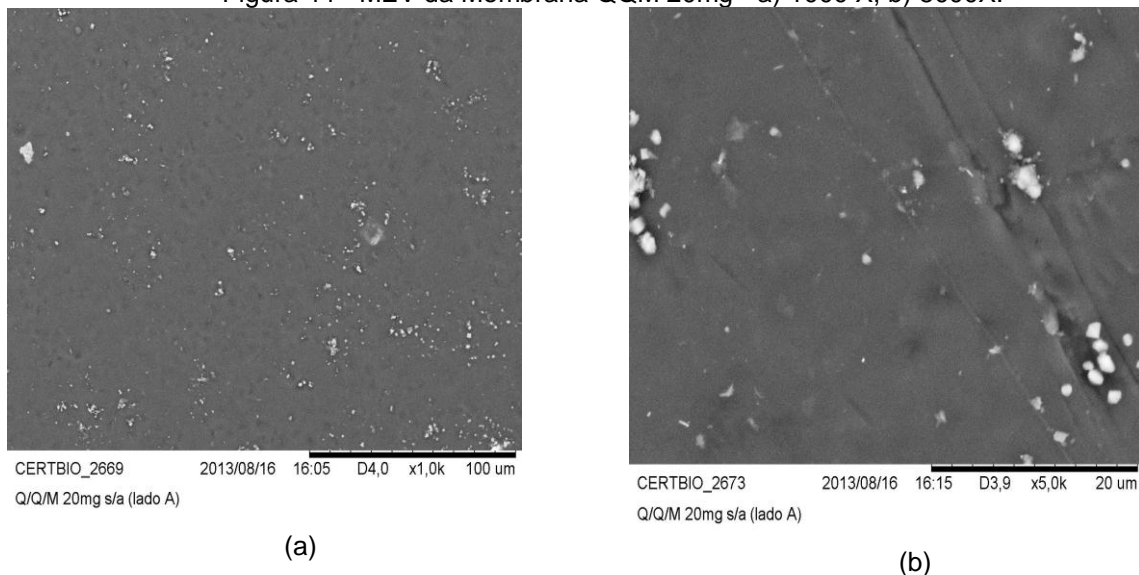
A partir do ensaio de EDS representado na Figura 56, foram encontrados os elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), compatíveis com os materiais utilizados nos experimentos.

#### 5.2.4 Micrografias das Membranas Tipo C

As membranas tipo C foram obtidas por processo distinto; nesta, a quercetina foi solubilizada em metanol e a neutralização se deu por atmosfera de amônia.

As micrografias expostas na Figura 57 (a e b) evidenciam a presença da quercetina, em forma de aglomerados, dispersos na matriz de quitosana, contudo, não se observam as marcas estriadas nas micrografias das membranas obtidas pela metodologia tipo B.

Figura 44 - MEV da Membrana QQM 20mg - a) 1000 X, b) 5000X.

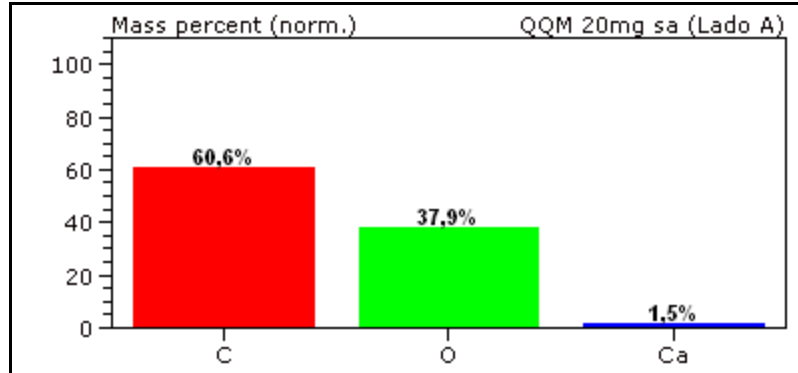


Fonte: Pesquisa direta (2013).

No ensaio de EDS representado na Figura 58 foram encontrados os elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Cálcio (Cálcio), sendo este último, resultado de uma possível contaminação da membrana.



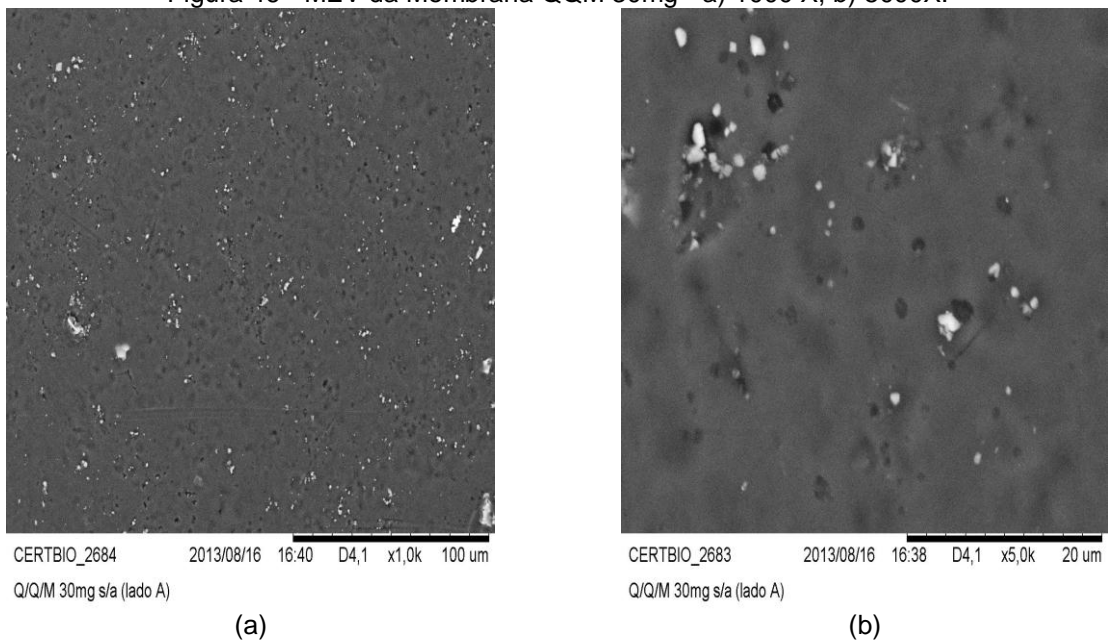
Figura 45 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 20mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na micrografia da Figura 59, observa-se maior quantidade do fármaco, em relação ao anterior, tanto no aumento de 1000k (a), quanto no aumento de 5000k, sendo constatada a presença de aglomerados, como também se visualiza “marcas” escuras esféricas, que pode estar associada à existência de bolhas nas membranas.

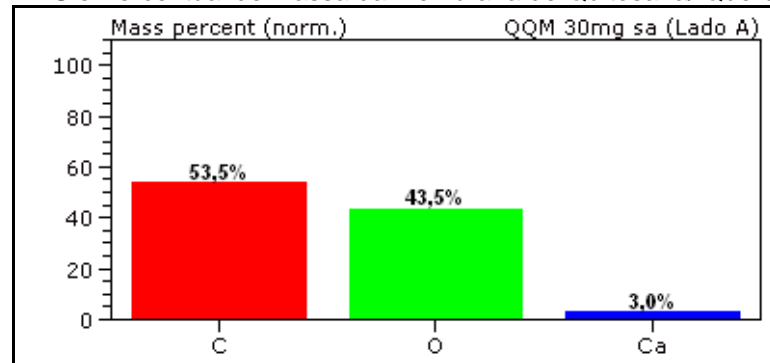
Figura 46 - MEV da Membrana QQM 30mg - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na Figura 60 evidenciou-se o ensaio de EDS da membrana confeccionada com 30 mg de quercetina, observando-se, como na anterior, a presença do elemento químico Cálcio (Ca), não proveniente de nenhum dos materiais utilizados, podendo ter havido a contaminação da membrana.

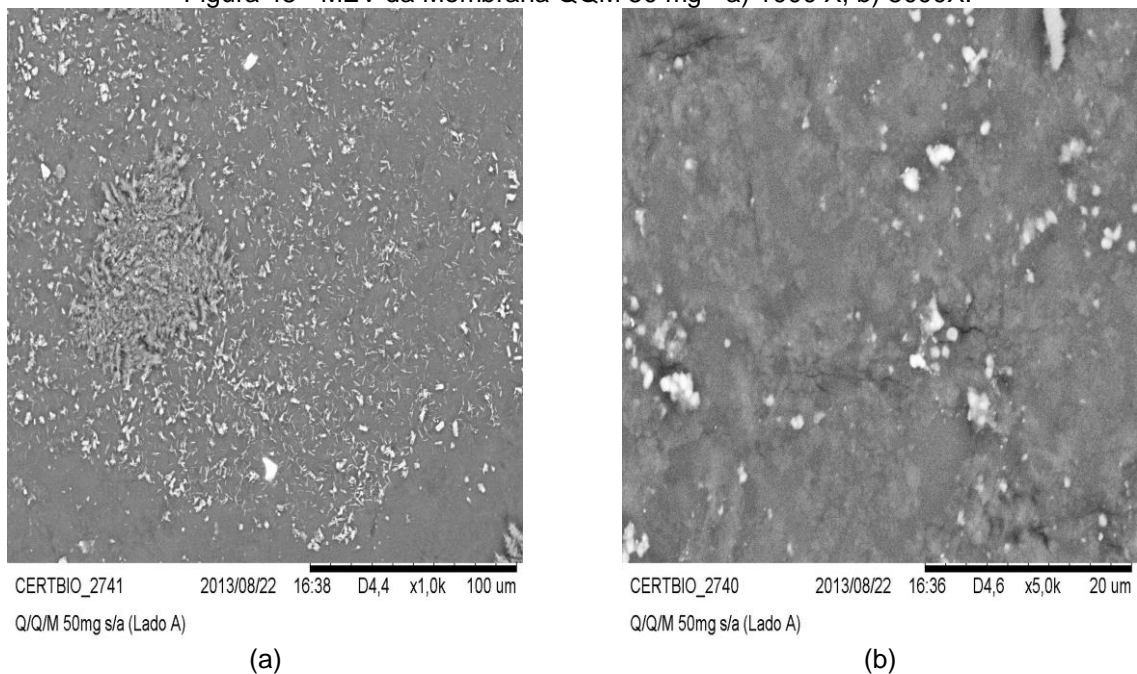
Figura 47 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 30mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

A micrografia exposta na Figura 61 evidenciou maior quantidade de fármaco dispersa na matriz de quitosana, em ambos os aumentos (a e b), contudo, no aumento de 1000X (a), observou-se maior preenchimento da matriz polimérica com o fármaco e no aumento de 5000k (b), também se observou a formação de maior quantidade de aglomerados de quercetina.

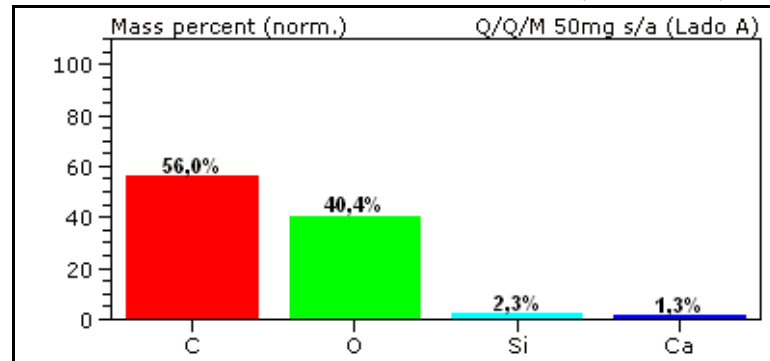
Figura 48 - MEV da Membrana QQM 50 mg - a) 1000 X, b) 5000X.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

A Figura 62 expõe o ensaio de EDS da membrana com 50 mg de quercetina, sendo encontrado, além do Carbono (C) e Oxigênio (O), o Cálcio (Ca) e Silício (Si), devido a provável contaminação da membrana por resíduos de silicone, material bastante utilizado no laboratório, onde foram realizados os ensaios.

Figura 49 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana/ Quercetina 50mg.



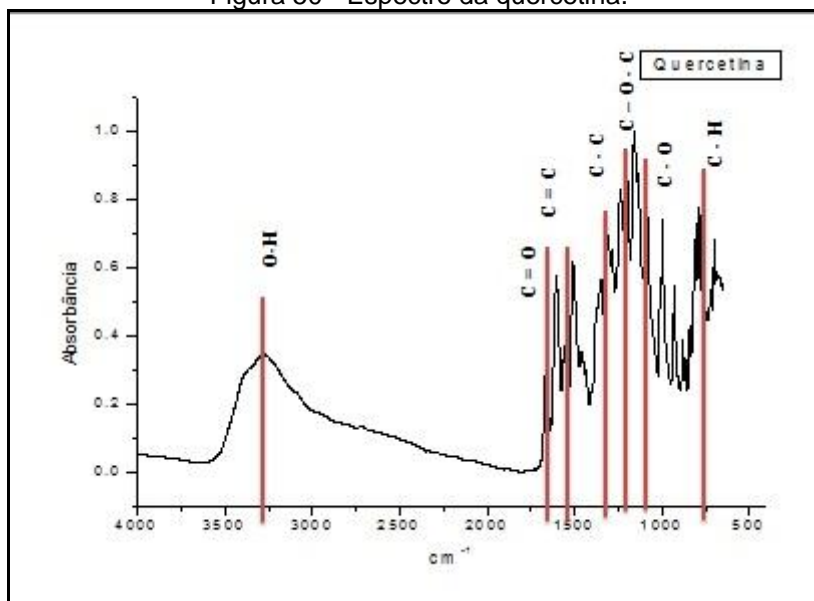
Fonte: Pesquisa direta (2013).

### 5.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para identificar as bandas características dos grupos presentes e também para observar a possível interação entre os grupos funcionais das moléculas que compõem as substâncias utilizadas: quercetina e quitosana. Para tal, estudaram-se a quitosana e a quercetina em pó; as membranas quitosana/quercetina, nas três concentrações de 20, 30 e 50 mg, através das quatro metodologias diferentes: A, B, C e D.



Figura 50 - Espectro da quercetina.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Observa-se, na Figura 63, o espectro na região do infravermelho para a quercetina pura, no qual foram visualizados picos correspondentes aos principais grupos funcionais que caracterizam este flavonóide, onde predominam as ligações O-H, correspondendo ao primeiro pico observado, na frequência de  $3.331\text{ cm}^{-1}$ ; a ligação do tipo C=O, no anel pirano, na frequência de  $1.715\text{ cm}^{-1}$ ; as ligações C=C, na frequência de  $1.650\text{ cm}^{-1}$ , e as ligações C-C, na frequência de  $1.450\text{ cm}^{-1}$ , que ocorrem em grande número, talvez sendo por isso visualizado picos maiores; ainda ocorrem ligações do tipo C-O-C, em 1250 e ligações C-O, com frequência em  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

Na Tabela 12 estão contidas as atribuições das frequências vibracionais observadas na quercetina.

Tabela 10 - Atribuições de frequências vibracionais observadas na quercetina.

LIGAÇÕES	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C-C})$	$\nu(\text{C-O-C})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{C-H})$
Quercetina	3331	1715	1650	1450	1250	1100	750

Fonte: Pesquisa direta (2013).

Analisando o espectro de infravermelho obtido da quercetina, pode-se dizer que a amostra deste estudo apresentou as bandas características deste flavonóide,

corroborando com os estudos de Costa (2005), as quais estão expostos na Tabela 13, o número de onda e as respectivas atribuições das bandas de absorção da quercetina.

Tabela 11 - Bandas de absorção no FTIR da quercetina.

NÚMERO DE ONDA (CM <sup>-1</sup> )	ATRIBUIÇÃO
3500 - 3200 (OH)	Deformação axial de O-H, pontes de hidrogênio intramoleculares
1800 – 1650 (C=O)	Carbonila deslocada e formação de ponte de hidrogênio intramolecular
1600 – 1475 (C=C)	Estiramento que ocorre aos pares (aromáticos)
1450 (C-C)	Estiramento
1150 - 1085(C-O-C)	Deformação axial assimétrica
1250 – 1000 (C-O)	Estiramento forte
900-690 (C-H)	Deformação forte fora do plano de compostos aromáticos

Fonte: Costa (2005).

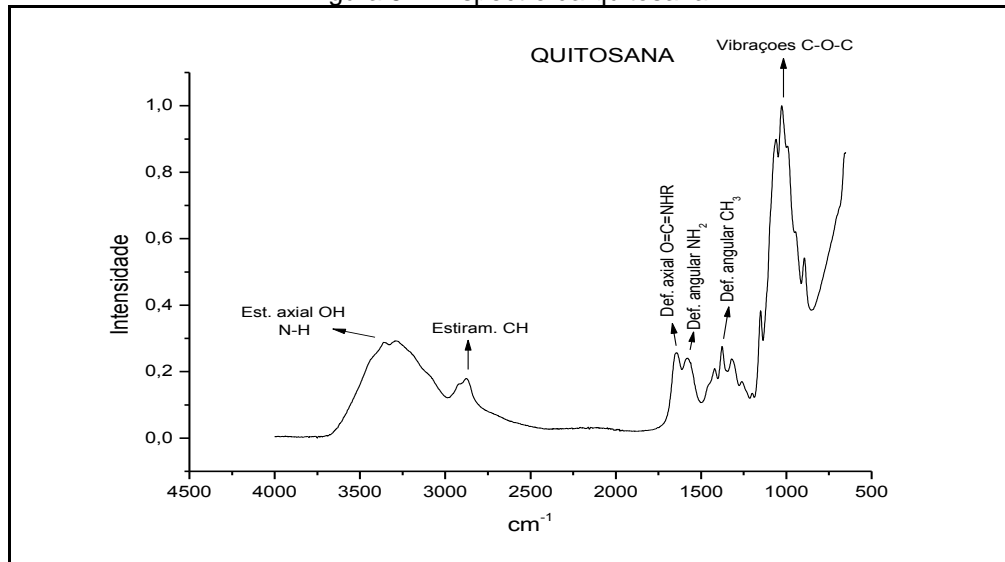
O espectro de infravermelho obtido da amostra de quitosana está apresentado na Figura 63, onde se observa um pico de absorção em 3331 cm<sup>-1</sup>, semelhante ao observado por Holanda (2011), Wang, Du e Liu (2004) e Fidèles (2010), os quais obtiveram, em seus espectros, bandas de estiramento entre 3400 a 3500 cm<sup>-1</sup>, atribuindo-se a tais picos, a vibrações de estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ ou N-H. Hennig (2009) diz que a esta banda intensa corresponde à deformação angular da ligação O-H presente na estrutura de quitosana, sobrepondo as bandas de ligação entre N-H, presentes na mesma região do polissacarídeo.

A banda em 2918 cm<sup>-1</sup> e 2.880 cm<sup>-1</sup> é atribuída às vibrações de estiramento do grupo C-H (CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, simétrico e assimétrico) e, além disso, uma banda característica da deformação angular do CH<sub>2</sub> aparece na região de 1378 cm<sup>-1</sup> dados que apontam que a quitosana utilizada neste estudo é um produto parcialmente desacetilado (SIONKOWSKA et al., 2004).

As bandas de 1643 cm<sup>-1</sup> e 1553 cm<sup>-1</sup> correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. Segundo Arof e Osman (2003), a existência dessas duas bandas está relacionado a presença de grupos amidas reforçando que a quitosana não foi completamente desacetilada.

As bandas de absorção na região de 1152 e 895  $\text{cm}^{-1}$  são provenientes do estiramento de ligações C-O-C, e as bandas de 1057 e 1027  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a vibrações de estiramento do grupo C-O, unindo características da estrutura da quitosana, conforme constatado por Holanda (2011).

Figura 51 - Espectro da quitosana.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Avaliando a Tabela 14, verificou-se que as bandas de absorção da quitosana deste estudo estão de acordo com Ponciano (2010) e Holanda (2011).

Tabela 12 - Bandas de absorção no FTIR da quitosana.

NÚMERO DE ONDA ( $\text{CM}^{-1}$ )	ATRIBUIÇÃO
3331	Deformação axial de O-H e N-H do grupo $\text{NH}_2$
2918 e 2880	Deformação axial de C-H de grupos $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$
1643	Estiramento da ligação C=O
1553	Deformação angular N-H do grupo $\text{NH}_2$ (amina)
1377	Deformação angular do C-H de $\text{CH}_3$
1152 e 895	Deformação axial do C-O-C da ligação éter
1057 e 1027	Vibrações de estiramento do grupo C-O

Fonte: Ponciano (2010).

### 5.2.6 Espectros das Membranas de Quitosana Tipo A e Tipo B

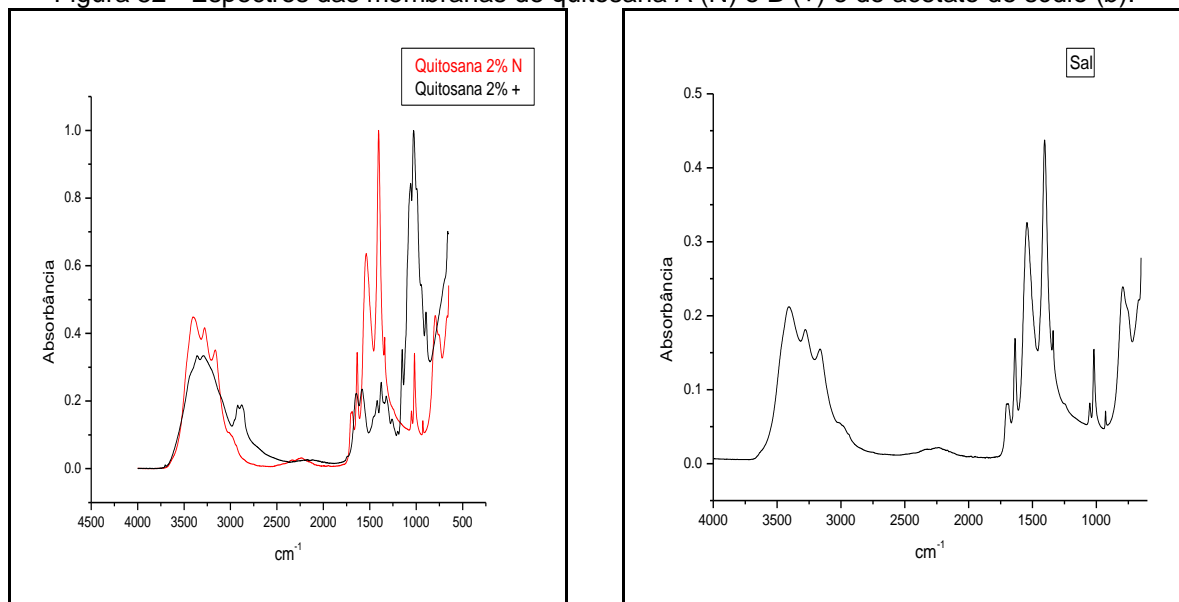
A membrana de quitosana tipo A foi obtida através de uma solução contendo Hidróxido de Sódio (NaOH), com um pH 5, codificada em (N); já a membrana de

quitosana tipo (+) foi neutralizada em placa de petri com Hidróxido de Sódio, e depois foi lavada com água destilada e submetidas a secagem.

Na Figura 64a, observam-se os espectros das membranas de quitosana para fins comparativos, visando facilitar a apresentação dos resultados.

Pôde-se observar, no espectro da Figura 65a, que ocorreu a formação do acetato de sódio, fato este confirmado pela Figura 65b e pelo ensaio de MEV e EDS, onde foi observada a presença desse pó. Constatou-se, que a membrana N possui as absorções relativas a este sal, constatando-se deslocamento do pico de deformação axial do C-O-C da ligação éter, em 1000. Já a membrana tipo +, apresenta espectro semelhante à quitosana pura, já apresentada na Figura 61, com preservação de todos os picos e bandas de absorção características.

Figura 52 - Espectros das membranas de quitosana A (N) e B (+) e do acetato de sódio (b).



(a)

(b)

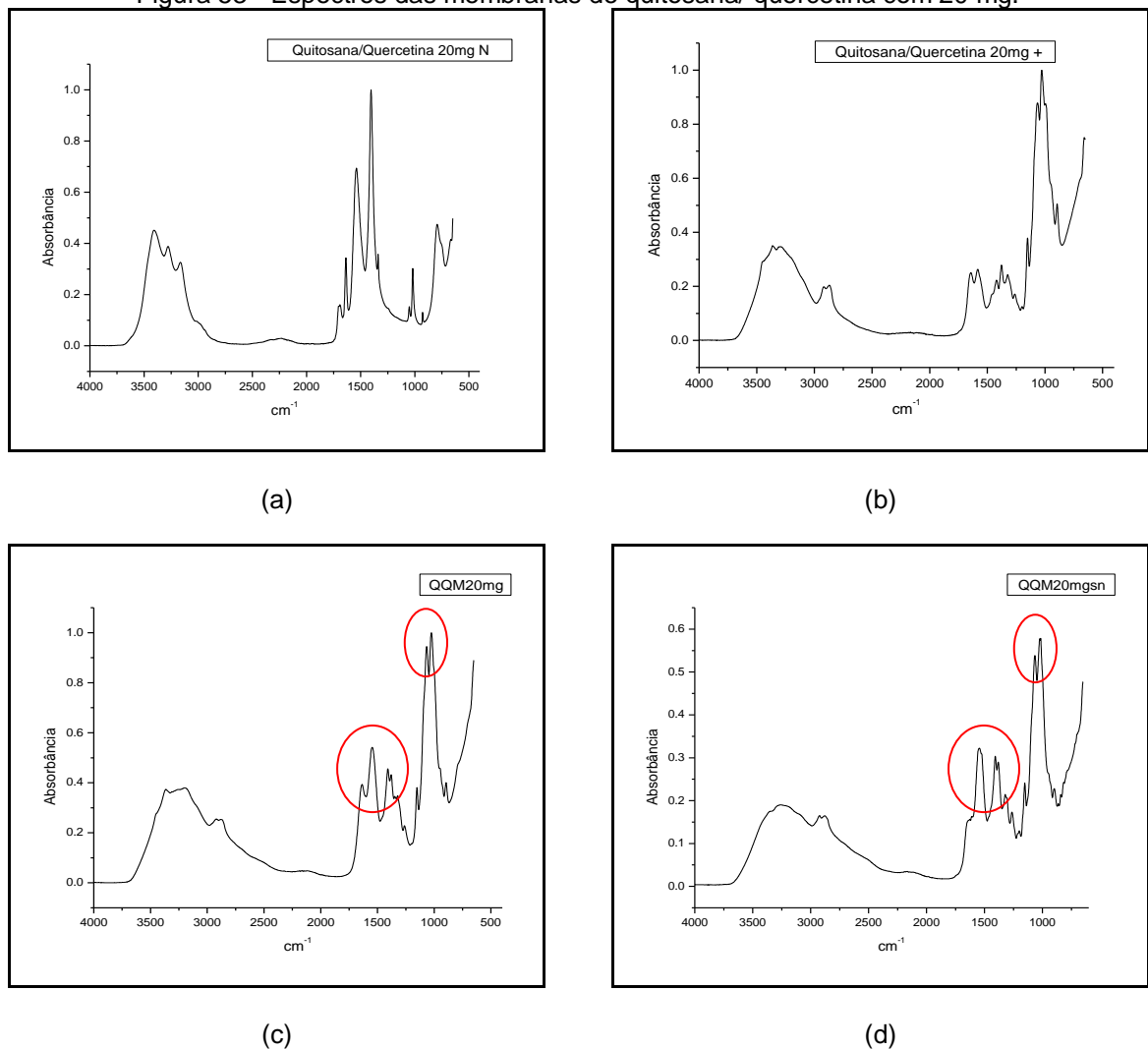
Fonte: Pesquisa direta (2013).

Os espectros contidos na Figura 66 foram decorrentes das membranas obtidas após diluição de 20 mg da quercetina na solução de quitosana. Após analisar os espectros desta figura, constataram-se alterações significativas entre os mesmos, sendo a Figura 65a com um perfil semelhante ao observado com o espectro do acetato de sódio (Figura 64b); e o espectro 65b apresenta semelhança às bandas características da quitosana.

Os espectros (c) e (d), da Figura 66, assemelham-se à quitosana, com a presença das absorções relativas da mesma. No entanto, observou-se a presença dos picos entre 1600-1475, que coincidem com as deformações por estiramento que ocorrem aos pares nos anéis aromáticos da quercetina. Em relação ao espectro das membranas da Figura 66d, observa-se, além dos pico das ligações C=C, na frequência de  $1.600\text{ cm}^{-1}$ , e das ligações C-C, na frequência de  $1.450\text{ cm}^{-1}$ , o engrossamento da banda correspondente a ligação C-O, na frequência de  $1.000\text{ cm}^{-1}$ , aspecto relacionado ao espectro do fármaco.

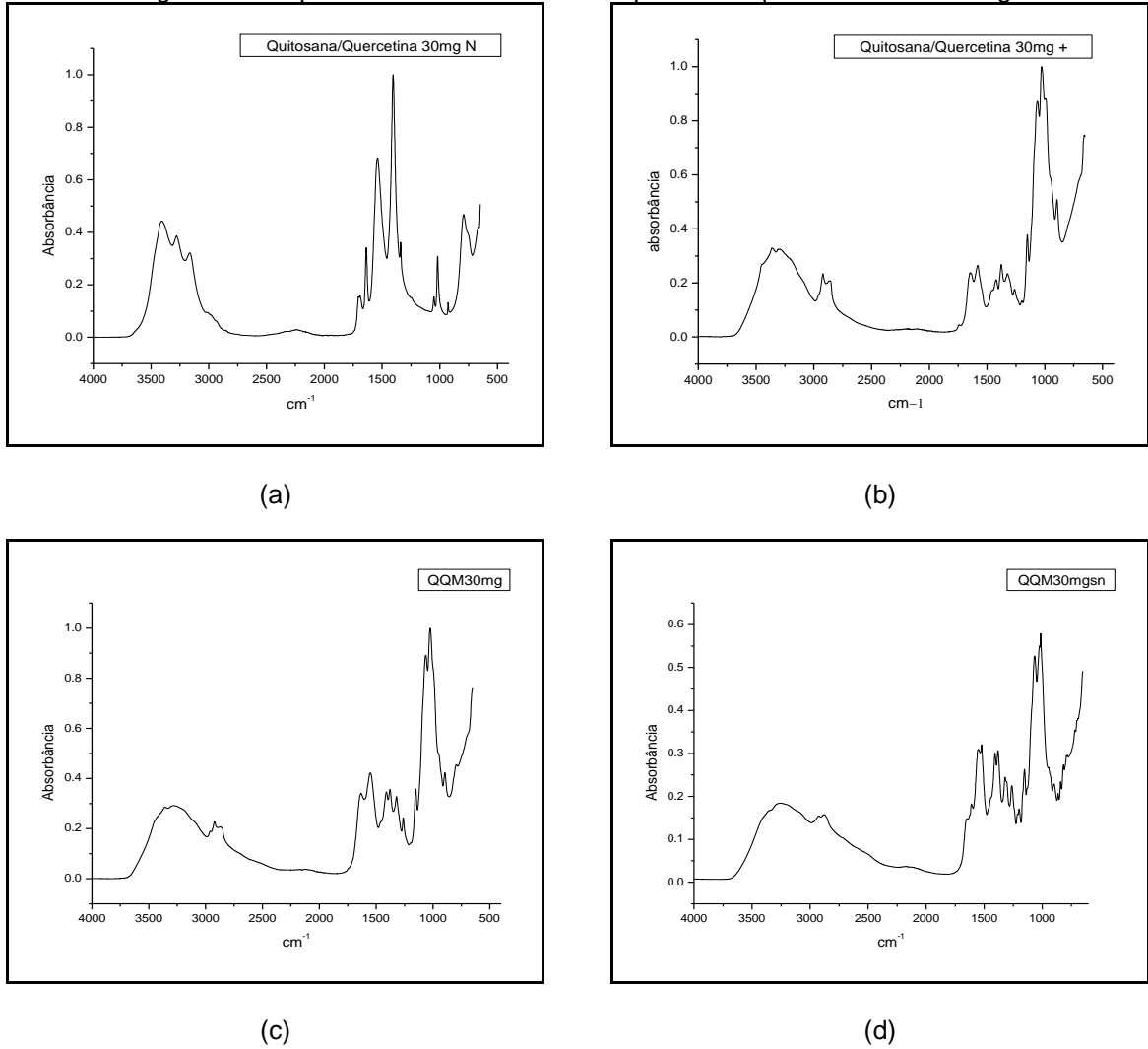
Ao analisar os espectros das Figuras 65, 66 e 67 não foram observadas alterações significativas, proporcionais à quantidade de fármaco utilizado nas membranas de quitosana incorporadas com quercetina.

Figura 53 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 20 mg.



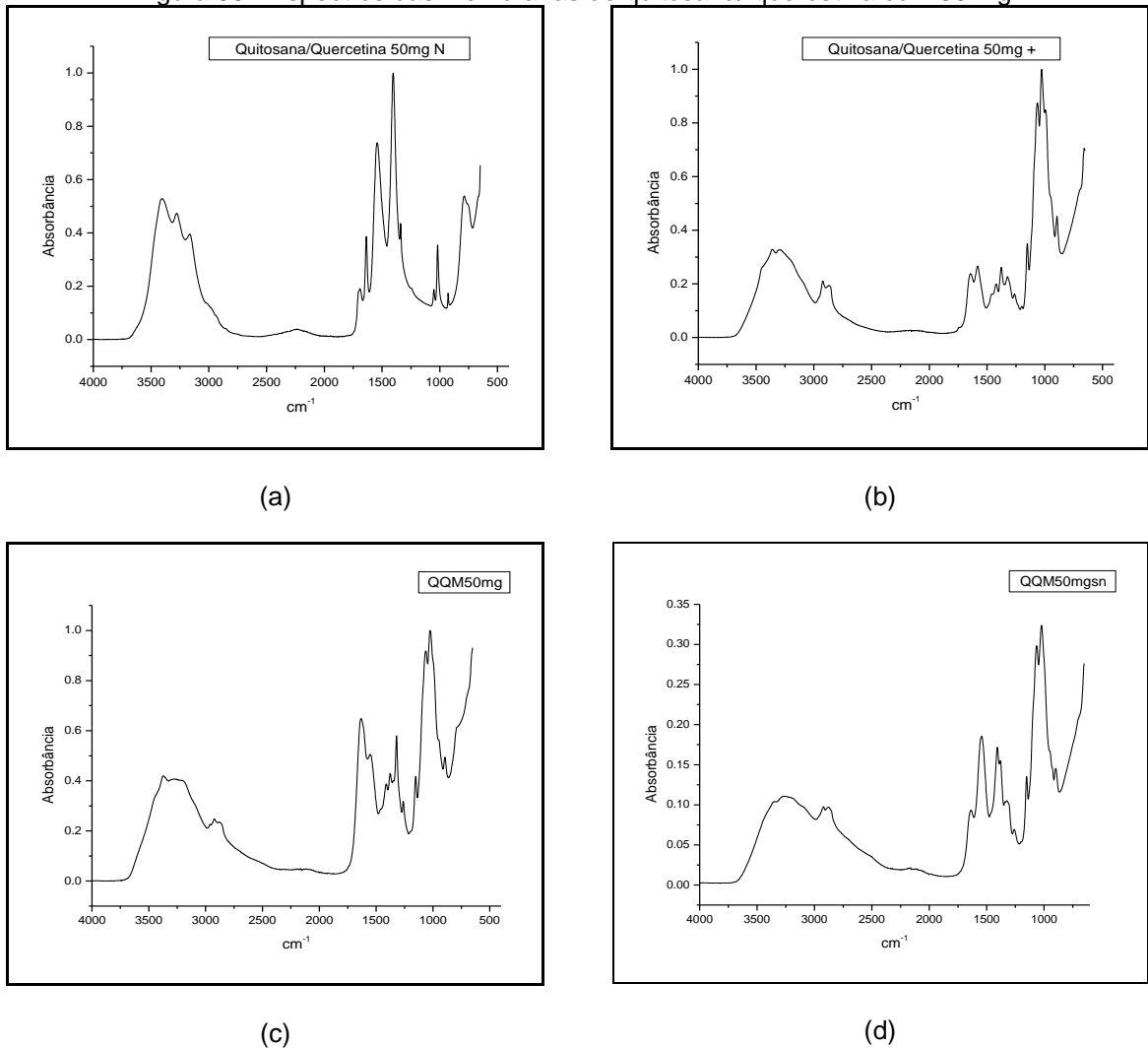
Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 54 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 30 mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Figura 55 - Espectros das membranas de quitosana/ quercetina com 50 mg.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

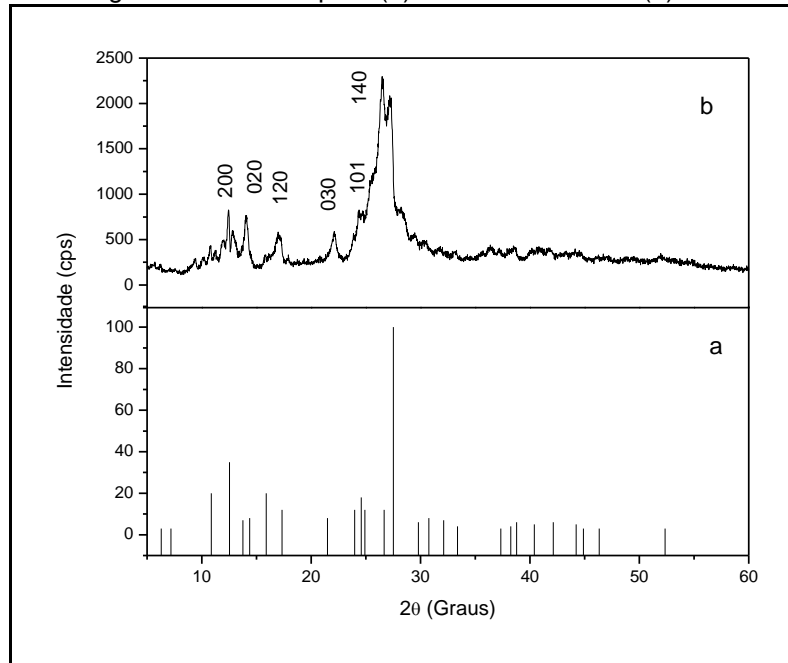
Por fim, constatou-se após analisar os espectros acima, que não houve alterações significativas quando se varia a concentração do fármaco, mas sim, ao se comparar as metodologias utilizadas para obtenção das membranas. Nos espectros do tipo a, observou-se espectro semelhante ao do acetato de sódio; nos do tipo b, constatou-se semelhança com o espectro da quitosana, atribuído, possivelmente, ao processo de neutralização e secagem ter degradado o fármaco; já os espectros das membranas do tipo c e d, apresentaram perfil da quitosana e da quercetina, com bandas mais visíveis, nos espectros tipo d, provavelmente, porque não ocorreu interação da quercetina com material alcalino, já que segundo Costa (2005), a quercetina se degrada em pH maior que 7,0.

### 5.2.7 Espectroscopia por Difração de Raios X

A difração de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, com aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente na engenharia e ciências de materiais, química e de minas, dentre outros e sua principal aplicação refere-se à identificação da cristalinidade dos materiais, sejam eles inorgânicos ou orgânicos.

A análise dos difratogramas da quercetina apresentado na Figura 69a evidencia presença de fase única, com pico maior em  $26,51^\circ$ , apresentando ainda pico de desdobramento em  $27,28^\circ$ , que está de acordo com as características do fármaco padrão da base de dados mantida pelo JCPDS (Joint Committee of Powder Diffraction) 43-1695, apresentado na Figura 68b.

Figura 56 - Difratograma de raios X para (a) JCPDS 43-1695 e (b) fármaco quercetina.

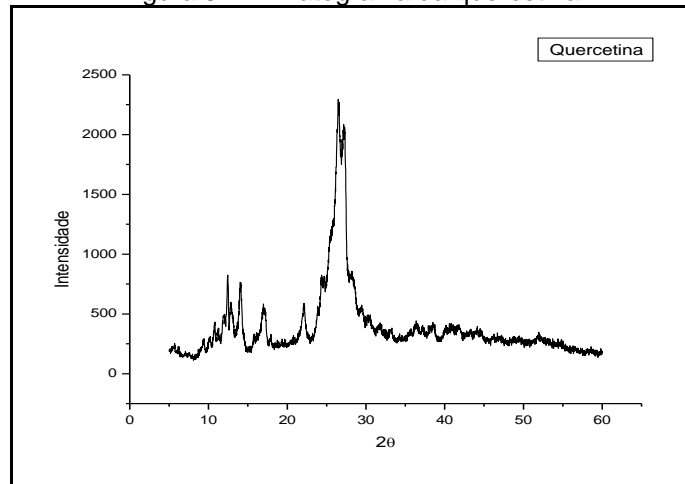


Fonte: Pesquisa direta (2013).

O difratograma da quercetina exposto na Figura 70 mostra a presença de picos agudos em  $14^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $26,5^\circ$ ,  $27,3^\circ$  em ângulo  $2\theta$ , fato que evidencia a natureza cristalina deste flavonóide, picos observados em cinco amostras de quercetina estudadas por Borghetti et al. (2006); Natarajan et al. (2010).



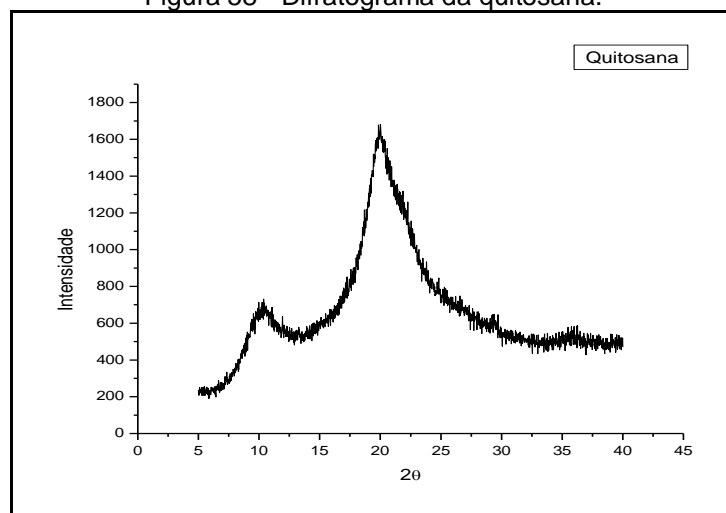
Figura 57 - Difratoograma da quercetina.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

O difratoograma da quitosana, na Figura 71, evidencia um perfil de material semicristalino com picos de bases largas iniciados entre 7° e 10° e entre 17 e 20°, sendo um de menor intensidade em 10° e um de alta intensidade em 19,8° respectivamente, o que caracteriza a presença de uma fase cristalina, e uma ampla faixa abaixo dos picos, aspecto que corrobora com Lima (2010). A quitosana tem um perfil semicristalino proveniente das fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana, sendo estas fortes interações que provem certa organização à estrutura da mesma (URAGAMI; TOKURA, 2006).

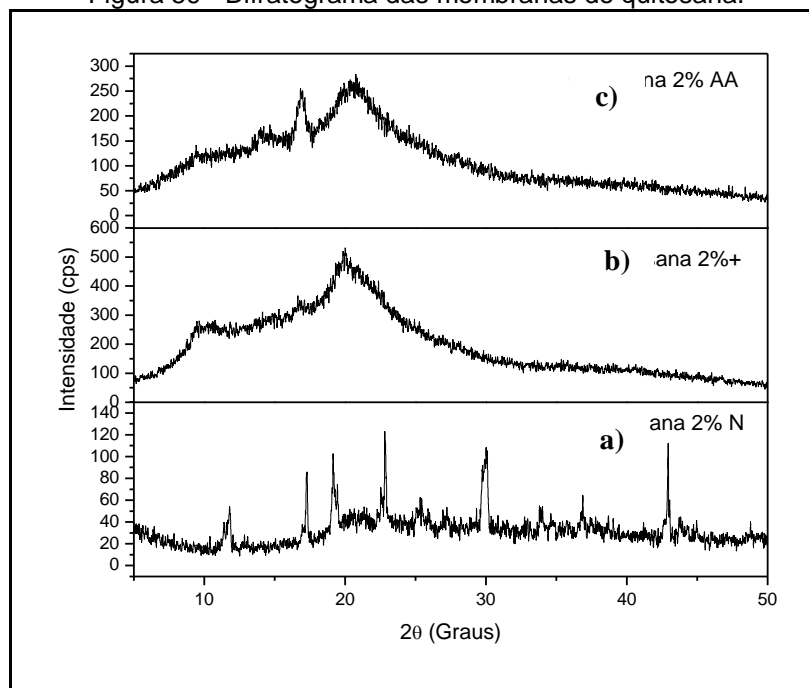
Figura 58 - Difratoograma da quitosana.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na Figura 72 estão representados os difratogramas das membranas de quitosana que foram neutralizadas por três diferentes processos, onde, a Figura 69a mostra a membrana obtida com NaOH na solução, a (b) mostra a membrana neutralizada em placa petri e a (c) que foi neutralizada pelo processo de atmosfera de amônia.

Figura 59 - Difratograma das membranas de quitosana.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Foi evidenciada diferença significativa entre os difratogramas das membranas de quitosana, onde, na Figura 72a observa-se aumento na cristalinidade, provavelmente devida, ao sal formado pela reação entre Hidróxido de Sódio colocado na solução de quitosana com o ácido acético. Dados semelhantes foram encontrados por Lima (2010), onde na membrana contendo NaOH ocorreu aumento na cristalinidade com vários picos característicos que pode ser atribuído à cristalinidade do sal formado, o acetato de sódio.

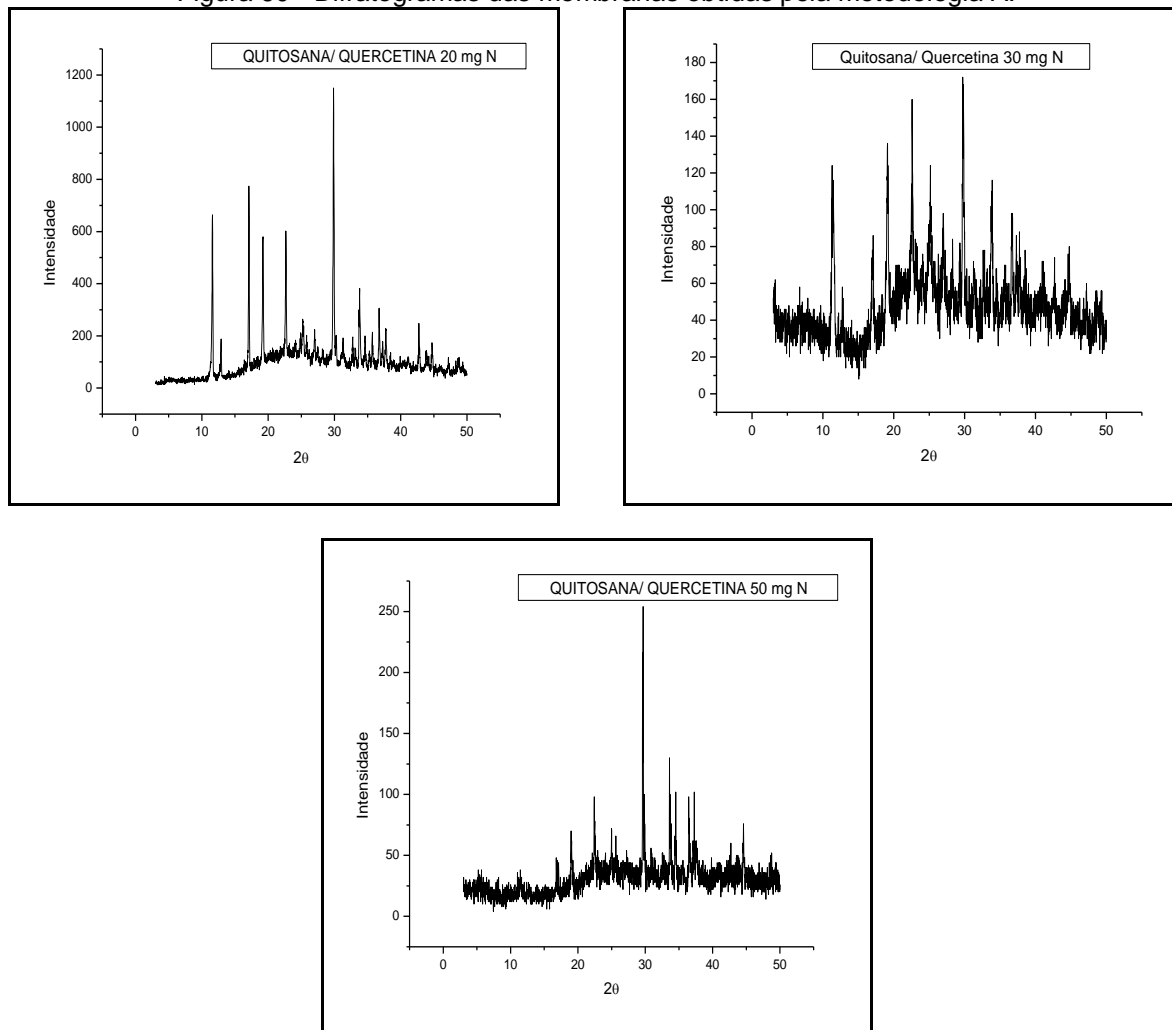
O difratograma da membrana de quitosana (b), que passou por processo de neutralização em placas, apresenta semelhança ao da quitosana pura. O difratograma da membrana de quitosana (c) evidenciou um desdobramento no pico da quitosana entre  $17^\circ$  e  $20^\circ$  e a não visualização do pico entre  $7^\circ$  e  $10^\circ$ , que

possivelmente pode estar relacionado à morfologia da superfície da membrana, já que a mesma não ficou plana.

Os difratogramas das membranas de quitosana com quercetina serão expostos segundo dois grupos de variáveis: a concentração de quercetina e as diferentes as metodologias utilizadas para a obtenção das membranas.

Observaram-se, na Figura 73, espectros que não são compatíveis nem com os da quitosana, nem com os da quercetina; isto pode estar relacionado à formação do acetato de sódio, fato este já observado e justificado na membrana de quitosana obtida pela mesma metodologia, em ensaios anteriores.

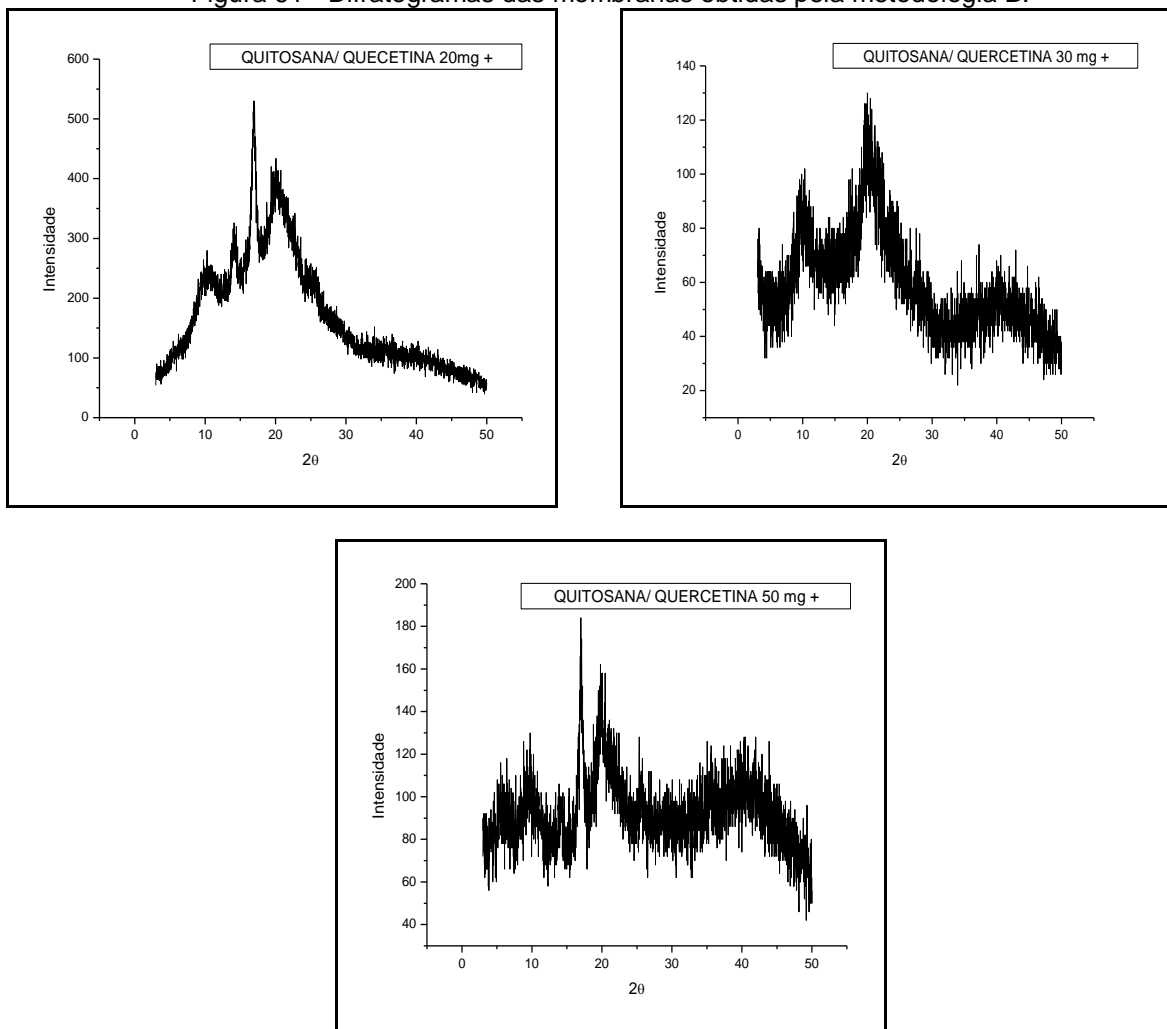
Figura 60 - Difratogramas das membranas obtidas pela metodologia A.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na Figura 74 estão representados os difratogramas das membranas de quitosana com diferentes concentrações de quercetina, neutralizadas com NaOH em placa petri, onde é possível inferir que as mesmas apresentam um perfil de material semicristalino. Pode-se observar, que a quercetina contribuiu para aumentar o perfil cristalino das blendas, com preservação dos picos vistos na quitosana (entre  $7^\circ$  e  $10^\circ$  e entre  $17^\circ$  e  $20^\circ$ ). Constatou-se que o aumento da cristalinidade foi proporcional ao aumento da concentração da quercetina, o que é justificado pelo estreitamento das bandas. No entanto, pôde-se observar presença de ruídos que, possivelmente, ocorreu devido a irregularidade nas superfícies das membranas, após o término do processo de neutralização.

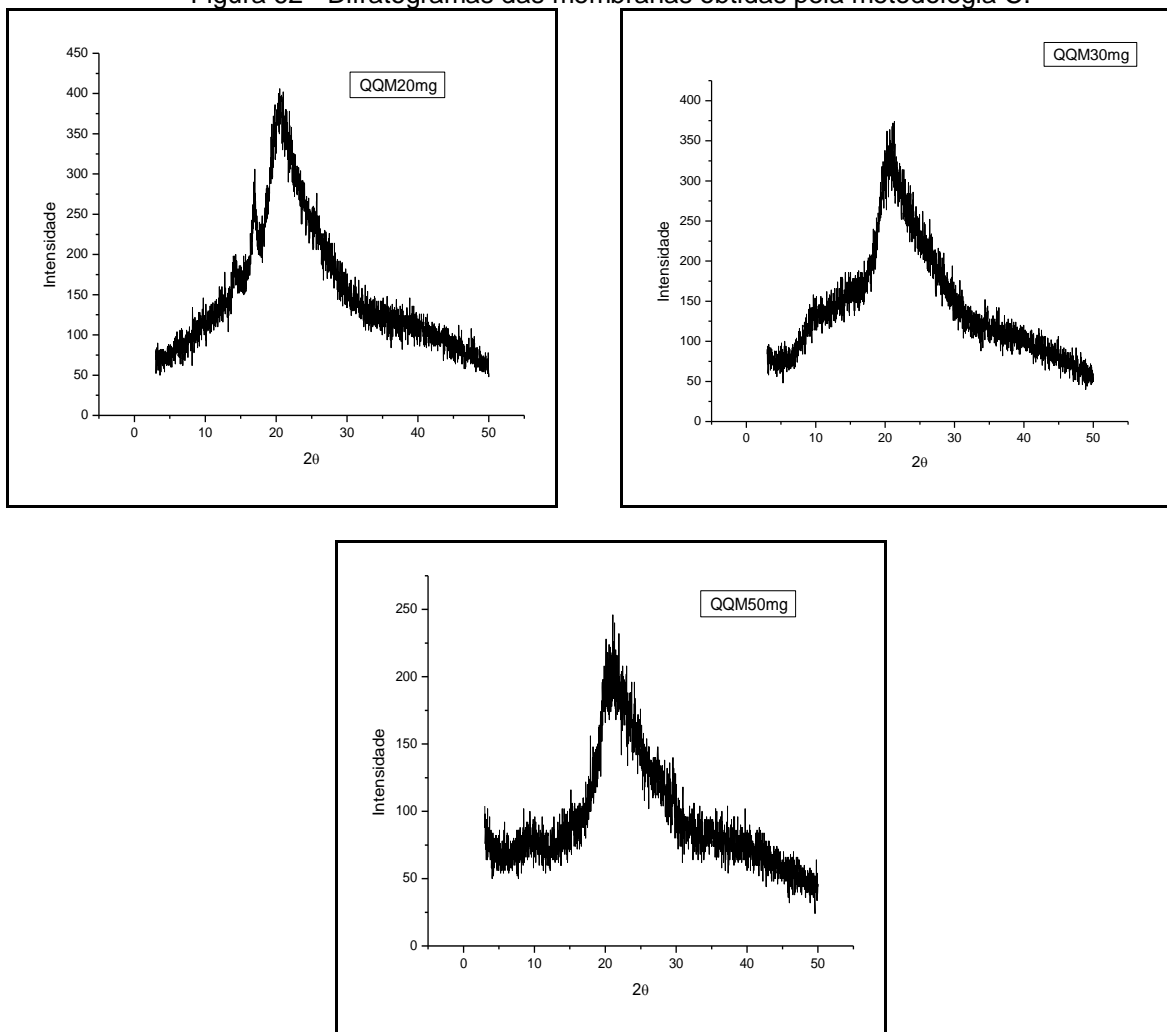
Figura 61 - Difratogramas das membranas obtidas pela metodologia B.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Nos difratogramas mostrados na Figura 75 observam-se características semelhantes entre si, sendo possível perceber que ocorreu um discreto aumento na cristalinidade do material e este fato foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do fármaco. Constatou-se também uma diminuição dos ruídos, provavelmente devido à preocupação em se obter amostras com superfícies mais planas, facilitando assim a realização do ensaio de DRX. É importante citar que os picos típicos da quitosana mantiveram suas características.

Figura 62 - Difratogramas das membranas obtidas pela metodologia C.

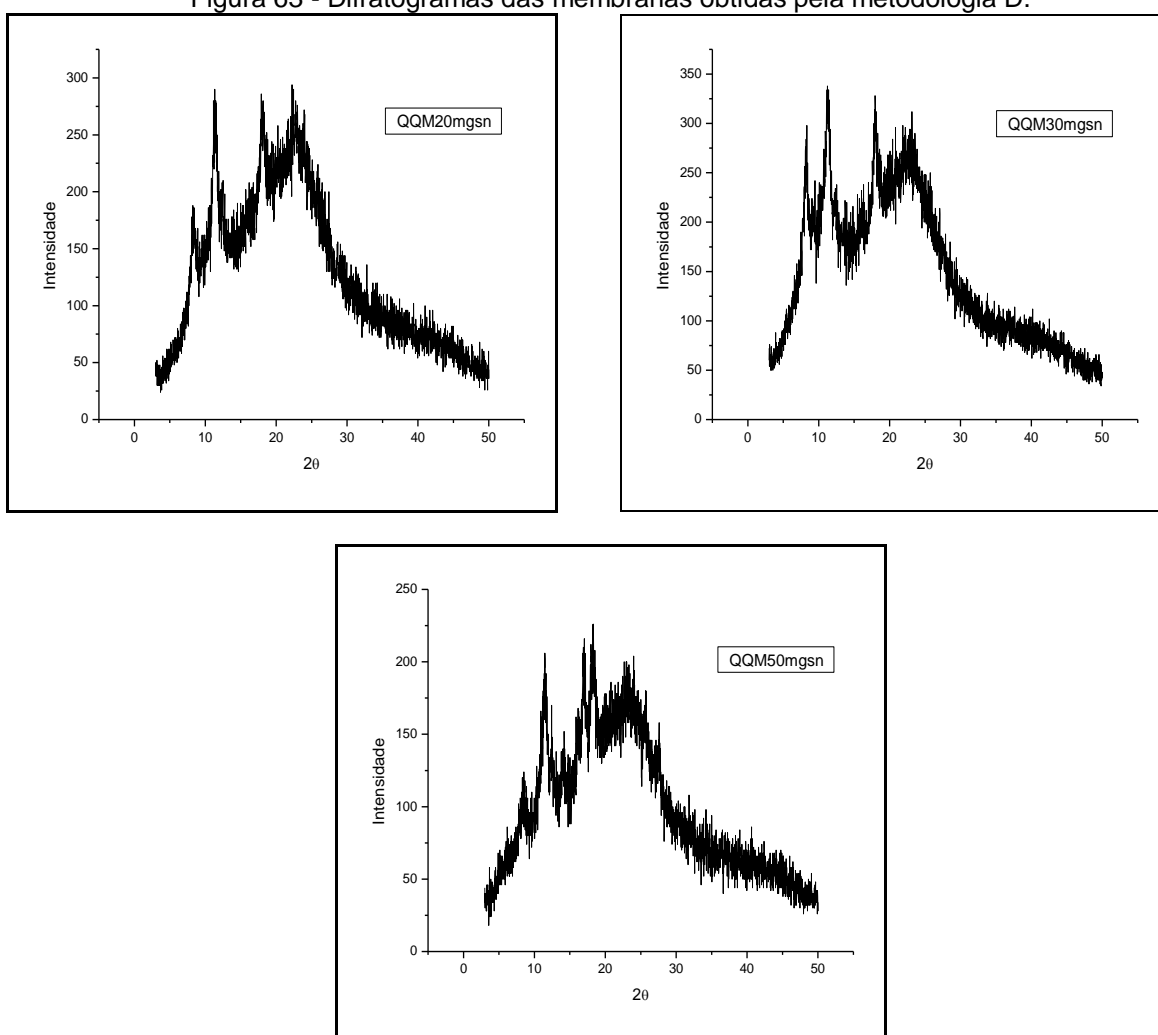


Fonte: Pesquisa direta (2013).

Na Figura 76 estão contidos os difratogramas das membranas obtidas pela interação da quitosana com a quercetina que não foram submetidas ao processo de neutralização, ou seja, através da metodologia D.

Pode-se observar que houve semelhança entre os espectros, mesmo com a variação do fármaco, com a presença de alguns picos semelhantes aos da quitosana e da quercetina, no entanto, não se pode afirmar com convicção que se trata dos picos destas substâncias, já que estes não apresentaram variação significativa diante da variação da quercetina. Vale ressaltar que estas membranas apresentaram a formação de inúmeras bolhas na superfície que podem ter conferido esse perfil de cristalinidade às mesmas.

Figura 63 - Difratomogramas das membranas obtidas pela metodologia D.



Fonte: Pesquisa direta (2013).

Considerou-se, após as análises dos difratogramas, que a obtenção das membranas de quitosana/ quercetina, através da adição de Hidróxido de Sódio em solução, resultou na formação de um sal, o acetato de sódio. A metodologia que

realizou a neutralização das membranas em placa petri obteve blendas enrugadas e irregulares, com morfologia não plana, fato que provavelmente dificultou o ensaio de DRX pela presença de ruídos.

A metodologia onde a neutralização das membranas se deu por atmosfera de amônia resultou em difratogramas sem ruído, já que houve a preocupação com o aplainamento das mesmas, sendo ainda observado aumento na cristalinidade do material e este fato foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do fármaco, cabendo inferir que há presença do fármaco na membrana. A última metodologia utilizada neste estudo, na qual não houve neutralização das membranas resultou em difratogramas que denota a presença de ruídos, fato atribuído à formação de bolhas nas mesmas, constatando-se, ainda que, possivelmente, existem picos típicos da quitosana e da quercetina nestas membranas.

Acredita-se que o processo de neutralização das membranas pode ter degradado o fármaco, já que, semelhante a outros flavonóides, a quercetina apresenta sua estabilidade comprometida em valores de PH acima de 7,0, condição na qual as reações de oxidação e hidrólise tornam-se favorecidas, sendo por isso, excluídas as metodologias que utilizem deste processo para a obtenção das membranas.

### **5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS**

Por fim, têm-se as seguintes conclusões parciais:

- Das metodologias do tipo A, B, C e D obtidas da interação quitosana/quercetina, as três primeiras produziram membranas, que, após terem contato com solução básica (Hidróxido de Sódio e Hidróxido de Amônia), apresentaram mudanças macroscópicas, como a mudança na coloração, fragilidade e resistência à tensão, aspecto que demonstrava sua ineficiência para a aplicação desejada; convém mencionar que as primeiras membranas produzidas, apresentaram na superfície, a formação de um sal, fato confirmado nas análises do MEV, FTIR e DRX, sendo a metodologia D a que obteve melhores resultados quando comparados às demais.

- A técnica do MEV evidenciou que, em todas as concentrações de quercetina (20, 30 e 50mg), e com a utilização dos solventes - ácido acético glacial e metanol – houve a formação de aglomerados nas membranas, conferindo certa heterogeneidade às mesmas, talvez pela concentração elevada da quercetina.
- A técnica de FTIR identificou e confirmou a formação de acetato de sódio nas membranas do tipo A, sendo por isso, uma metodologia descartada para a FASE II; na metodologia B, onde houve o processo de neutralização da solução de quitosana em NaOH e posterior lavagem das membranas em água destilada, consistiu em um processo que, possivelmente, degradou o fármaco, sendo também, uma metodologia descartada. Os espectros obtidos através da metodologia C e D assemelharam-se aos da quitosana, mas também se constata a presença de picos que coincidiram com os da quercetina, sendo mais visível, na metodologia D, isto é, onde não houve neutralização da membrana por nenhum método.
- A técnica de DRX reforçou da presença do acetato de sódio nas membranas no tipo A e a presença de ruídos de superfície nas membranas do tipo B. As membranas do tipo C, neutralizadas em Hidróxido de Amônia, resultaram em difratogramas que se tornaram mais cristalinos quanto maior a concentração do fármaco e as membranas do tipo D, evidenciaram, possivelmente, os picos característicos da quercetina e da quitosana, talvez por não terem sido expostos ao pH alcalino que as outras foram, contudo, observou-se presença de ruídos por ter havido a formação de bolhas na superfície da membrana.
- Convém ressaltar que todas as membranas obtidas a partir das metodologias anteriores não apresentaram características macroscópicas nem microscópicas para fins de aplicabilidade do produto terapêutico em feridas diabéticas, por alguns aspectos como: apresentaram-se irregulares, com resistência mecânica frágil, com coloração distinta do fármaco, com aspecto “plastificante” que poderia inviabilizar o seu uso, especialmente em superfícies inflamadas e com dificuldades de cicatrização, etc.

Baseando-se no exposto, após as conclusões parciais apresentadas e as análises preliminares advindas da fase exploratória, desenvolveu-se/ refinou-se uma



metodologia que foi seguida, com o controle de algumas variáveis: diminuição da concentração de quercetina buscando evitar a formação de aglomerados; o volume final da membrana foi reduzido, a fim de ser mais fina e apresentar maior possibilidade de aderência; mudança no solvente utilizado, de metanol para o ácido acético glacial, uma vez que tanto a quitosana quanto a quercetina são solúveis nesse ácido; utilização do Tripolifosfato (TPP) como agente reticulante, pois em primeiro momento, em observação aparente e testes de tração manual, este conferiu maior resistência mecânica à tração manual das membranas e conferiu estabilidade na coloração do fármaco, o que implica, inicialmente, afirmar que não ocorreu degradação da quercetina no término do processo. Os métodos, resultados e conclusões serão expostos, a seguir, na Fase Experimental.

## 6 FASE EXPERIMENTAL

Após a realização da Fase Exploratória, isto é, ao concluir os ensaios preliminares e as respectivas conclusões, houve então o desenvolvimento de outro método para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina. Ao avaliar/ analisar/ observar/ otimizar os métodos anteriores foi estabelecido como proposta promissora, os métodos X e Y, que foram detalhados na seção que se segue.

### 6.1 MÉTODOS

#### 6.1.1 Método utilizado no desenvolvimento das membranas Tipo X e Y

Inicialmente, foi preparada uma solução de quitosana a 2%, obtendo pH final por volta de 4,0; em seguida, utilizou-se três medidas de quercetina para a produção dos filmes: 2 mg, 5 mg e 10 mg, isto é, elas foram reduzidas objetivando uma melhor diluição do soluto e a não formação de aglomerados. Foram produzidas 5 membranas de cada concentração de fármaco e 5 de quitosana pura.

A quercetina em pó foi então diluída em ácido acético, diferentemente das metodologias anteriores, sendo a relação volume de quercetina/ ácido acético utilizada de 0,01g de quercetina/ ml, como se evidencia na Tabela 9.

Tabela 13 - Relação quercetina/ácido acético utilizada para obtenção das membranas X e Y.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>Concentração soluto</b>	<b>Concentração solvente</b>
<b>2 mg de fármaco</b>	10 mg fármaco= 0,01g	1 ml de ácido
<b>5 mg de fármaco</b>	25 mg de fármaco=0,025g	2,5 ml de ácido
<b>10 mg de fármaco</b>	50 mg de fármaco-0,05g	5 ml de ácido

Fonte: Pesquisa Direta (2014).

Após a etapa acima descrita, a solução de quercetina diluída foi adicionada a quitosana e homogeneizada com ajuda de um bastão de vidro por 10 minutos, visando facilitar a dispersão da mesma. Ao término do processo, o pH da solução quitosana/ quercetina foi medido, nas três concentrações do fármaco, com faixa entre 3,5 e 4,0, isto é, não houve variação.

A solução de quitosana/quercetina foi vertida em placas petri e a preparação das membranas foi finalizada, conforme ilustra a Figura 39a. Posteriormente, estas foram submetidas ao processo de secagem por um período de 7 dias, contudo, como os resultados de pesquisas anteriores reforçaram à sensibilidade da quercetina à luz, testou-se então, colocá-las sob refrigeração, mas antes envolvidas em papel alumínio, para não alterar as características e as propriedades do fármaco, (Figura 39b). Apenas as placas com solução de quitosana pura não foram revestidas no papel.

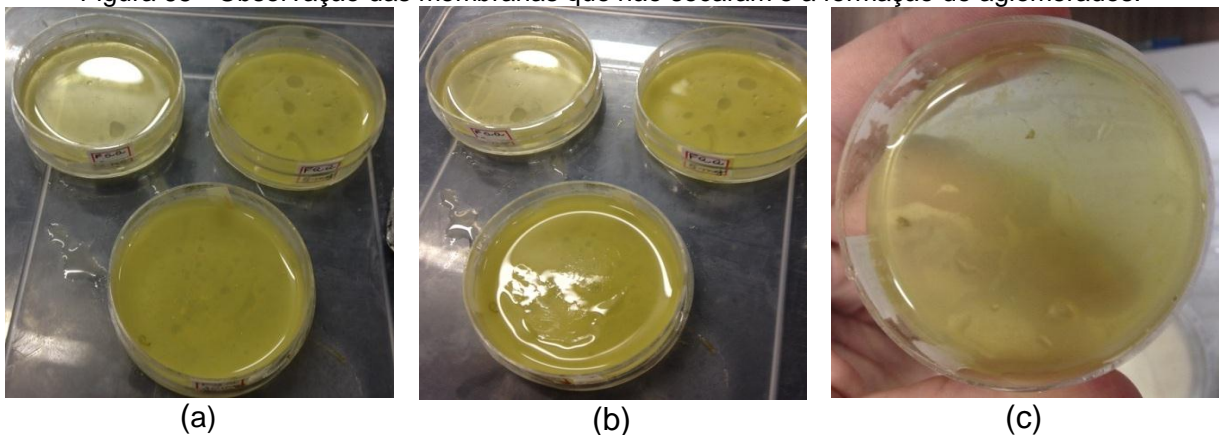
Figura 64 - Finalização das membranas e preparação para secagem.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Concluído o período destinado à secagem das membranas, isto é, após os 7 dias, observou-se, ao abrir o papel alumínio e as placas petri, que o processo de secagem não havia tido êxito, não houve formação de filme, provavelmente pela não evaporação do solvente; esse aspecto foi evidenciado na Figura 40(a, b e c).

Figura 65 - Observação das membranas que não secaram e a formação de aglomerados.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Após esta constatação foram retirados os embrulhos e as tampas das placas petri e as membranas permaneceram secando por um período de 48 horas; ao final deste, as membranas secaram. Em seguida, as membranas já finalizadas foram “embrulhadas” novamente até serem submetidas ao processo de reticulação com Tripolifosfato de Sódio (TPP), para se protegerem dos efeitos da luminosidade. (Ver Figura 41).

Figura 66 - Membranas tipo X (a) finalizadas e protegidas da luz (b).



a)

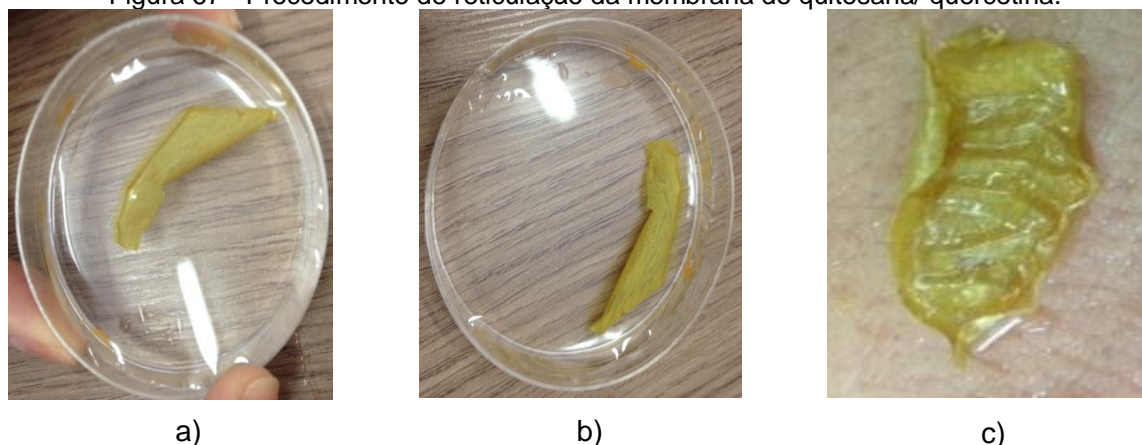
Fonte: Pesquisa direta (2014).

b)

Para o processo de reticulação foi preparada uma solução de Tripolifosfato de Sódio (TPP), tendo sido medido o pH deste composto que esteve na faixa entre 9,0 e 10,0. A observação do pH consistiu em um dos fatores preocupantes, uma vez que os estudos apontam a instabilidade química da quercetina em pH acima de 7,0.

Realizou-se então, o teste imergindo um pequeno corte das membranas de quitosana/ quercetina no TPP (Figura 42a), a fim de observar seu comportamento macroscópico, constatando-se que não houve danificação do material, nem “perda” de fármaco na solução; o recorte foi lavado em água destilada, observando-se retração do mesmo, como já observado em estudos anteriores. Houve preservação das características iniciais da membrana, além de uma observação aparente de maior resistência mecânica a tração e possibilidade de adequação do produto à área à pele (Figura 42c).

Figura 67 - Procedimento de reticulação da membrana de quitosana/ quercetina.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Após o teste acima descrito, algumas membranas foram então reticuladas em TPP, que passaram a ser chamadas de X e outras não foram reticuladas, chamadas de Y, situação apresentada no Quadro 3. Tem-se então, a seguinte codificação:

Quadro 3 - Codificação das Membranas de quitosana/ quercetina.

VARIÁVEL	TPP	SEM TPP
QUITOSANA - QUI	X	Y
QUITOSANA/ QUERCETINA 2 mg – QQ2	X	Y
QUITOSANA/ QUERCETINA 5 mg – QQ5	X	Y
QUITOSANA/ QUERCETINA 10 mg – QQ10	X	Y

Fonte: Pesquisa direta (2014).

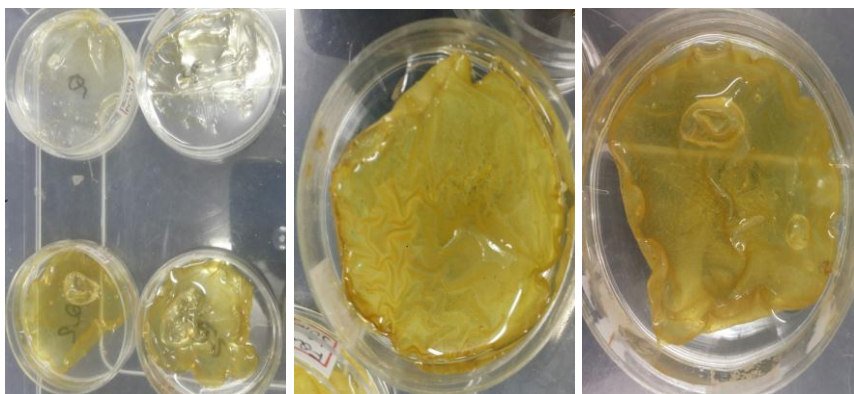
Na Figura 43 estão expostos os procedimentos envolvidos no processo de reticulação em TPP. Observa-se que, inicialmente as membranas retraem, as bordas tendem a enrolar-se (a); com relação à coloração, as membranas parecem escurecer em contato inicial com o solvente (b), mas logo em seguida a cor amarela do fármaco torna-se mais forte e evidente (c).



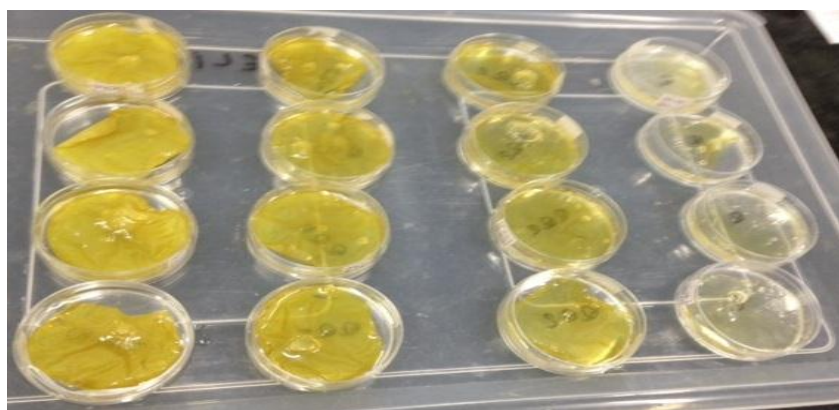
Figura 68 - Imersão das membranas em TPP e etapas subsequentes.



(a)



(b)



(c)

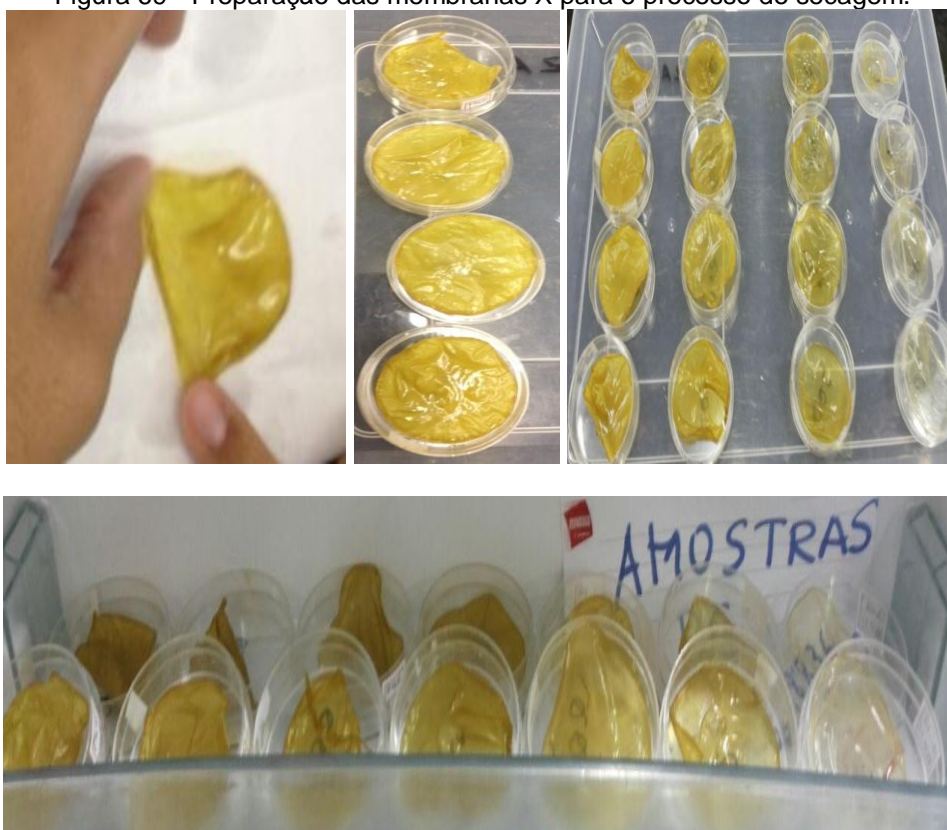
Fonte: Pesquisa Direta (2014).

Após a imersão por 30 minutos em TPP, as membranas tipo X foram lavadas em água destilada, não sendo observada nenhuma modificação macroscópica após o processo. O pH da solução presente na placa petri também foi medido no início

da reticulação, no meio e no final, visando conferir se houve alteração na composição do solvente, a partir de um possível carreamento do fármaco, mas em todos as fases analisadas, o pH manteve-se inalterado, isto é, acredita-se que houve a preservação da composição da membrana, fato que será confirmado mais adiante.

A Figura 44 mostra as etapas que se sucederam após a reticulação; as membranas após lavadas em água destilada, foram estiradas em papel absorvente, com intuito de retirar o excesso de água e em seguida retornaram à placa petri, para iniciarem o processo de secagem sob refrigeração por 48 horas.

Figura 69 - Preparação das membranas X para o processo de secagem.

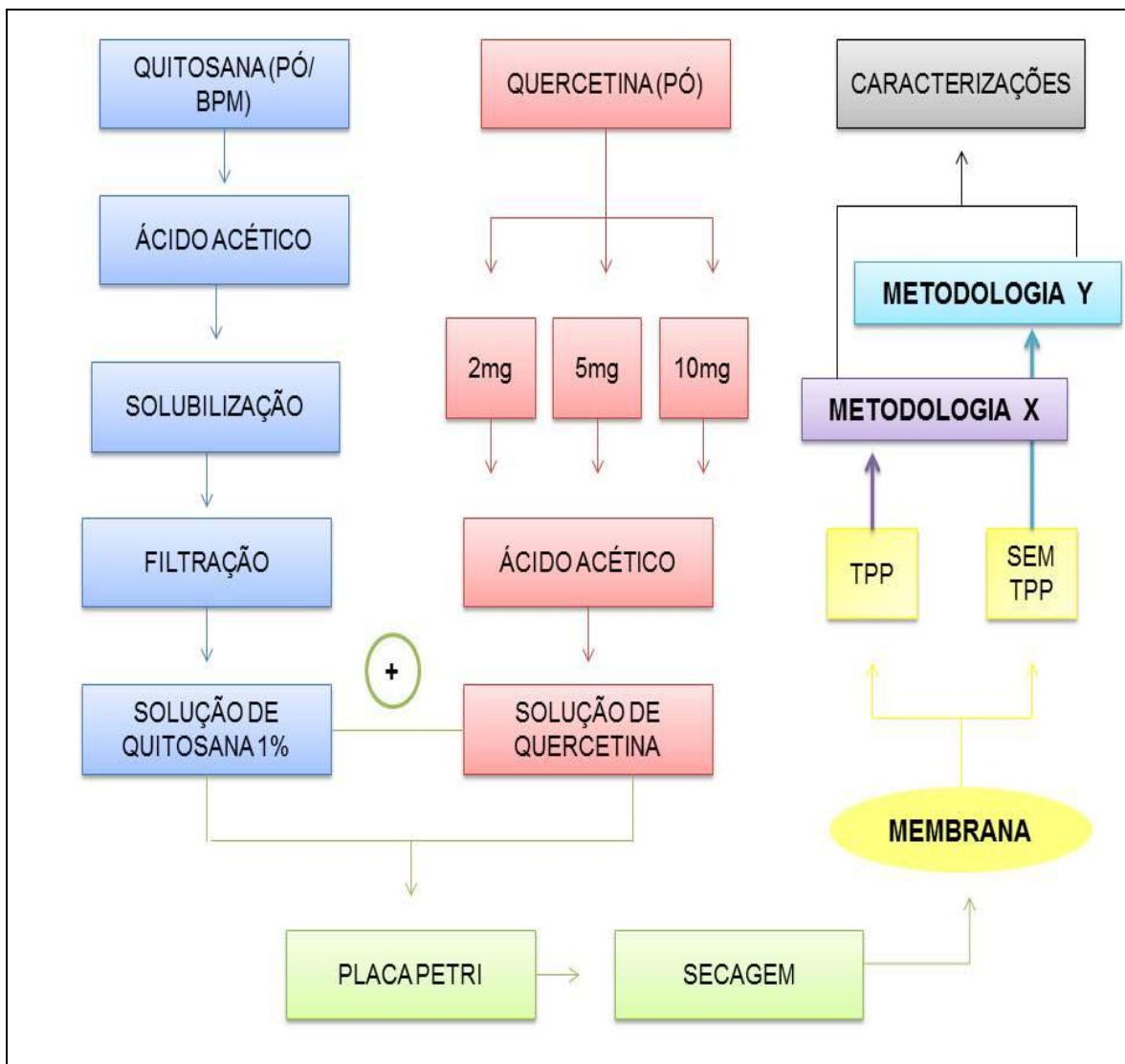


Fonte: Dados da Pesquisa (2014).

Concluído o processo de secagem das membranas X, estas foram recortadas e enviadas para as caracterizações: MEV/EDS; DRX; FTIR; TGA, DSC e citotoxicidade. As membranas tipo Y, que já estavam prontas, também foram enviadas para os mesmos ensaios. Para fins de síntese, as membranas do tipo Y não foram reticuladas, nem neutralizadas; a solução que as deu origem teve pH entre 3,5 e 4,0.

A Figura 45 ilustra o fluxograma usado no desenvolvimento das membranas, tipo X e Y, desde o processo inicial até as caracterizações, processo este discutido mais adiante.

Figura 70 - Fluxograma seguido para obtenção das membranas de quitosana/ quercetina tipos X e Y.



Fonte: Pesquisa direta (2014).



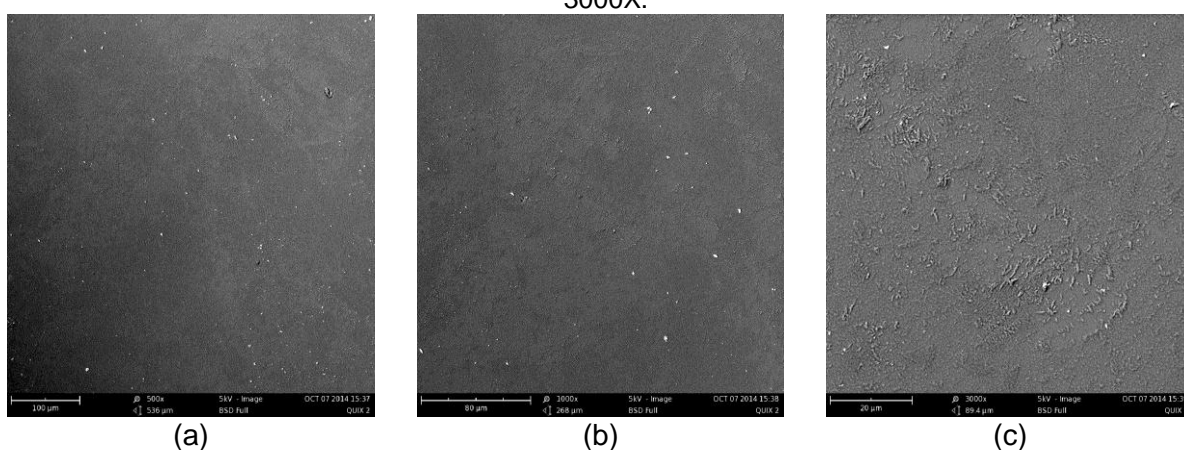
## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO: FASE EXPERIMENTAL

Neste item serão apresentados os resultados e discussão dos ensaios de caracterização das membranas obtidas através das metodologias X e Y, baseado nos ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Citotoxicidade.

### 6.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Figura 77 ilustra as micrografias das membranas de quitosana tipo X (QUIX), nos aumentos de 500 X (a), 1000 X (b) e de 3000 X (c). Observaram-se imagens de um material de superfície plana, homogênea e lisa, no entanto, no aumento de 3000 X (c) foi possível observar a presença de algumas irregularidades na superfície, que pode ser devido ao processo de reticulação em TPP.

Figura 71 - Microscopia Eletrônica de Varredura da Membrana QUIX – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X.



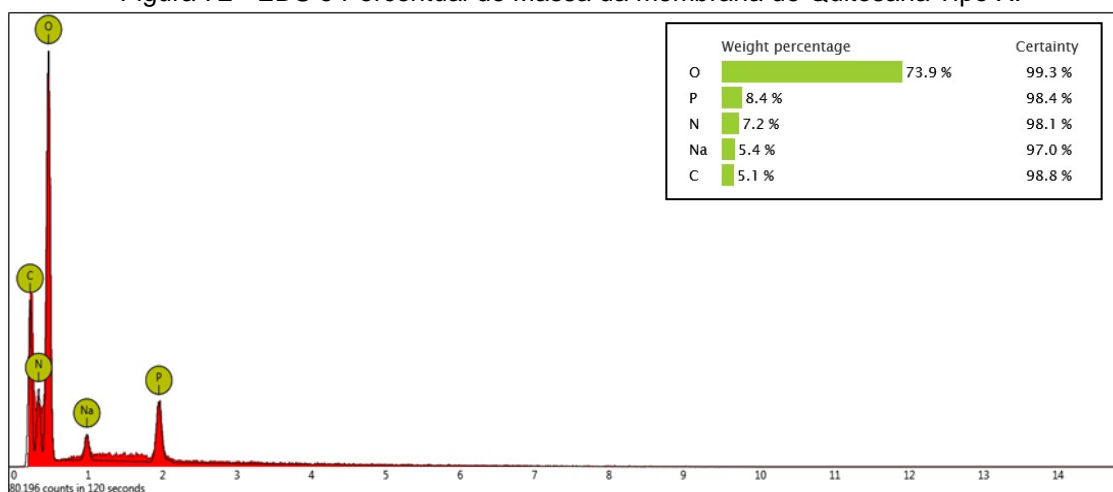
Fonte: Pesquisa Direta (2014).

Fernandes (2009) encontrou resultados semelhantes ao analisar micrografia de membranas reticuladas de quitosana, que exibiram superfícies lisas, com a

presença de precipitados, supostamente do reticulador tripolifosfato de sódio, tendo sido feita a análise pontual do precipitado que indicou a presença de fósforo (P) e sódio (Na), fato que confirmou que as partículas encontradas eram do reticulador.

A partir do ensaio de EDS representado na Figura 78 foram encontrados os elementos Oxigênio (O), Fósforo (P), Nitrogênio (N), Sódio (Na) e Carbono (C) nas membranas de quitosana do tipo X, devido à reticulação em TPP ter promovido a inserção dos elementos Fósforo e Sódio, evidenciando que embora as membranas tenham sido lavadas em água destilada, não foi um processo efetivo.

Figura 72 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana Tipo X.

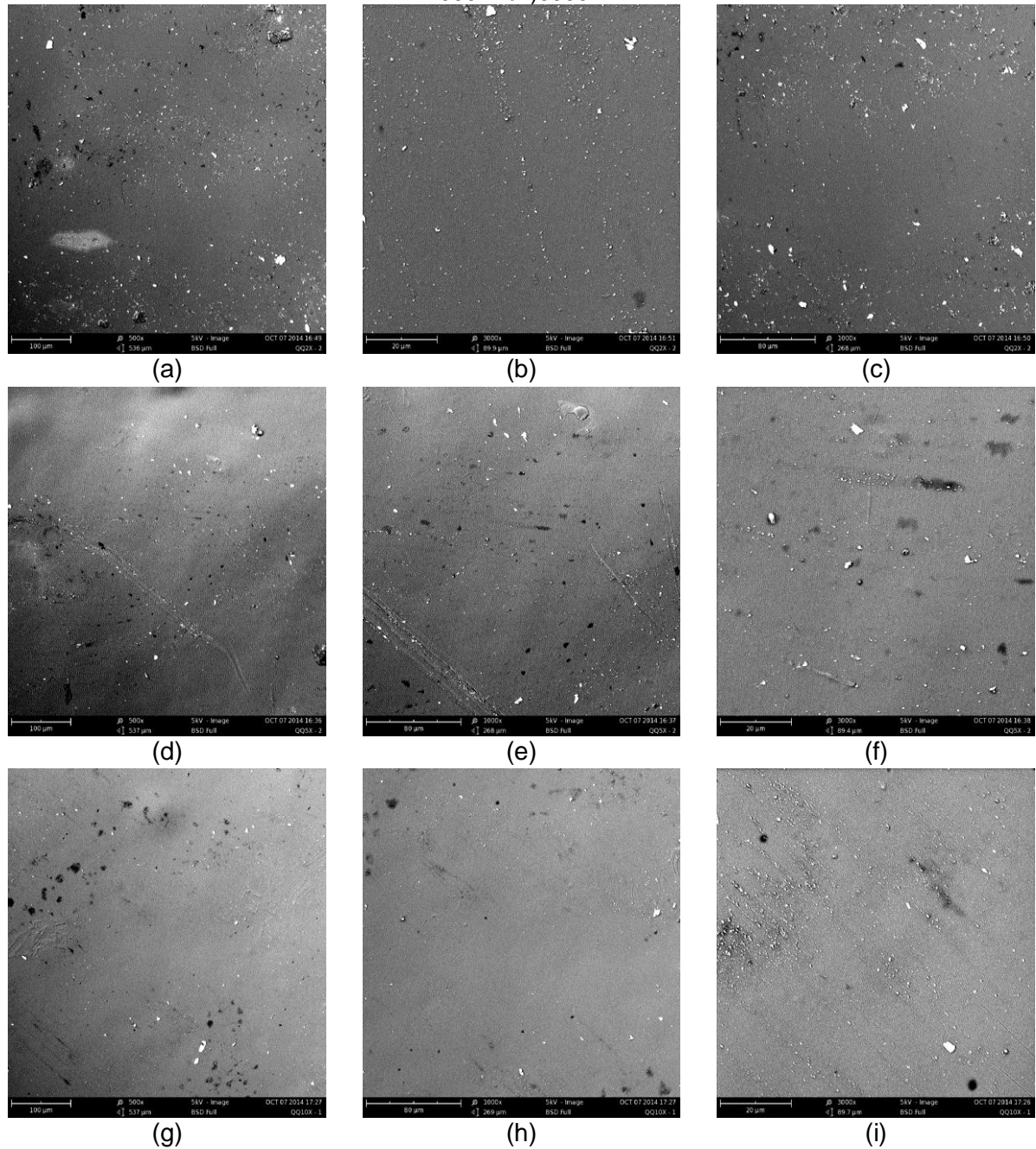


Fonte: Pesquisa Direta (2014).

A Figura 79 ilustra as micrografias das membranas de quitosana/ quercetina com 2mg (a), 5 mg (b) e 10 mg (c) de fármaco, em três aumentos: 500X, 1000X e 3000X.

Foi possível verificar, após as análises das micrografias, que houve a incorporação da quercetina na membrana densa de quitosana, onde o fármaco ficou disperso em toda superfície, ou seja, morfologicamente houve homogeneidade da membrana; em quase todas as ampliações, observam-se “marcas” escuras, que parece ser ou área de concentração de material, ou partículas não solubilizadas, imperfeições do filme, poros de superfície ou bolhas, etc.

Figura 73 - Micrografias das membranas quitosana/ quercetina denominadas: QQ2 (mg) X – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X; QQ5 (mg) X – d) 500 X, e) 1000 X e f) 3000X; QQ10 (mg) X – g) 500 X, h) 1000 X e i)3000 X.

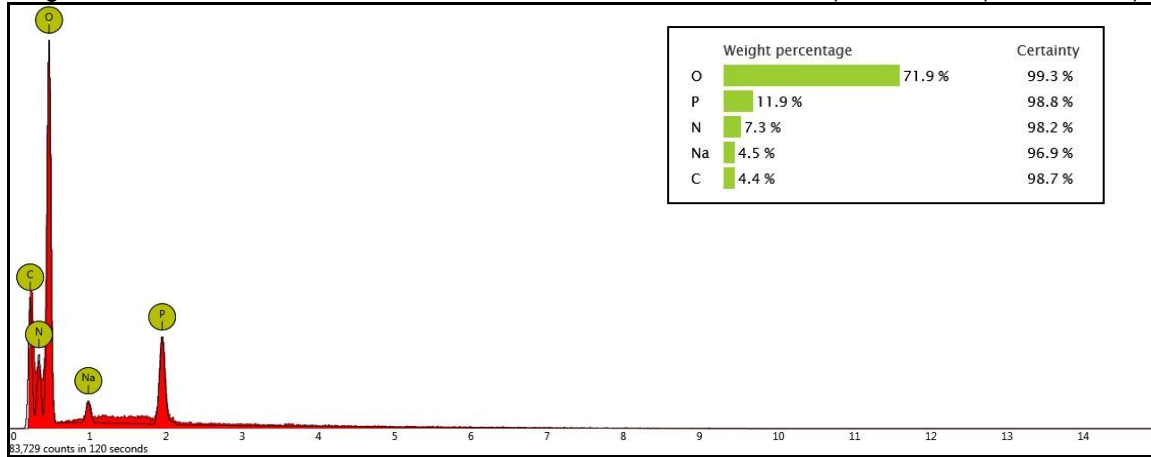


Fonte: Pesquisa Direta (2014).

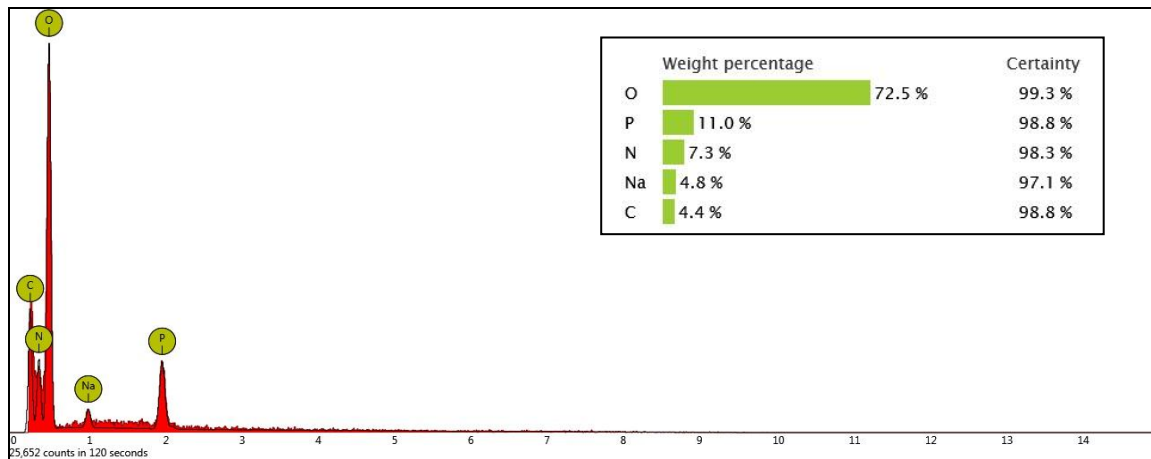
No estudo realizado por Goulart (2006), para a obtenção de micropartículas de quitosana com papaína reticuladas com tripolifosfato (TPP), foi evidenciado que as micropartículas de TPP possuem poros na superfície, apresentando uma aparência folicular, aspecto que pode favorecer a incorporação das partículas. Tal

observação pode igualmente ter ocorrido nas micrografias deste estudo. A Figura 80 ilustra o EDS das membranas de quitosana/ quercetina reticuladas.

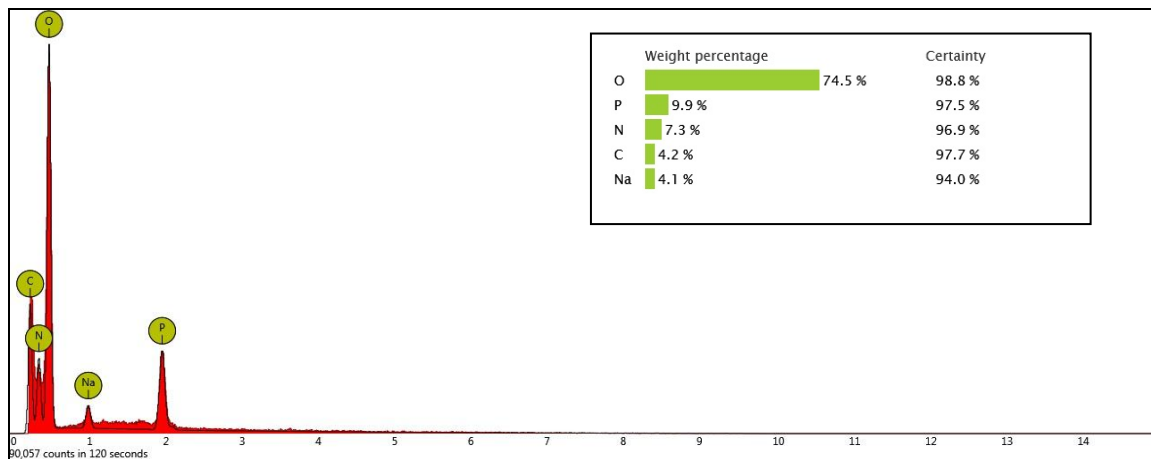
Figura 74 - EDS e Percentual de Massa das membranas: QQ2 X – a); QQ5 X – b); QQ10 X- c).



(a)



(b)



(c)

Fonte: Pesquisa Direta (2014).

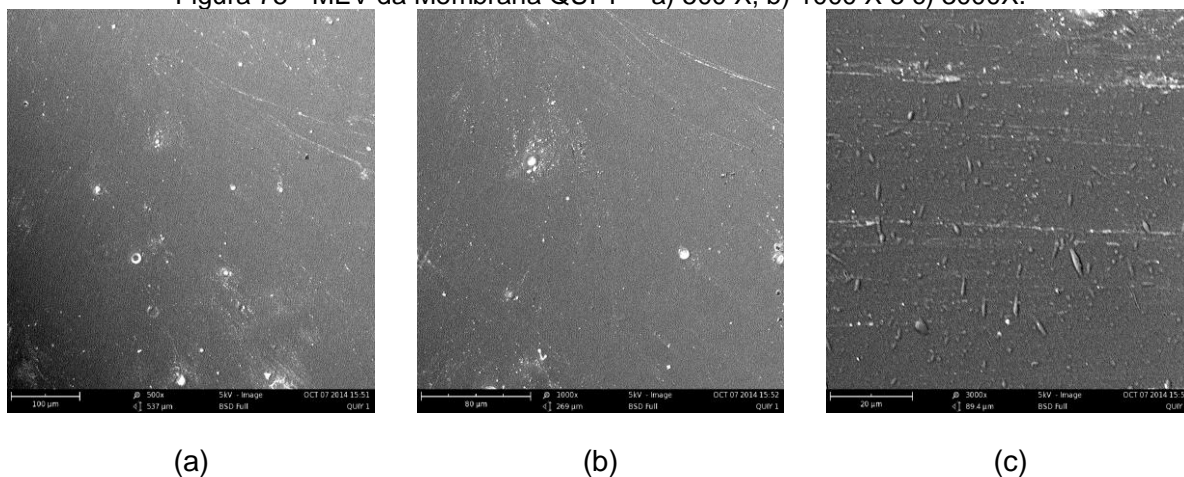
Analisando a Figura 80, foram encontrados além dos elementos Carbono e Oxigênio, que fazem parte da composição química da quitosana ( $C_6H_{11}O_4N$ ) e da quercetina ( $C_5H_{10}O_7$ ), o Nitrogênio, presente na quitosana; os elementos Fósforo e Sódio foram identificados, característicos do TPP ( $Na_5P_3O_3$ ), decorrente da reticulação, observado maior percentual de massa do fósforo em relação ao sódio, conforme as observações de Perez; Melchades e Boschi (2009).

Pode-se dizer que, mesmo com o aumento na concentração do fármaco (2, 5 e 10 mg), o percentual de massa dos elementos químicos C e O observado nos ensaios de EDS (Figura 79) foram bastante equivalentes.

A Figura 81 mostra as micrografias das membranas de quitosana obtidas pela metodologia Y, isto é, aquelas nas quais não foi adicionado nenhum agente de neutralização, nem de reticulação.

Pode-se observar, após análise das micrografias da Figura 81 (a, b e c), menor homogeneidade que as membranas do tipo X, evidenciando alguns agregados que podem ser provenientes de algumas partículas de quitosana que não se solubilizaram completamente, conferindo certa heterogeneidade à imagem.

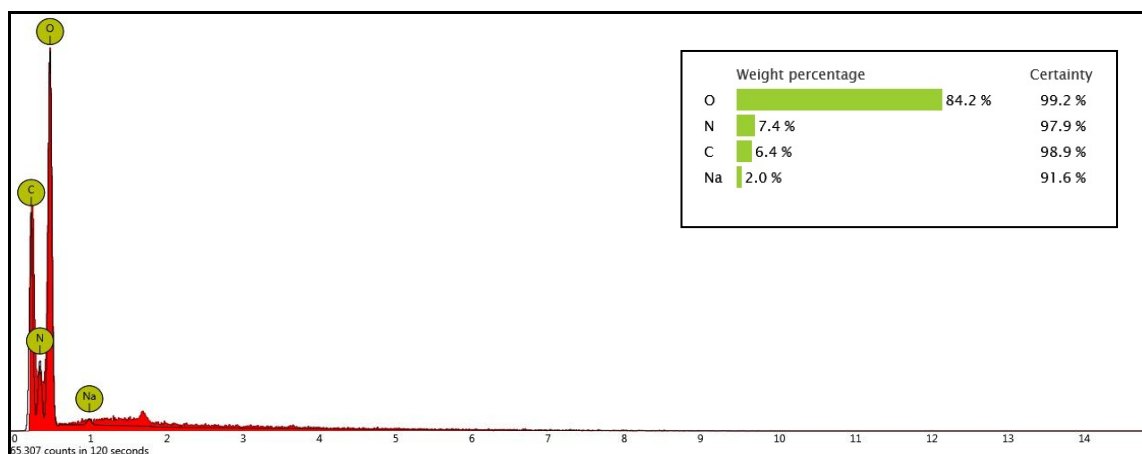
Figura 75 - MEV da Membrana QUI Y – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Ao analisar o espectro de EDS da Figura 82, constatou-se a presença dos elementos químicos usados para a obtenção da membrana de quitosana (O, N e C), no entanto, o elemento Sódio (Na) pode estar presente como resíduo de contaminação, mas em concentração desprezível.

Figura 76 - EDS e Percentual de Massa da membrana de Quitosana Tipo Y.

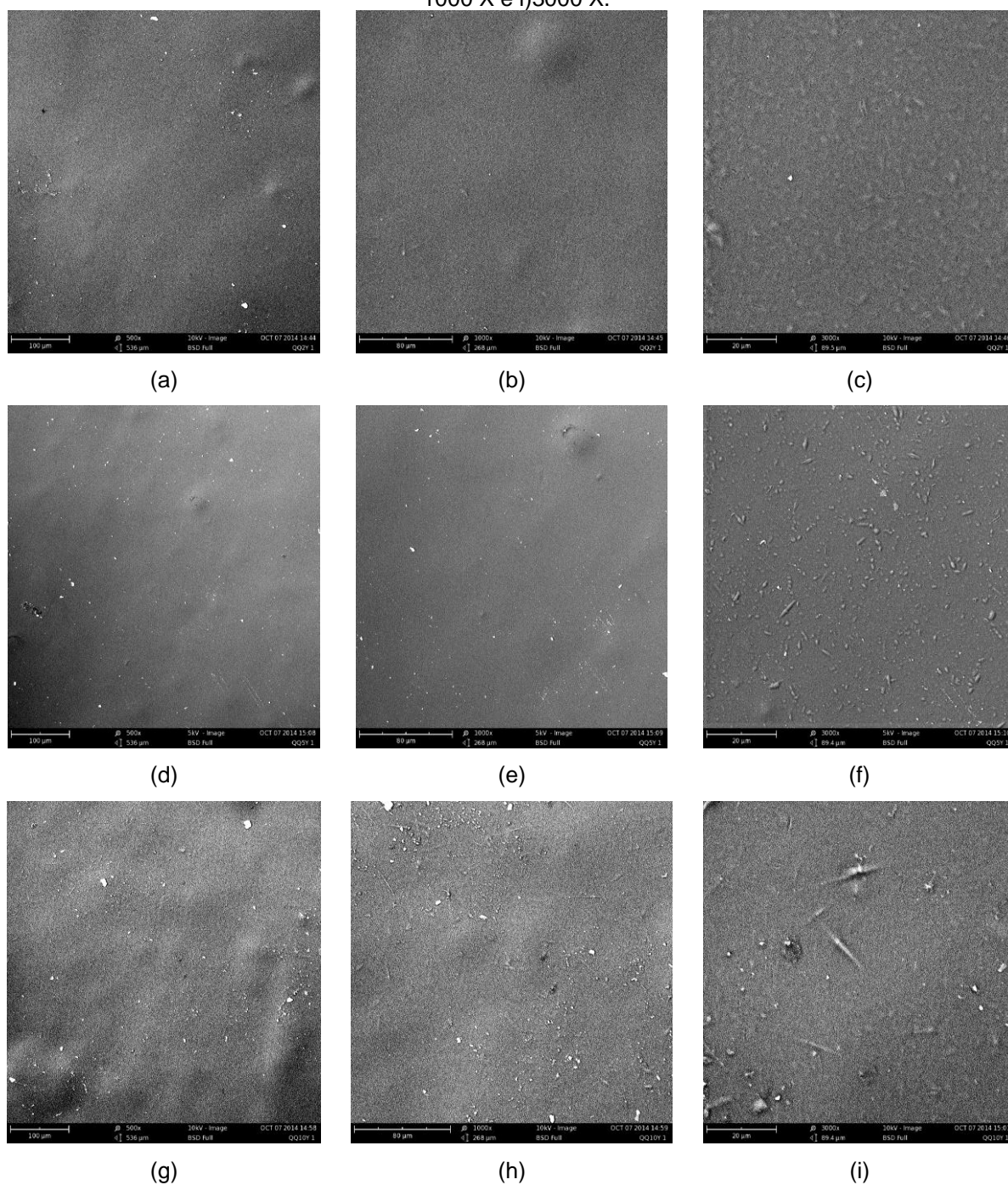


Fonte: Pesquisa direta (2014).

Na Figura 83, observam-se as micrografias das membranas de quitosana com incorporação de quercetina nas concentrações de 2 mg, 5 mg e 10mg. Constata-se que a adição do fármaco à membrana de quitosana aumentou a homogeneidade, isto é, as micrografias revelaram-se mais densas, havendo semelhança com a matriz polimérica pura da quitosana, especialmente, observado nas ampliações de 500 X e 1000 X; já na ampliação de 3000 X de todas as concentrações de fármaco (c; f e i), observam-se partículas, em dimensões variadas, em forma de estrias, compatíveis com a estrutura da quercetina representada na Figura 43, além da presença de poucos aglomerados.

A visualização das micrografias abaixo permite inferir que houve a incorporação da quercetina à matriz polimérica, aspecto este reforçado pelos ensaios de EDS (Figuras 83 e 84) observado o aumento do percentual de massa de Oxigênio (O) e Carbono (C), proporcional ao aumento de concentração da quercetina (2, 5 e 10 mg).

Figura 77 - Micrografias das membranas quitosana/ quercetina denominadas: QQ2 (mg) Y – a) 500 X, b) 1000 X e c) 3000X; QQ5 (mg) Y – d) 500 X, e) 1000 X e f) 3000X; QQ10 (mg) Y – g) 500 X, h) 1000 X e i)3000 X.

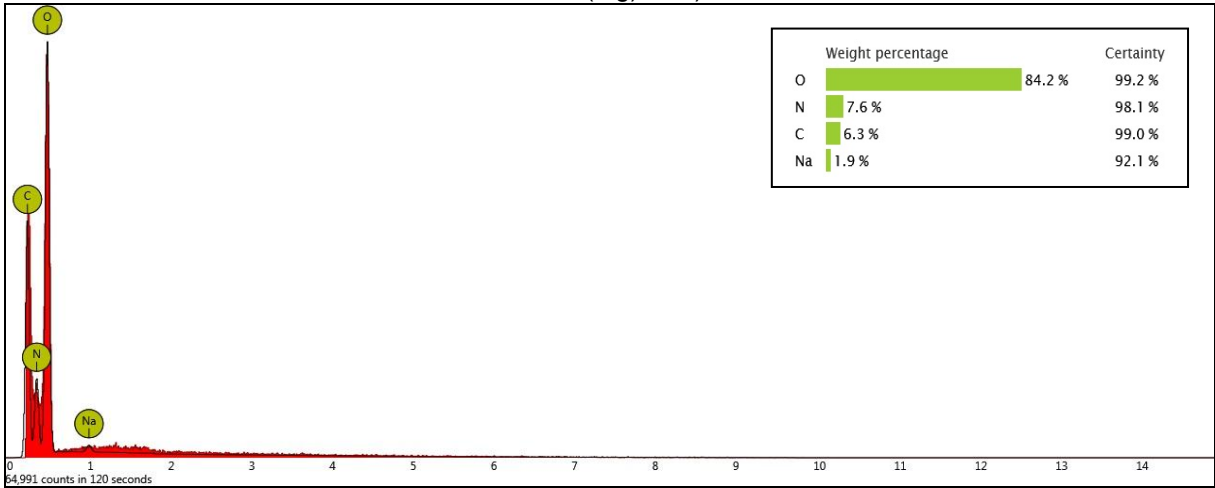


Fonte: Pesquisa direta (2014).

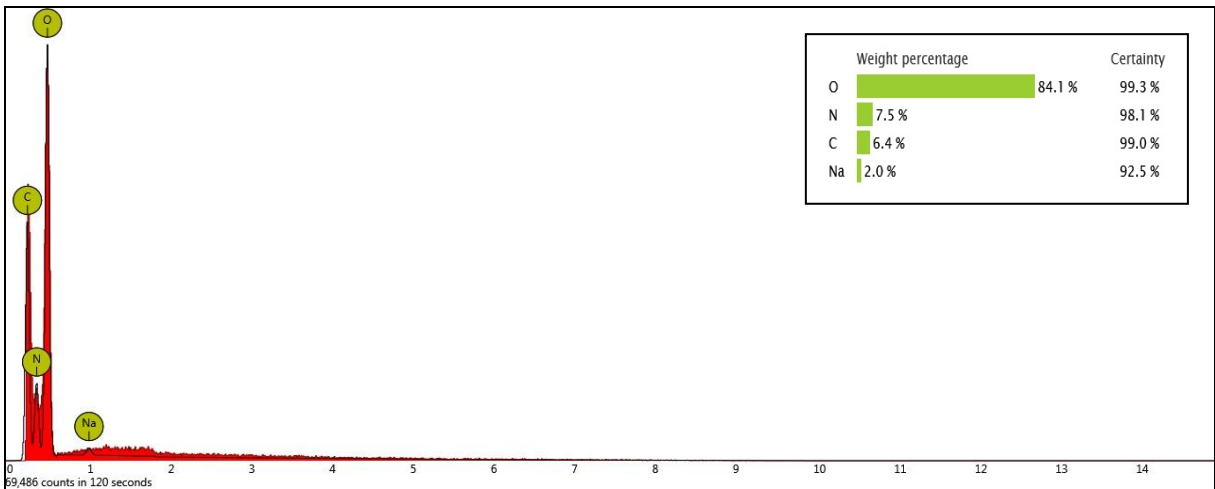
O ensaio de EDS que está representado na Figura 84 evidenciou a presença de Oxigênio (O), Nitrogênio (N), Carbono (C) e Sódio (Na), que podem ser desprezadas; o percentual de massa de Oxigênio e de Carbono encontrado nos ensaios destas membranas são maiores que o da metodologia X.



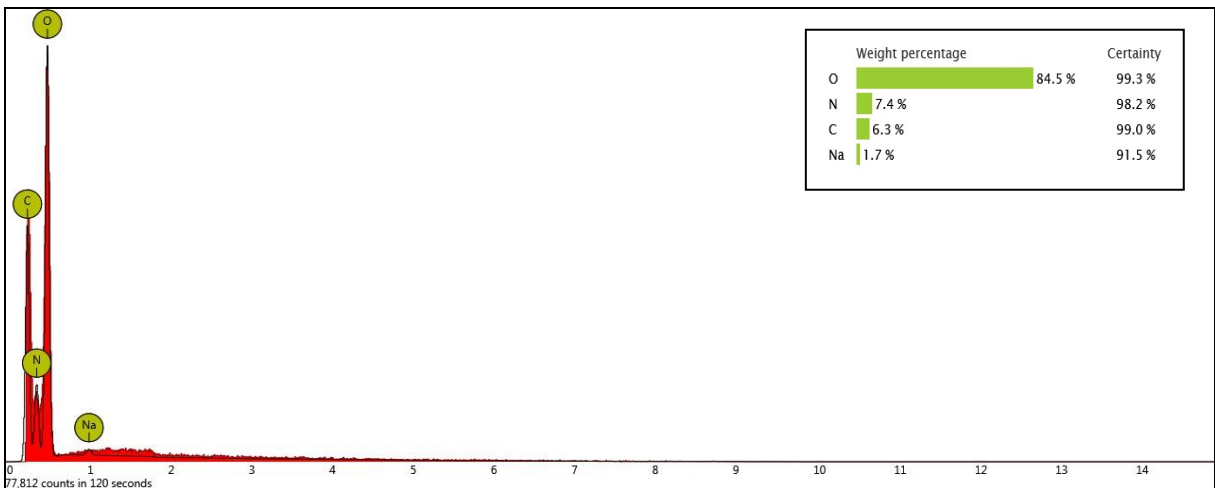
Figura 78 - EDS e Percentual de Massa das membranas híbridas: QQ2 (mg) Y – a); QQ5 (mg) Y – b); QQ10 (mg) Y- c).



(a)



(b)



(c)

Fonte: Pesquisa direta (2014).

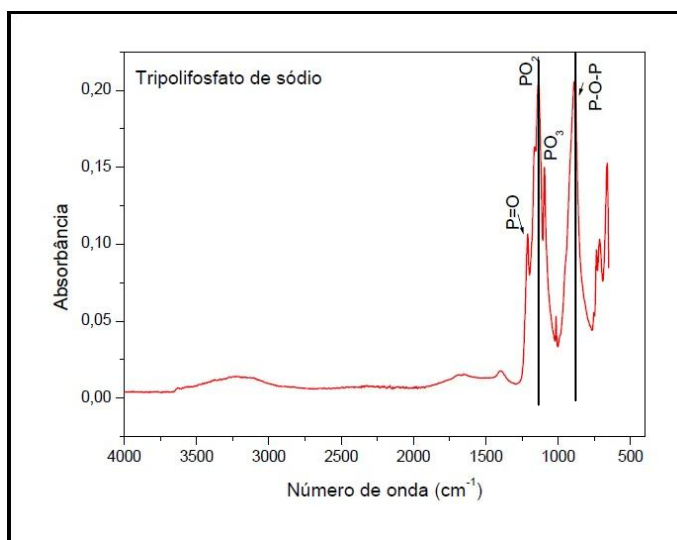


Por fim, constatou-se que, as micrografias das membranas de quitosana/ quercetina que foram reticuladas em TPP apresentaram perfil menos homogêneo, em relação às micrografias das membranas quitosana/ quercetina não reticuladas que resultaram em imagens mais densas, sendo compatível com os ensaios de EDS que mostraram maior concentração dos elementos químicos Carbono (C) e Oxigênio (O) nas membranas que não foram reticuladas. Acredita-se que, a manutenção da quercetina em meio ácido, sem reticulação, pode ter favorecido à dispersão do fármaco e a reticulação pode ter conferido heterogeneidade às micrografias.

### 6.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Ftir)

Observa-se na Figura 85, o espectro de FTIR do Tripolifosfato de Sódio (TPP). Foram percebidas as seguintes bandas: 1210  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{P}=\text{O}$ ), 1137  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo  $\text{PO}_2$ ), 1095  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo  $\text{PO}_3$ ), 888  $\text{cm}^{-1}$  (CHECCINATO ET AL., 2002).

Figura 79 - Espectros do TPP.

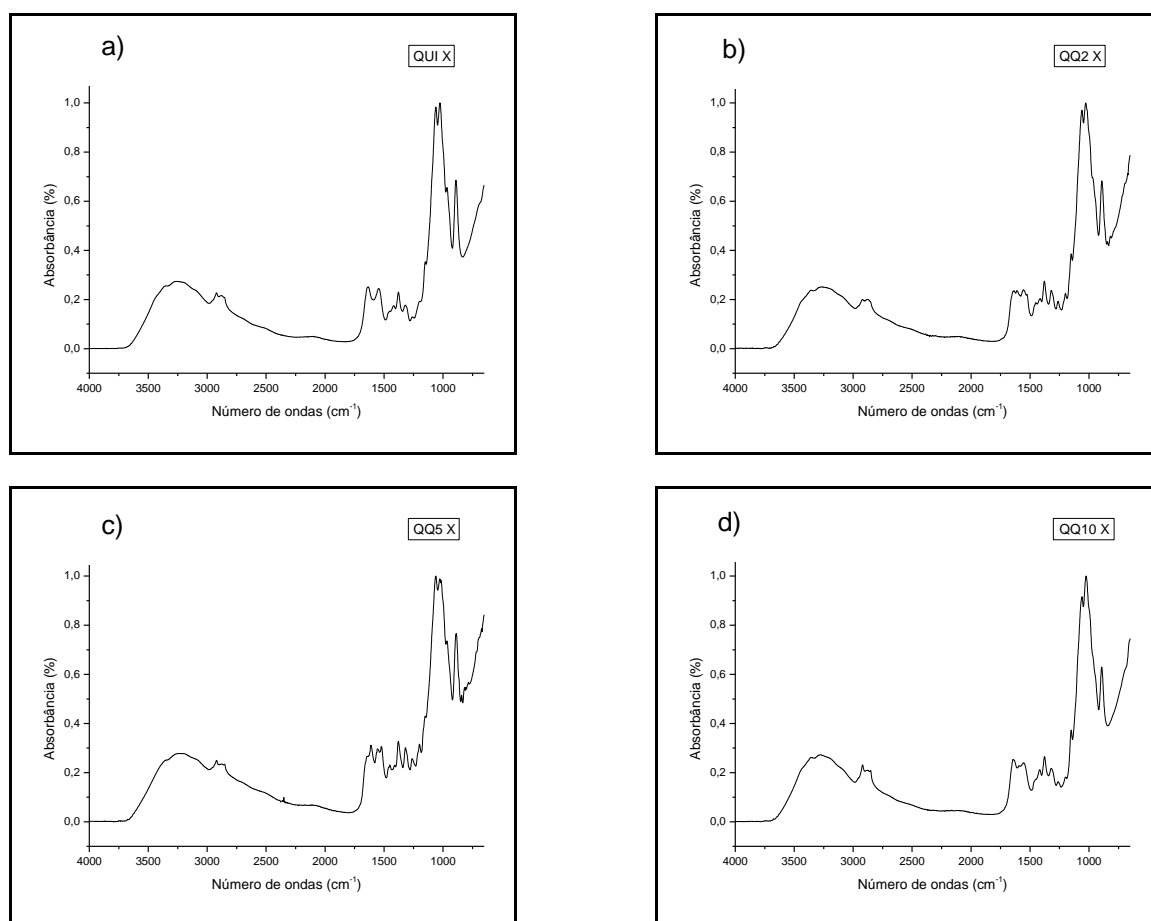


Fonte: Pesquisa direta (2014).

Nos espectros mostrados na Figura 86, pode-se afirmar que a adição da quercetina (2mg, 5 mg e 10 mg) nas membranas de quitosana pouco alteraram as

bandas funcionais características da quitosana, mesmo havendo a reticulação dos filmes em TPP. Isto não implica que não tenha ocorrido uma interação química entre os dois compósitos, pois a análise de infravermelho é um método de análise de superfície (AIMOLI, 2007).

Figura 80 - Espectros das membranas desenvolvidas pela Metodologia X: QUI X (a); QQ2 (mg) X; QQ5 (mg) X; QQ10 (mg) X.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Comparando-se os espectros da quitosana pura (a) e quitosana/ quercetina (b, c e d) percebeu-se, nos espectros da quitosana com quercetina, discretas modificações do espectro entre as bandas entre  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$ , compatível com as bandas características da quercetina, que, na frequência de  $1.650\text{ cm}^{-1}$  apresenta as ligações C=C, na frequência de  $1.450\text{ cm}^{-1}$ , as ligações C-C, as quais ocorrem em grande número e as ligações do tipo C-O-C, em  $1250\text{ cm}^{-1}$ , aspectos que podem sugerir uma possível interação entre a quitosana e a quercetina.

Algumas modificações observadas acima também podem estar relacionadas ao processo de reticulação em TPP, com discreto aumento na intensidade das bandas em 1639, 1547 e 1409  $\text{cm}^{-1}$ , possivelmente em virtude da interação entre a quitosana e o tripolifosfato. Wu et. al (2005) encontraram resultados semelhantes e concluíram que os grupos tripolifosfato do TPP foram ligados com os grupos amônio da quitosana, conferindo modificações discretas nessa faixa de intensidade.

Não foi observada alteração significativa no valor da intensidade de absorvância da banda na faixa 3331  $\text{cm}^{-1}$ , quando comparado aos espectros das membranas de quitosana sem fármaco, fato que pode estar relacionado à semelhança dos grupos funcionais nesta faixa de absorvância. Este fato difere as observações feitas por Holanda (2011) quando observou aumento na intensidade desta banda com a presença de insulina.

Por fim, constatou-se que na frequência de 1.000  $\text{cm}^{-1}$ , onde ocorrem as ligações C-O, absorções relativas à quitosana e à quercetina, fato que confirma uma possível interação entre os compostos, uma vez que, quanto maior a concentração de fármaco (Figura 86, c), discretamente mais intenso se torna o pico.

Na Figura 87 observam-se os espectros da quitosana (a) e da quitosana com quercetina (b, c e d) nas três concentrações, obtidos pela metodologia Y, sendo possível constatar certa semelhança entre todos até a frequência de 1650  $\text{cm}^{-1}$ , limite a partir do qual ocorrem modificações que, coincidem com as deformações por estiramento que ocorrem aos pares nos anéis aromáticos da quercetina, proporcional ao aumento na concentração do fármaco, cabendo inferir que há presença desse composto nessa faixa de frequência (1650 – 1300).

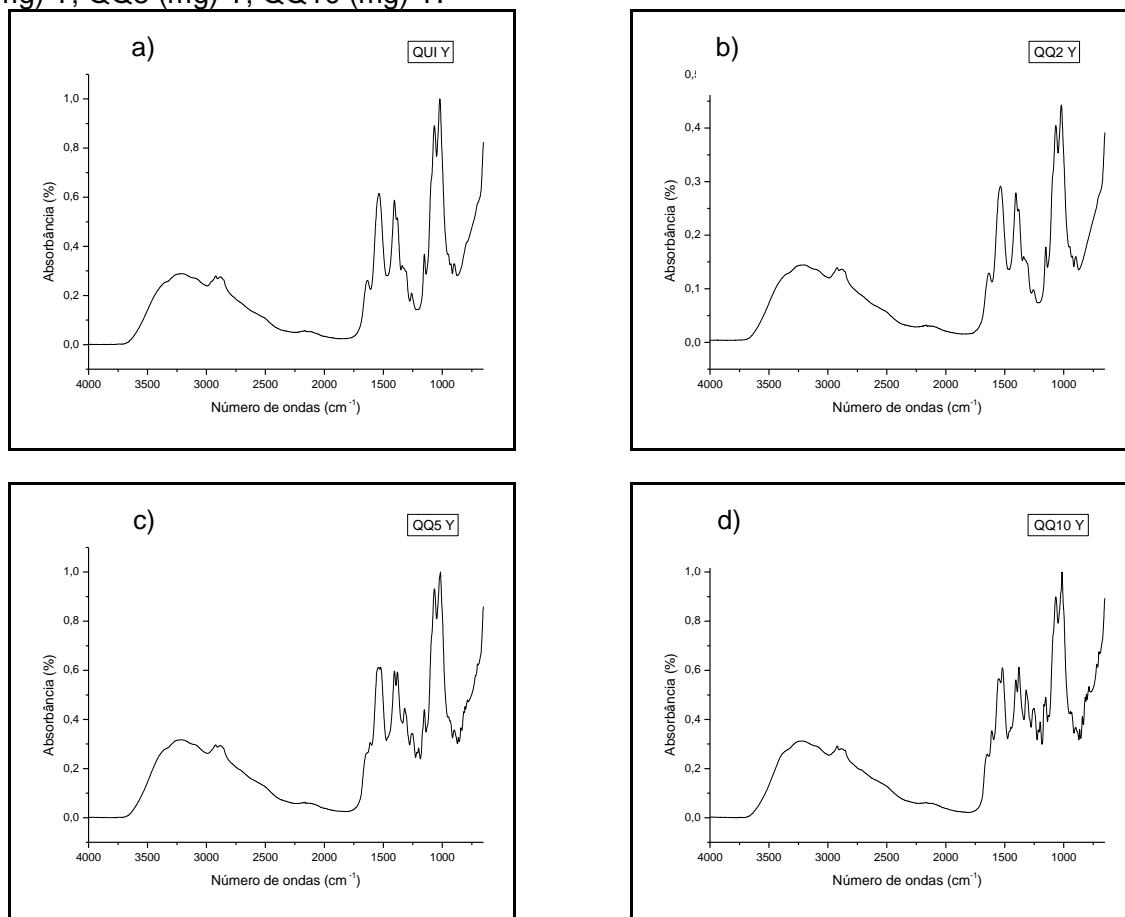
As bandas de absorção na região de 1300 e 1100 coincidem com o estiramento forte (C-O) presentes tanto na quercetina quanto na quitosana, e a deformação axial assimétrica (C-O-C), que se torna mais evidente quanto maior a concentração de fármaco, cabendo inferir que há uma possível interação entre ambos os compostos mais evidenciado nos espectros c e d. (MINCHEVA et. al, 2004).

Por fim, as bandas entre 900 – 690  $\text{cm}^{-1}$  tornam-se bem visíveis no espectro da Figura 87 (d), atribuindo-se as deformações que ocorrem fora dos anéis aromáticos entre C-H, presente na estrutura da quercetina.

A presença de algumas bandas típicas dão características indicativas da presença de sítios ácidos, especialmente, entre  $1620 - 1450 \text{ cm}^{-1}$  conforme Oliveira (2007); após a análise dos espectros da Figura 87, se confirma a presença dos sítios ácidos, através da detecção de um pico desdobrado entre  $1600$  e  $1400 \text{ cm}^{-1}$ .

Sabe-se que, a quitosana é um polieletrólito catiônico, que, quando dissolvido em meio apropriado, é geralmente purificado na forma neutra, obtida após dissolução do polímero em solução aquosa diluída de ácido acético, filtração e adição de álcali aquoso até provocar sua precipitação, resultando em materiais hidrossolúveis, no entanto, para a preparação dessas membranas tipo Y, não houve o processo de neutralização, resultando em uma membrana ácida, que culminou com a formação de acetato de quitosana (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 2001).

Figura 81 - Espectros das membranas desenvolvidas pela Metodologia Y: QUI Y (a); QQ2 (mg) Y; QQ5 (mg) Y; QQ10 (mg) Y.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

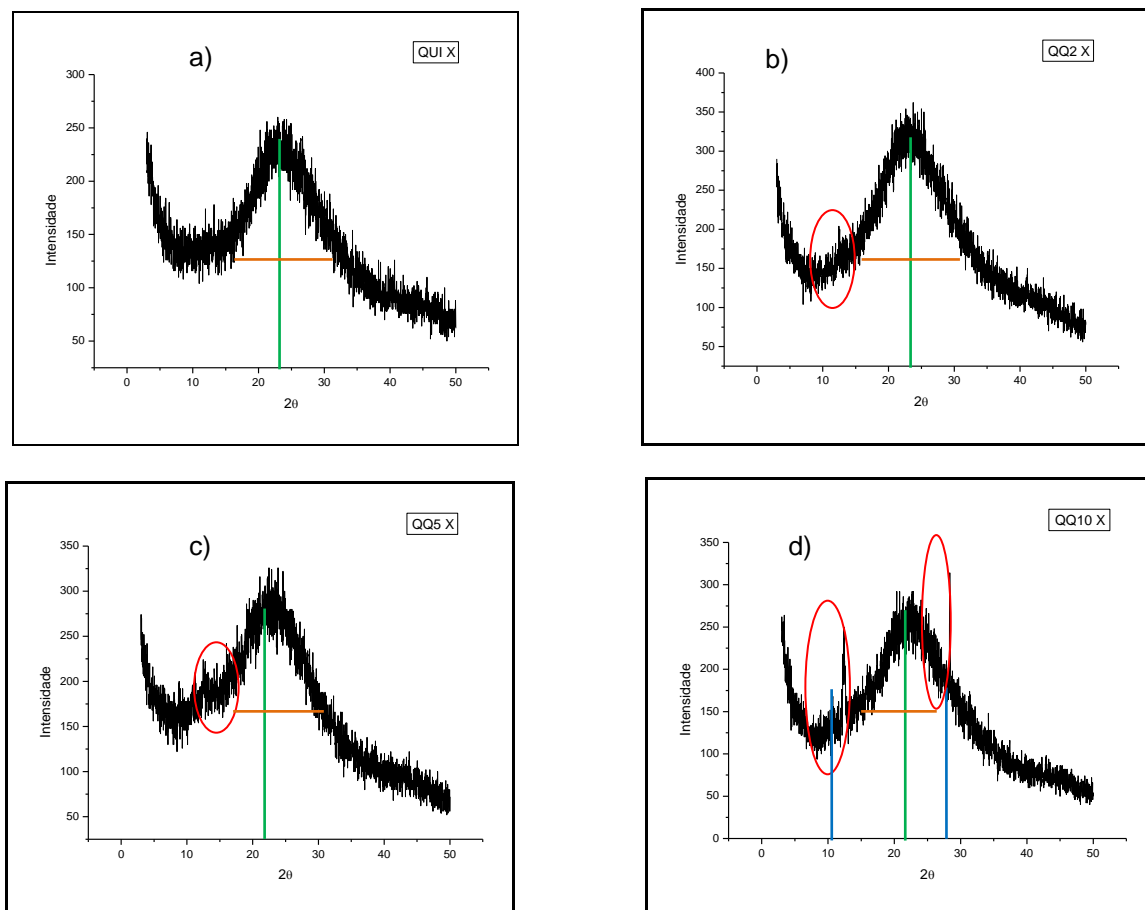
Observa-se que, os espectros apresentados na Figura 86 e na Figura 87 apresentaram diferenças bastante significativas, onde na primeira os espectros tiveram bandas funcionais semelhantes ao espectro da quitosana, havendo discreta visibilidade das bandas da quercetina e do TPP, mas que não se pode afirmar não haver interação entre eles; já na Figura 87, as bandas da quercetina são observadas com mais precisão, no entanto, também se observam discretas bandas da quitosana, reforçando a hipótese de ter havido a formação de um sal: o acetato de quitosana, devido ao procedimento metodológico adotado de não neutralizar as membranas Y, hipótese que foi confirmada após análise de DRX.

### **6.2.3 Espectroscopia por Difração de Raios X**

Os difratogramas das membranas quitosana e quitosana/ quercetina do tipo X estão expostos na Figura 88. Observam-se semelhanças em todos os difratogramas, constatando-se o deslocamento para a direita do pico característico da quitosana, situado entre  $17^\circ$  e  $20^\circ$ , que passou a ser em  $23^\circ$ , tornando a membrana mais amorfa quando comparada à quitosana pura. Tal constatação pode ser decorrente do processo de reticulação em TPP, que funciona como agente reticulante iônico e as reticulações iônicas são caracterizadas por produzir ligações reversíveis, que tendem a deslocar o pico e aproximar as cadeias, conforme observado no estudo de Holanda (2011).

Goulart (2006) encontrou em seu estudo, difratogramas onde houve a mudança no pico da quitosana que foi deslocado para direita, provavelmente pela reticulação com TPP e a inserção de papaína entre as cadeias de quitosana, o que alterou a distância interplanar das cadeias poliméricas, modificando a organização da estrutura molecular da quitosana. Pode-se dizer que, a possível diminuição da distância interplanar implicou no aumento discreto da cristalinidade da membrana, o que vai afetar a forma de liberação da quercetina.

Figura 82 - Difratomogramas das membranas obtidas pela metodologia X: quitosana X (a); quitosana/ quercetina 2 mg (b); quitosana/ quercetina 5 mg (c); quitosana/ quercetina 10 mg (d).



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Ao analisar a Figura 88, constatou-se que, a presença da quercetina (b, c e d) aumentou discretamente a cristalinidade da membrana quando comparada à de quitosana pura (a). A quercetina apresenta um perfil cristalino descrito na literatura, onde foram encontrados alguns picos característicos, entre cinco diferentes amostras deste flavonóide, expressos no quadro (NATARAJAN et al., 2010; BORGHETTI et al., 2006).

Observou-se assim, a presença dos picos característicos da quercetina foi evidenciado com mais nitidez na Figura 87 d, isto é, onde houve maior concentração de fármaco, em aproximadamente  $14^\circ$  e  $27^\circ$ , compatível com o difratograma de raios X para (a) JCPDS 43-1695 e (b) fármaco quercetina, expresso na Tabela 15.

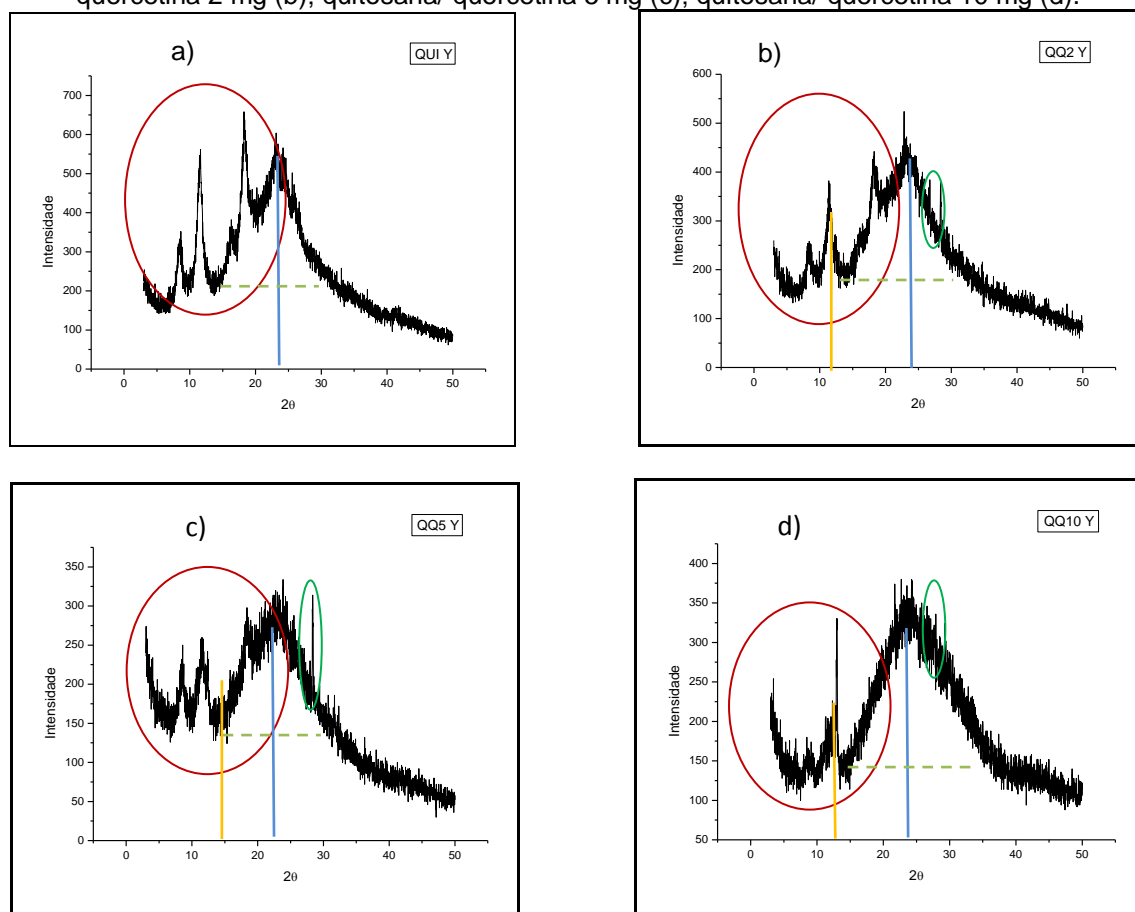
Tabela 14 - Principais picos de difração de raios-X da quercetina.

Experimental (°)	Quercetina (°) <sup>a</sup>	QPA (°) <sup>b</sup>	QPGa (°) <sup>b</sup>	QPGb (°) <sup>b</sup>	QPGc (°) <sup>b</sup>
14,07	11,64	10,75	10,73	13,51	4,54
26,51	17,84	12,43	12,41	14,11	13,07
27,38	21,32	27,38	27,38	26,52	26,04
-	27,18	-	-	-	-

Fonte: NATARAJAN et al., 2010.

Ao se observar os difratogramas da Figura 89 das membranas obtidas através da metodologia Y, verificou-se que houve aumento na cristalinidade em todos os difratogramas, isto quer dizer que não se pode atribuir essa característica à incorporação de fármaco, uma vez que a Figura 88a, já exibe tal aspecto se trata de uma membrana de quitosana pura.

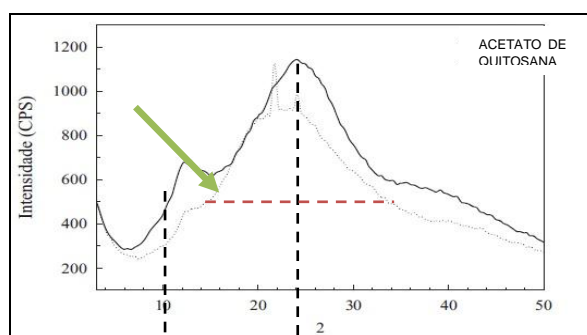
Figura 83 - Difratogramas das membranas obtidas pela metodologia Y: quitosana Y (a); quitosana/ quercetina 2 mg (b); quitosana/ quercetina 5 mg (c); quitosana/ quercetina 10 mg (d).



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Tal constatação permite inferir que o perfil de cristalinidade exibido nos difratogramas da Figura 89, especificamente até o pico de 23°, se deu pela formação acetato de quitosana, sal este resultante do processo de obtenção da quitosana em ácido acético, no qual não houve neutralização. O levantamento desta hipótese, juntamente com a observação do difratograma exposto na Figura 90, corrobora e reforça a formação do sal que conferiu cristalinidade aos referidos difratogramas.

Figura 84 - Difratograma do Acetato de Quitosana.



Fonte: Signini e Campana Filho (2001).

Observou-se que, o pico principal do acetato de quitosana é encontrado nos difratogramas obtidos pela metodologia Y, bem como o pico com base alargada, observação que corrobora com os estudos de Signini e Campana Filho (2001), que encontraram sinal mais intenso, em 22° aproximadamente, com sinal largo observado (Figura 90), do acetato de quitosana.

Convém ainda ressaltar, que nos difratogramas b, c e d, há discreta preservação dos picos principais da quercetina, em 14 e 27°, aspecto que pode ter contribuído para conferir o aumento na cristalinidade nas membranas de quitosana e de quercetina.

A análise de DRX permitiu confirmar a formação de acetato de quitosana nas membranas obtidas através da metodologia Y, estando associado aos resultados dos ensaios do FTIR que apontaram a presença das bandas funcionais ácidas.

#### 6.2.4 Análise Termogravimétrica (Tga)

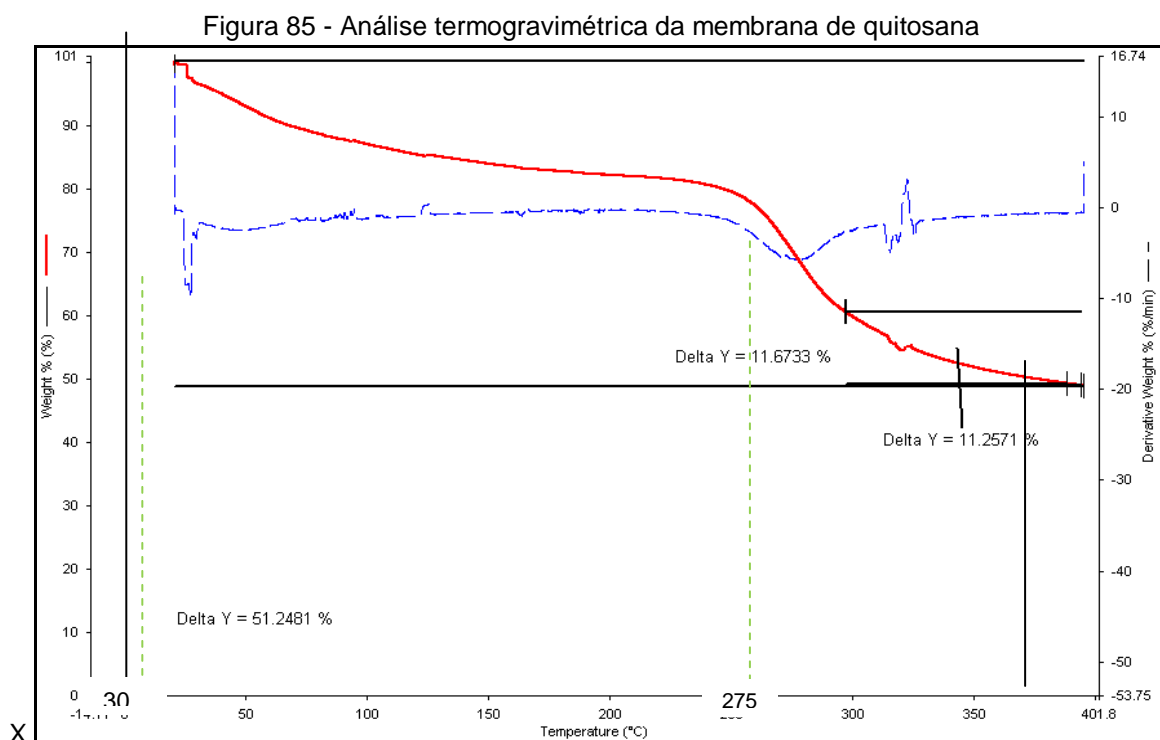
A Figura 91 descreve o comportamento térmico da curva TGA/DTA da amostra de quitosana X, que relaciona a perda de massa em função da temperatura. Pode-se observar o primeiro evento em 30 °C, no interior do polímero; um segundo



evento em 275 °C que é característico da degradação térmica da quitosana e a perda de material volátil; esta pirólise inicia-se com a quebra da cadeia polimérica de forma aleatória formando as unidades monoméricas. Por fim, o terceiro evento, em temperaturas maiores que 400°C, atribui-se a degradações correspondentes aos resíduos finais do polímero, segundo Antonino (2007).

O termograma da membrana de quitosana pura reticulada com tripolifosfato de sódio apresenta, então, duas perdas distintas. A primeira representa um possível processo de desidratação, e a segunda fase corresponde à decomposição da quitosana, começando para a temperatura de 250 °C com curva de termogravimetria derivativa (DTG) apresentando um pico em 275 °C, indicando que esta é a temperatura para a qual ocorre a máxima perda de massa, havendo semelhança com os resultados encontrados por Fernandes (2009).

A autora supracitada evidenciou que o processo de decomposição da membrana reticulada em TPP não se completa, mesmo para temperaturas de 600 °C, uma vez que a reticulação física aumentou a estabilidade térmica da quitosana, e o processo de decomposição da membrana teve início a uma temperatura superior.



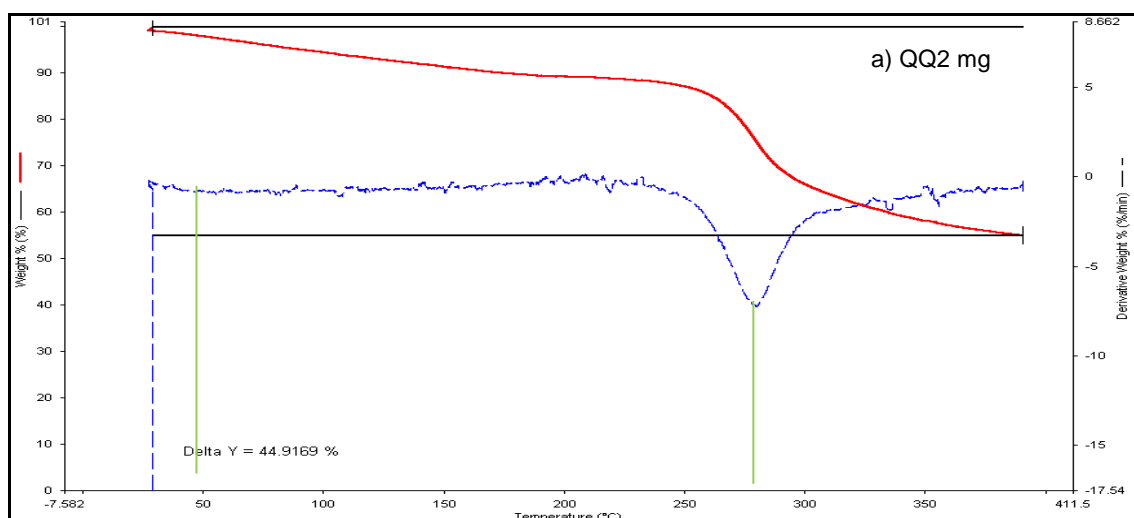
Fonte: Pesquisa direta (2014).

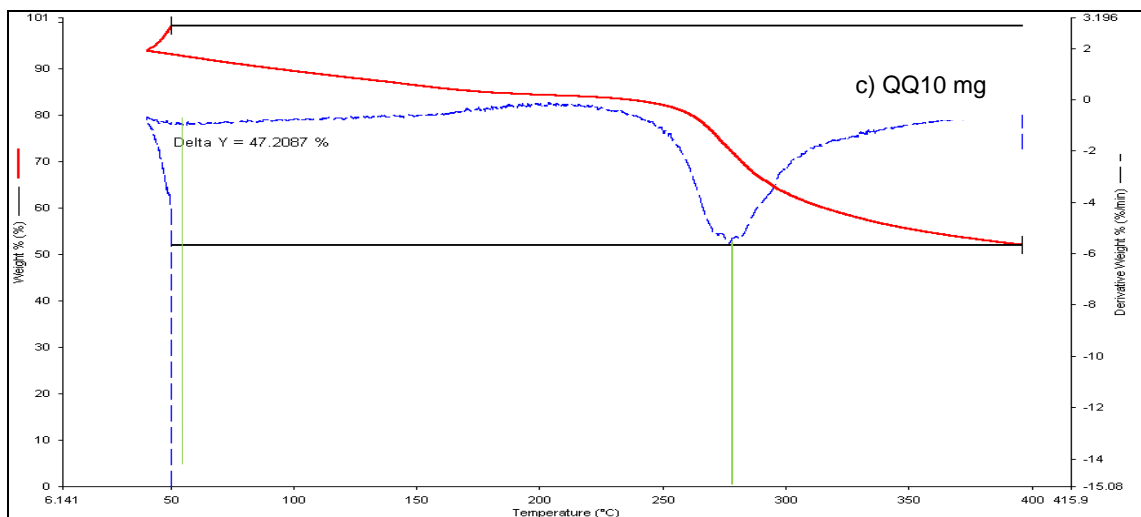
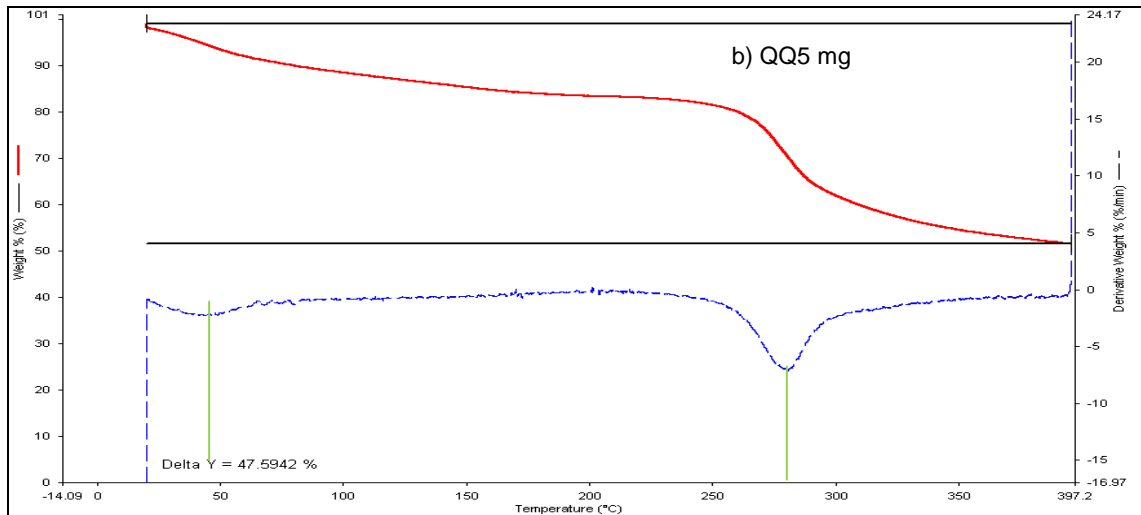
As faixas onde houve perda de massa (eixo Y) se referem a uma temperatura no (eixo X). Analisando a Figura 90, observa-se uma “curva”, na faixa de 25 a 250 °C, iniciando em 100% (eixo Y) e finalizando em 80% (eixo Y), com uma perda de massa de 20%, e uma segunda “curva”, iniciando em 251 a 400 °C, com uma perda de massa de 31% representando um total de, aproximadamente, 51%.

A Figura 92 mostra a análise termogravimétrica das membranas quitosana/ quercetina do tipo Y, nas concentrações de 2, 5 e 10 mg, sendo constatada certa semelhança a da quitosana pura, contudo, há discretos efeitos causados pela adição da quercetina que modificaram a temperatura de degradação da membrana.

Moraes (2007) diz que a curva TG da quercetina apresenta duas perdas de massa: a primeira possui corresponde à perda de massa, relativa à água de cristalização, com ponto médio em 108 °C; a segunda perda, com ponto médio em 350 °, representa o início da fusão, indicando a decomposição e colapso estrutural da substância, resultando em perda de massa seis vezes maior que no primeiro evento, sendo a queda da linha na curva, a partir de 360 °C, atribuída à decomposição residual da quercetina.

Figura 86 - Análise TG das membranas do tipo QQ2 (mg) X; QQ5 (mg) X e QQ10 (mg) X.





Fonte: Pesquisa direta (2014).

Pode-se dizer, ao analisar a Figura 92, que a interação da quitosana/ quercetina/ TPP resultou em termogramas bastante semelhantes, com duas perdas de massa, sendo que a temperatura de pico da primeira perda de massa foi discretamente maior, quanto maior a concentração de quercetina, bem como a temperatura decomposição da quitosana se elevou, de 275°C para 285°C. Acredita-se que a adição da quercetina à quitosana elevou a estabilidade térmica da quitosana, pois o processo de decomposição da membrana reticulada teve início a uma temperatura superior. As diferenças estão esboçadas na Tabela 16.

Tabela 15 - Temperatura de pico e perda de massa total obtida pela curva TG das membranas X.

TIPOS	TEMP. DE PICO (1ª PERDA DE MASSA)	TEMP. DE PICO (2ª PERDA DE MASSA)	PERDA DE MASSA TOTAL
QUI X	≅ 30°C	≅ 275°C	51%
QQ2 X	≅ 45°C	≅ 285°C	44%
QQ5 X	≅ 45°C	≅ 285°C	47%
QQ10 X	≅ 50°C	≅ 285°C	47%

Fonte: Pesquisa direta (2014).

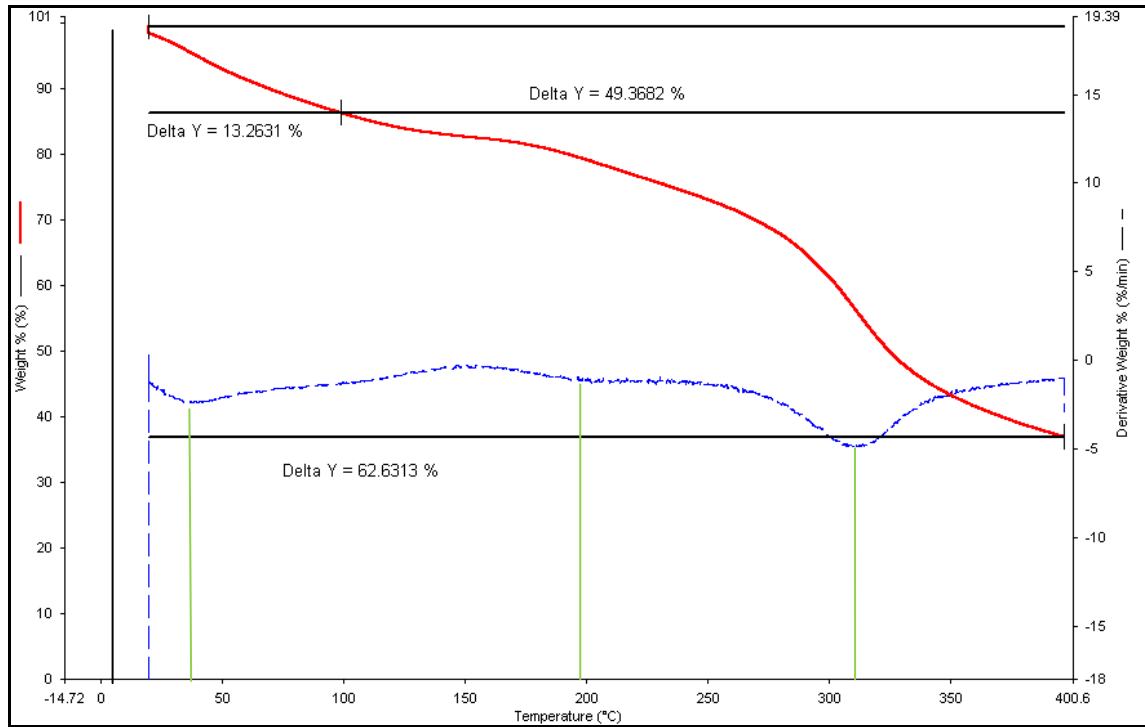
Segundo Matos et al. (2009) a temperatura em que se inicia a perda de massa é a temperatura inicial do evento, ou seja, o ponto onde a amostra deixou de ser estável termicamente e iniciou a liberação de substâncias voláteis. A temperatura inicial de perda das membranas X foram a partir de 25°C.

Constatou-se assim, que a membrana de quitosana pura perdeu mais massa, ao final do processo, na temperatura de 400 °C e as membranas de quitosana perderam quantidade de massa equivalente. Convém frisar que, a partir de 360 °C ocorre à decomposição residual da quercetina e entre 400 - 900°C ocorrem degradações correspondentes aos resíduos finais da quitosana. O percentual de massa restante das membranas quitosana/quercetina, após o final da análise, foi superior ao da quitosana pura.

Na Figura 93, pode-se observar a análise térmica da membrana de quitosana que não foi neutralizada, isto é, do tipo Y; vê-se a presença de três eventos, isto é, apresenta 3 perdas de massa, onde a primeira decomposição da quitosana ocorreu em aproximadamente 30°C, correspondente a perda de água, havendo uma perda de 13%, superior ao que foi encontrado no estudo de Moraes (2007), talvez pelo fato de se tratar de uma membrana de quitosana não neutralizada que culminou com a formação do acetato de quitosana, fato já confirmado nos ensaios de FTIR e DRX.

O segundo evento, referente à perda de material orgânico, ocorreu em 190°C, que se deve a presença do íon carboxilato; e o terceiro, com pico em 310°C, com perda de 49%, totalizando uma perda de 62%.

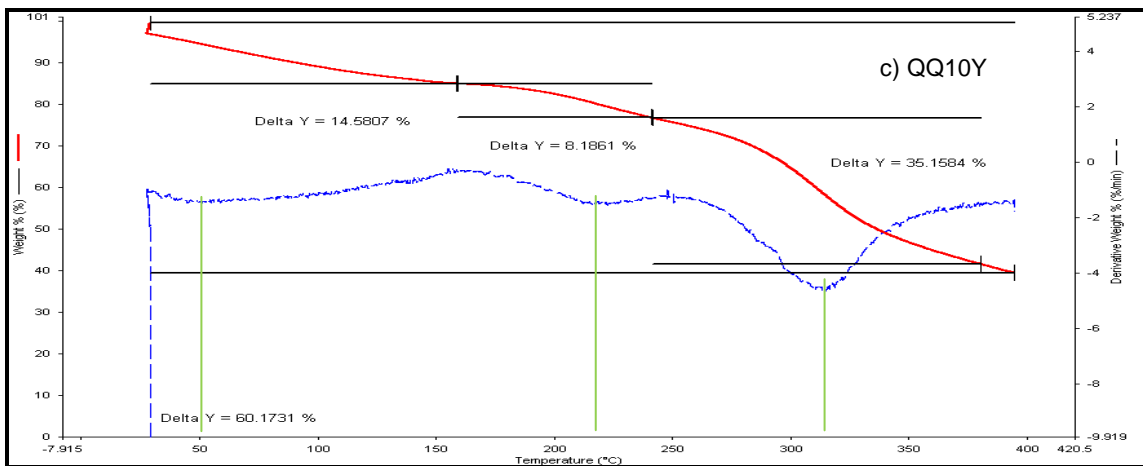
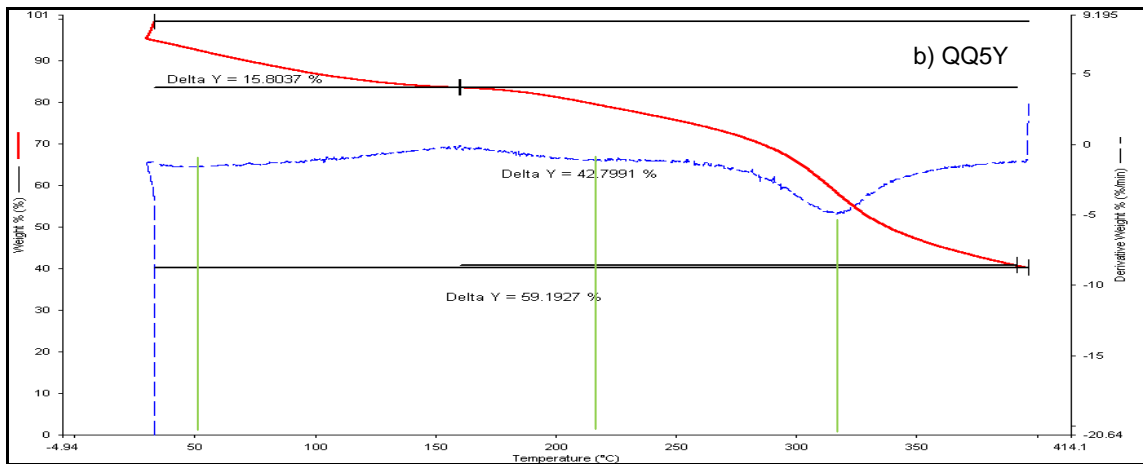
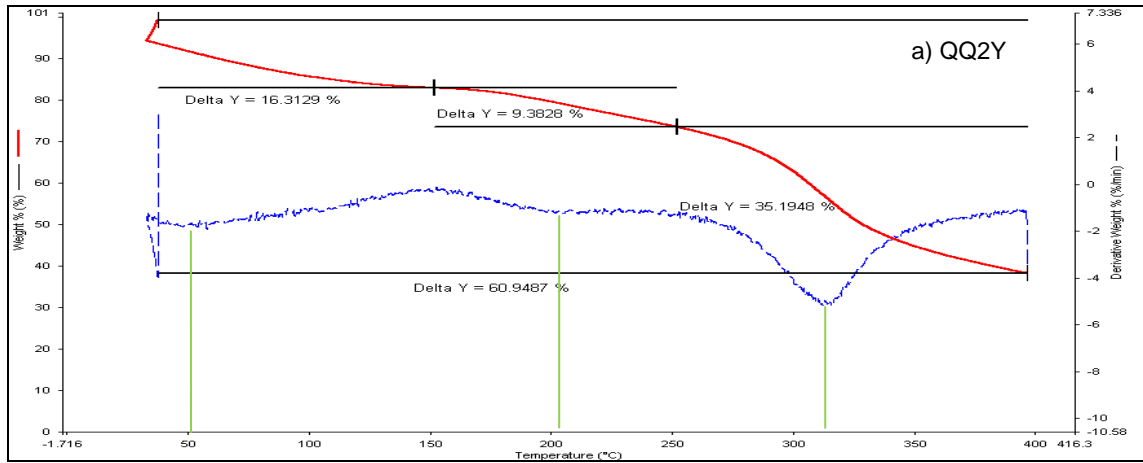
Figura 87 - Análise termogravimétrica da membrana do tipo quitosana tipo Y.



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Os dados de termogravimetria representados na Figura 94 representam as membranas de quitosana/ quercetina tipo Y, nas três variadas concentrações do flavonóide, onde se observa igualmente, três perdas de massa, comportamento semelhante ao termograma da quitosana pura; constatou-se certa equivalência da variação da temperatura de pico em função da perda de massa nos diferentes termogramas.

Figura 88 - Análise termogravimétrica das membranas QQ2 mg (a); QQ5 mg (b) e QQ10 mg (c).



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Observou-se que, a temperatura de pico da primeira perda de massa para os três termogramas (a, b e c) de quitosana/ quercetina ocorre em aproximadamente 50°C, com perda média de massa de 9%, coincidindo com a cedência da água da quitosana; a segunda perda tem pico médio de 210 °C, com perda média de 12% e a maior perda ocorre na terceira etapa, com perda média de 20% da perda total, como exposto na Tabela 17.

A segunda decomposição referente à perda de material orgânico ocorreu numa temperatura de pico inferior à decomposição da quitosana, que ocorre entre 250-280 °C, provavelmente devido a presença do acetato de quitosana.

Acredita-se que, a maior perda de massa ocorre nessa terceira etapa porque representa o início da fusão da quercetina, indicando a decomposição e colapso estrutural da substância, corroborando com a análise dos resultados obtidos por Costa et al (2011). Observou-se que, as membranas Y possuem menor estabilidade térmica após a desidratação e perdem mais massa do que as obtidas pela metodologia X, em média de 60%.

Tabela 16 - Temperatura de pico obtida pela curva TG das membranas Y.

TIPOS	TEMP. DE PICO (1ª PERDA)	TEMP. DE PICO (2ª PERDA)	TEMP. DE PICO (3ª PERDA)	PERDA DE MASSA TOTAL
QUI Y	≅ 30°C	≅ 190°C	≅ 310°C	62%
QQ2 Y	≅ 50°C	≅ 210°C	≅ 320°C	60%
QQ5 Y	≅ 50°C	≅ 220°C	≅ 320°C	59%
QQ10 Y	≅ 52°C	≅ 225°C	≅ 325°C	60%

Fonte: Pesquisa direta (2014).

Considera-se que, a imersão das membranas em tripolifosfato de sódio (Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) aumentou a resistência mecânica e a maleabilidade das mesmas, induzindo uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados da quitosana, favorecendo melhora da estabilidade térmica, fato que refletiu na taxa de decomposição menor das membranas X, aspecto encontrado por Orrego; Valencia (2009) na reticulação de membranas com o glutaraldeído.

### 6.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 95 (a e b) observam-se as curvas de DSC das membranas de quitosana obtidas pela Metodologia X e Y. Verificou-se, em ambas, a presença de dois picos, sendo um pico endotérmico, com temperatura máxima média de 165° C, atribuído a evaporação de substâncias voláteis, como água ligada a pontes de hidrogênio com grupos hidroxila da quitosana, e a presença de um pico exotérmico, com temperatura média de 276° C, correspondente à degradação da quitosana.

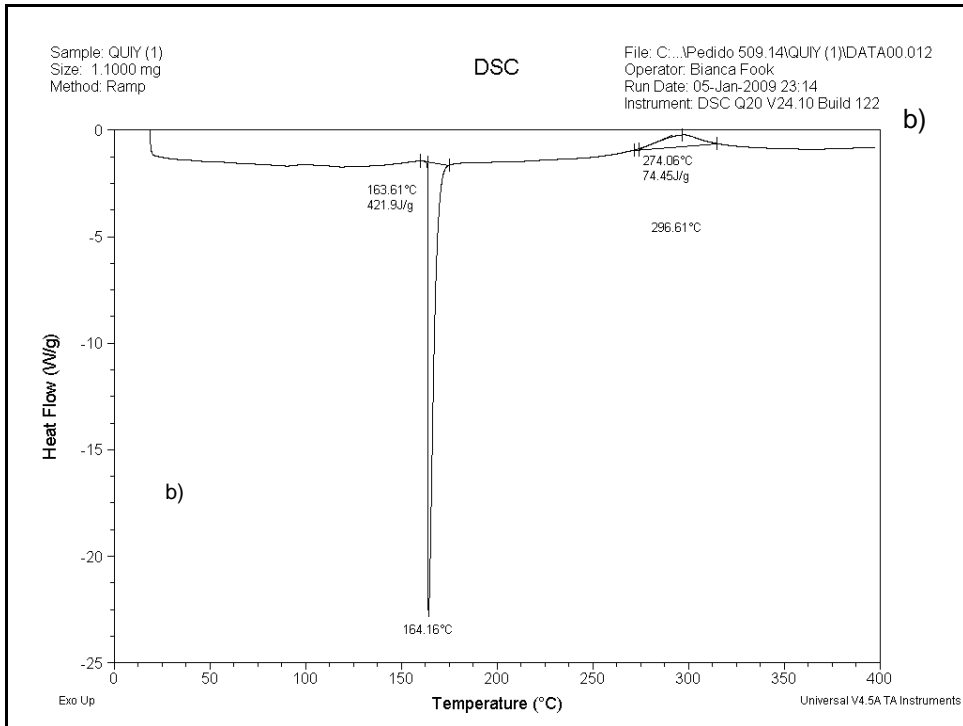
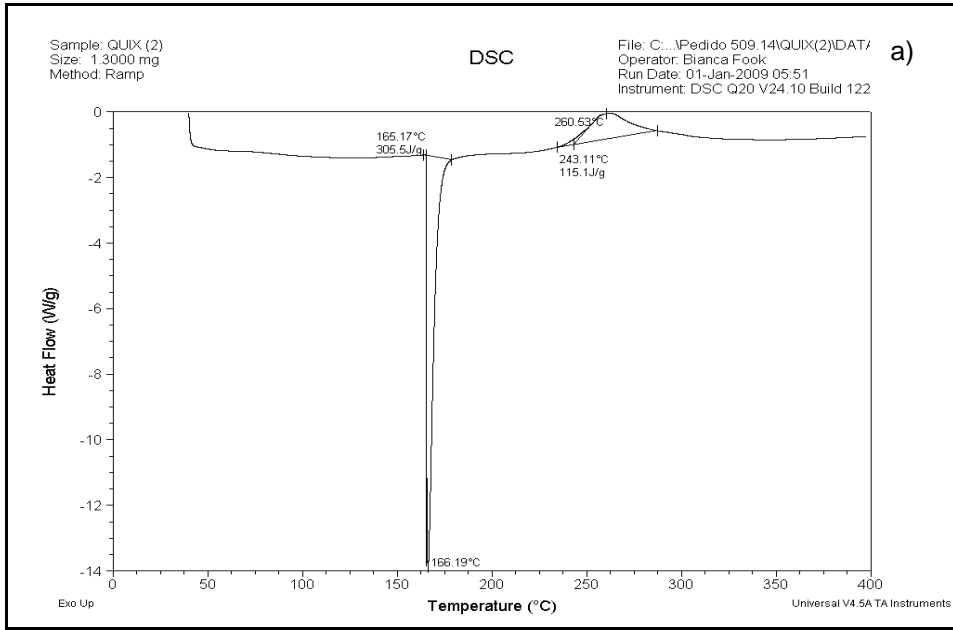
Acredita-se que, a temperatura de pico endotérmico, onde normalmente, é de 100° C tenha sido deslocado para 165°C, provavelmente em virtude do processo de reticulação em TPP (membranas X), pela formação do sal acetato de quitosana (membranas Y) ou pelo baixo teor de água presente nas membranas; já o pico exotérmico é correspondente à degradação da quitosana. Conforme Júnior et al (2010), picos exotérmicos estão relacionados com uma série de eventos, principalmente com transições sólidas e alguns tipos de decomposições; a temperatura máxima de decomposição foi maior para decompor das membranas Y, no entanto foi requerida uma energia menor.

Salazar; Negrón (2010) diz que a decomposição térmica de um filme de quitosana reticulada em TPP ocorrem em três eventos térmicos diferentes. O primeiro entre a temperatura ambiente e aproximadamente 143° C, que corresponde à perda de umidade. Em aproximadamente 430° C ocorre a despolimerização térmica do polímero culminando com o termoxidação do filme até os 700° C, aproximadamente. No presente estudo observou-se os dois primeiros eventos, pelo fato do ensaio ter sido feito até 400 °C.

Observa-se assim, que a energia necessária envolvida no pico exotérmico é maior na membrana X ( $\Delta H = 115,1$  J/g). Borges et al (2005) diz que picos na região de 190 e 280° C são atribuídos á quebra da interação entre grupamentos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e o  $\text{COO}^-$  do ácido, ou seja, as membranas que foram reticuladas em TPP tiveram a associação das cadeias intermoleculares que formaram ligações reversíveis e que maior energia é necessária ( $\Delta H$ ) para romper essa interação, do que aquelas Y que não foram reticuladas, conforme exposto na Tabela 19.



Figura 89 - Análise de DSC das membranas de quitosana obtidas pela metodologia X (a) e Y (b).



Fonte: Pesquisa direta (2014).

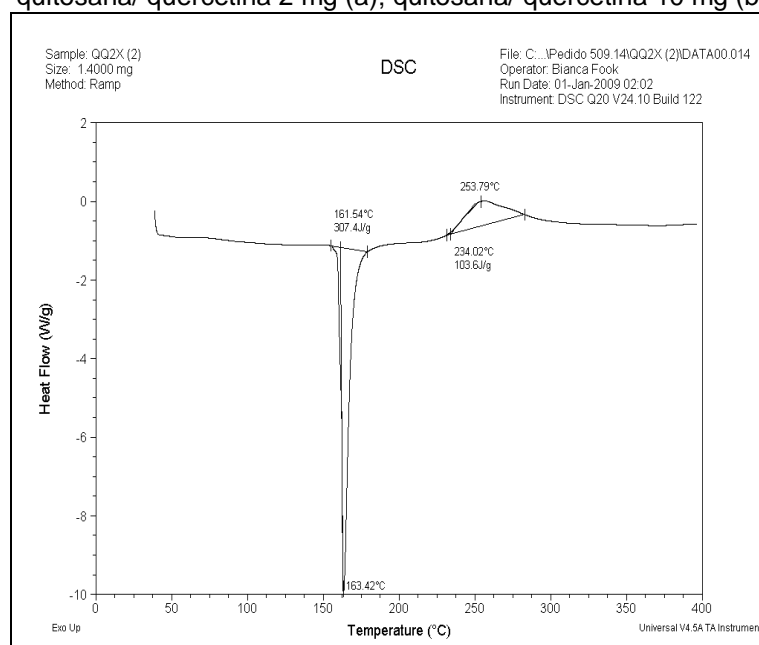
Tabela 17 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana X e Y obtidos por DSC.

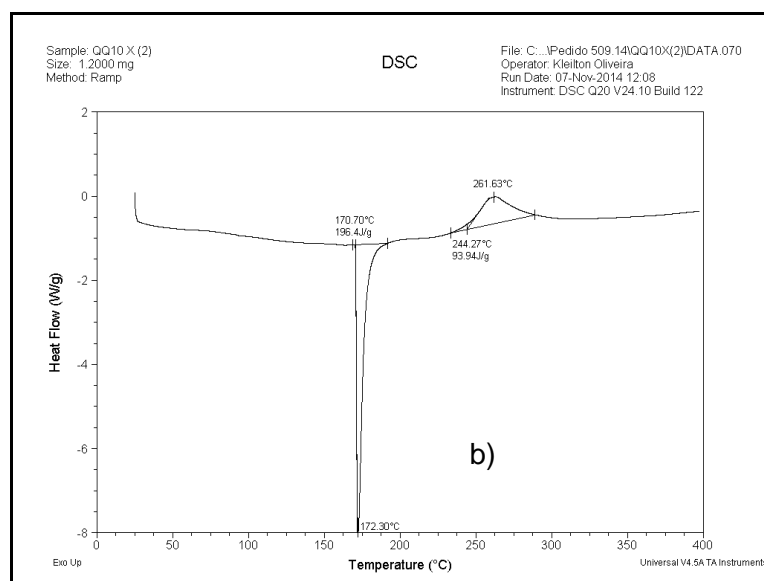
AMOSTRA	EVENTOS					
	ENDOTÉRMICO			EXOTÉRMICO		
	Tonset (°C)	Tmáx. (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Tonset (°C)	Tmáx. (°C)	$\Delta H$ (J/g)
QUI X	165,17	166,19	305,51	243,11	260,53	115,1
QUI Y	163,61	164,16	421,9	274,06	296,61	74,45

Pesquisa direta (2014).

A curva obtida por DSC das membranas quitosana/ quercetina do tipo X está ilustrada na Figura 96. Os parâmetros térmicos observados estão dispostos na Tabela 19. Observa-se que os picos endotérmicos das curvas de DSC são semelhantes na amostra QQ2X e QQ10X. Os picos de decomposição térmica apareceram em temperaturas discretamente menores entre as membranas X, do que foi observado nas membranas de quitosana pura, ou seja, a adição da quercetina pode ter contribuído para esse fato.

Figura 90 - Análise de DSC das membranas de quitosana/ quercetina obtidas pela metodologia X: quitosana/ quercetina 2 mg (a); quitosana/ quercetina 10 mg (b).





Fonte: Pesquisa direta (2014).

Costa (2005) afirma que o primeiro pico endotérmico da quercetina está relacionado com a perda da água de cristalização, relatado na literatura, onde  $T_{máx}$  se estende de  $101\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $116\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2004). O segundo evento relaciona-se com a fusão da quercetina, entre  $314\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $317\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Não foram observados os picos da quercetina ao analisar a curva de DSC, contudo acredita-se que a interação entre o polímero e o flavonóide pode ter dificultado o movimento das cadeias poliméricas, favorecendo uma modificação nos valores da temperatura de decomposição proporcional à concentração de quercetina.

Tabela 18 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana/ quercetina do tipo X obtidos por DSC.

AMOSTRA	EVENTOS					
	ENDOTÉRMICO			EXOTÉRMICO		
	Tonset ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{máx.}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)	Tonset ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{máx.}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)
QQ 2X(mg)	161,54	163,42	307,4	234,02	253,79	103,6
QQ 10X(mg)	170,7	172,30	194,4	244,27	261,63	93,94

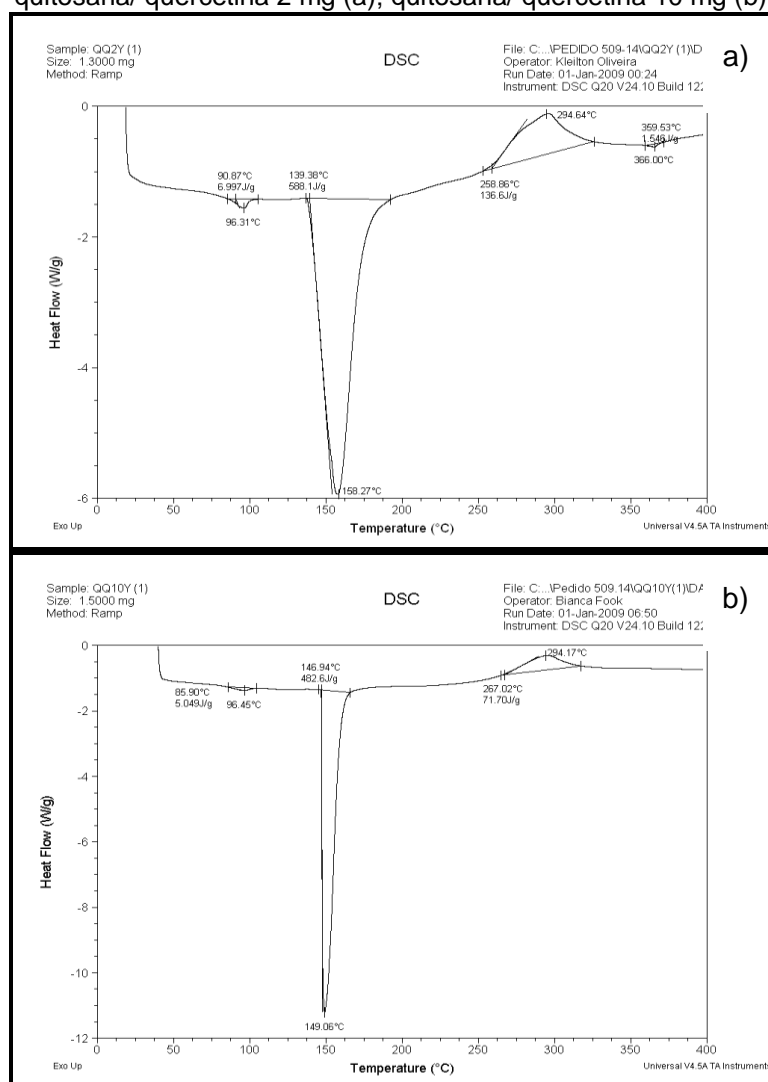
Fonte: Pesquisa direta (2014).

A Figura 96 expressa as curvas DSC para as membranas quitosana/ quercetina obtidas através da metodologia Y. Assim como nos termogramas apresentados em seção anterior, observam-se três eventos, sendo dois

endotérmicos e um exotérmico. A desidratação ocorreu, provavelmente, no primeiro evento endotérmico, na temperatura média de 100 °C, corroborando com a perda de água, tanto da quitosana quanto da quercetina, tendo sido envolvida uma energia muito alta para realizar essa perda. O segundo pico endotérmico ocorreu o evento denominado volatilização, onde houve a evaporação do acetato de quitosana formado nas membranas obtidas em neutralização, nem reticulação.

O pico exotérmico da quitosana foi encontrado por Almeida (2009) próximo de 275° C e o da quercetina próximo a 318° C. Acredita-se assim, que a interação entre ambos os materiais resultou em uma temperatura com pico máximo de decomposição de 293 °C, conforme ilustra a Tabela 20.

Figura 91 - Análise de DSC das membranas de quitosana/ quercetina obtidas pela metodologia Y: quitosana/ quercetina 2 mg (a); quitosana/ quercetina 10 mg (b).



Fonte: Pesquisa direta (2014).

Tabela 19 - Parâmetros térmicos observados para as membranas de quitosana/ quercetina do tipo Y obtidos por DSC.

AMOSTRA	EVENTOS								
	ENDOTÉRMICO			ENDOTÉRMICO			EXOTÉRMICO		
	Tonset (°C)	Tmáx. (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Tonset (°C)	Tmáx. (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Tonset (°C)	Tmáx. (°C)	$\Delta H$ (J/g)
QUI Y 2(mg)	90,97	96,31	6,997	139,38	158,27	586,1	258,86	294,64	136,6
QUIY10(mg)	85,90	96,45	5,049	146,94	149,06	482,6	267,02	294,17	71,70

Fonte: Pesquisa direta (2014).

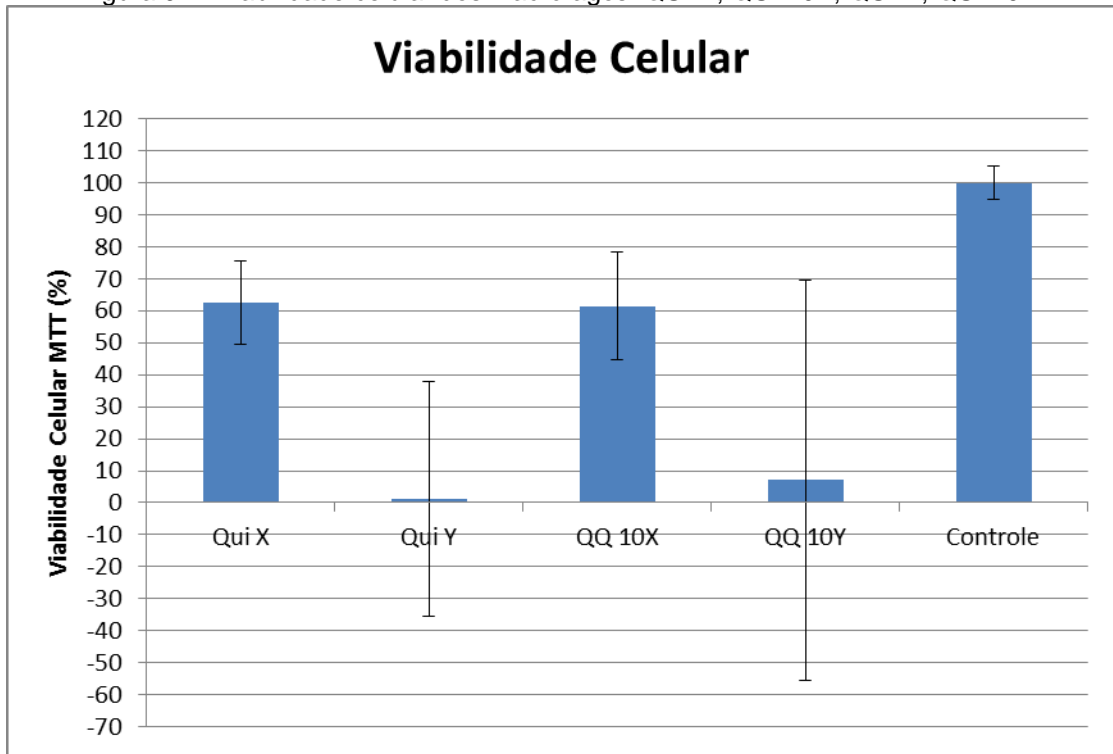
Considera-se assim, que a decomposição térmica de um filme de quitosana reticulada em TPP e quitosana não reticulada apresenta eventos térmicos diferentes, e que ao adicionar o fármaco quercetina, este favorece algumas discretas mudanças nas curvas de DSC que corroboram com os ensaios de TG.

### 6.2.5 Avaliação de Viabilidade Celular dos Macrófagos

O objetivo deste ensaio foi avaliar a viabilidade das células face ao material (membrana) produzido para uso em organismos vivos. O teste de citotoxicidade é um teste rápido, padronizado, sensível e de baixo custo, capaz de informar se um material apresenta quantidades significantes de elementos tóxicos, padronizado nas normas ISO 10993-5 (PEREIRA, 2008).

A Figura 98 ilustra o resultado deste teste. Comparando-se com um valor mínimo de 50% requerido para o teste de citotoxicidade, de acordo com a NORMA ISO 10993-5, os resultados obtidos na demonstram que as membranas QUI X e QUI 10X apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial, uma vez que as amostras exibiram comportamentos semelhantes entre si, ou seja, as membranas mostraram-se promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

Figura 92 - Viabilidade celular dos macrófagos: QUI X; QUI 10X; QUI Y; QUI 10Y.



Contudo, as membranas QUI Y e QUI 10Y não têm viabilidade para aplicação *in vivo*, talvez em decorrência da não neutralização das mesmas terem resultado em um produto muito ácido, que quando colocado em meio de cultura causou a destruição celular.

Convém frisar que o pH de finalização de tais membranas esteve entre 3,5 e 4,0, e que o ideal esperado das membranas utilizadas para o tratamento de feridas é que tenham o pH semelhante ao da pele (média de 5.5); muito embora esta membrana seja contraindicada por ter aspecto ácido, ela torna-se uma possibilidade, pelo fato de que, quando a quitosana está em meio ácido, ela torna-se policatiónica, aumentando a mucoadesividade, necessária para adesão às feridas.

### 6.3 SÍNTESE DOS RESULTADOS

CARACTERIZAÇÕES	RESULTADOS
<b>MEV/ EDS</b>	<p>Na análise da micrografia da membrana de quitosana tipo X, observou-se uma superfície plana, homogênea e lisa, aspecto que a caracteriza como densa, mas há presença de algumas irregularidades, efeito atribuído ao processo de reticulação em TPP.</p> <p>Constatou-se que, houve a incorporação da quercetina na matriz de quitosana, onde o fármaco ficou disperso em toda superfície, homogeneamente, no entanto observou-se presença de “marcas” nodulares escuras, atribuído a presença do TPP.</p> <p>No ensaio de EDS foram encontrados os elementos Oxigênio, Nitrogênio, Carbono, Fósforo e Sódio, sendo estes dois últimos resquícios da reticulação, observado percentual de massa equivalente dos elementos químicos identificados.</p> <p>Na micrografia da membrana de quitosana Y, observa-se menor homogeneidade que as membranas do tipo X, evidenciando a presença de partículas em forma de aglomerados, conferindo aspecto heterogêneo.</p> <p>Após a adição do fármaco, constatou-se maior homogeneidade superior às do tipo X, isto é, e nos maiores aumentos, observam-se partículas, com dimensões variadas, em forma de estrias, compatível com a estrutura da quercetina, confirmando incorporação do fármaco.</p> <p>Nos ensaios de EDS das membranas tipo Y foram encontrados Oxigênio, Nitrogênio e Carbono, compatíveis com os compostos utilizados.</p>
<b>FTIR</b>	<p>Pode-se afirmar que a adição da quercetina nas membranas de quitosana tipo X pouco alteraram as bandas funcionais características da quitosana, mesmo havendo a reticulação dos filmes em TPP, muito embora isto não implica que não tenha ocorrido uma interação química entre os dois compostos.</p> <p>Observou-se, nos espectros da quitosana/ quercetina/ TPP, discretas modificações em algumas bandas, compatível com as bandas características da quercetina, aspectos que podem sugerir que houve uma possível interação entre a quitosana e a quercetina. O discreto aumento na intensidade em outras bandas (1639, 1547 e 1409 <math>\text{cm}^{-1}</math>) possivelmente ocorreu em virtude da interação entre a quitosana e o TPP.</p> <p>Os espectros obtidos através da metodologia Y evidenciam certa semelhança entre todas as concentrações de quercetina até a frequência de 1650 <math>\text{cm}^{-1}</math>, limite a partir do qual ocorrem modificações que, coincidem com</p>

	<p>as deformações por estiramento que ocorrem aos pares nos anéis aromáticos da quercetina, proporcional ao aumento na concentração do fármaco, cabendo inferir que há presença desse composto nessa faixa de frequência (1650 – 1300).</p> <p>Observam-se outras bandas de absorção que coincidem com o estiramento forte (C-O) presentes tanto na quercetina quanto na quitosana, e a deformação axial assimétrica (C-O-C), que se torna mais evidente quanto maior a concentração de fármaco, cabendo inferir uma possível interação entre os compostos.</p> <p>A presença de algumas bandas típicas dão características indicativas da presença de sítios ácidos, que se confirma, através da detecção de um pico desdobrado entre 1600 e 1400 <math>\text{cm}^{-1}</math>, uma vez que as membranas Y resultaram na formação de acetato de quitosana por não terem sido neutralizadas, conclusão reiterada pela análise do DRX e da TG.</p>
<b>DRX</b>	<p>Os difratogramas das membranas quitosana e quitosana/ quercetina do tipo X mostraram semelhanças entre si, constatando-se o deslocamento para a direita do pico característico da quitosana, situado entre 17° e 20°, que passou a ser em 23°; este fato pode ser decorrente do processo de reticulação em TPP.</p> <p>A adição de quercetina à membrana de quitosana aumentou discretamente a cristalinidade da membrana, sendo observada a presença dos picos característicos (14° e 27°) do fármaco, com mais precisão, onde houve maior concentração de fármaco.</p> <p>Ao se observar os difratogramas das membranas obtidas através da metodologia Y, verificou-se que houve aumento na cristalinidade desde a membrana de quitosana pura até àquelas contendo quercetina, não se podendo atribuir esse aumento de cristalinidade à adição de fármaco.</p> <p>Tal constatação permitiu inferir que, o perfil de cristalinidade exibido nos difratogramas, se deu pela formação acetato de quitosana, composto resultante do processo de obtenção da quitosana em ácido acético, no qual não houve neutralização. Tal hipótese foi reforçada após a observação e a análise do difratograma deste composto.</p> <p>Convém destacar, que nos difratogramas com fármaco, há discreta preservação dos picos principais da quercetina, em 14° e 27°, podendo esta ter contribuído para aumentar a cristalinidade das membranas.</p>
<b>TG</b>	<p>O comportamento térmico da curva TG da amostra de quitosana X e quitosana/ quercetina que foram reticuladas, apresentaram dois eventos de perda de massa: um da perda água da quitosana e o outro da queima de material inorgânico, havendo perda de massa total em torno de 51% para</p>



	<p>quitosana e 47 % para as membranas híbridas; o TPP aumenta a temperatura de decomposição.</p> <p>Já o comportamento das amostras obtidas pela metodologia Y evidenciam três fases de perda de massa, em virtude da formação do acetato de quitosana, que favoreceu a decomposição da quitosana em temperatura mais baixa e perda de massa total maior, em torno de 60%.</p>
<b>DSC</b>	<p>Após análise das curvas de DSC das membranas de quitosana obtidas pela Metodologia X e Y observou-se, em ambas, a presença de dois picos, sendo um pico endotérmico, com temperatura máxima média de 165° C, atribuído a evaporação de substâncias voláteis, e de um pico exotérmico, com temperatura média de 276° C, correspondente à degradação da quitosana.</p> <p>Observou-se a presença de dois picos, um endotérmico e um exotérmico, nas membranas de quitosana/ quercetina/ TPP, compatível com os termogramas; e a presença de três eventos nas membranas de quitosana/ quercetina sem neutralizar corroborando com os dados TG, sendo dois endotérmicos e um exotérmico.</p>
<b>CITOTOXICIDADE</b>	<p>Os resultados obtidos demonstraram que as membranas QUI X e QUI 10X apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial, uma vez que os valores obtidos encontraram-se acima de 50%, mostraram-se, assim, promissoras para serem testadas em ensaios <i>in vivo</i>.</p> <p>Já as membranas QUI Y e QUI 10Y não têm viabilidade para aplicação <i>in vivo</i>, talvez em decorrência da não neutralização e terem resultado em um produto muito ácido, que quando colocado em meio de cultura causou a destruição celular.</p>

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e após criteriosa análise dos dados obtidos na fase experimental deste trabalho, pode-se concluir que os objetivos foram alcançados, chegando-se a algumas constatações elencadas a seguir.

Houve incorporação de quercetina na membrana de quitosana em ambas as metodologias (X e Y), através da análise da micrografia e confirmado pelo percentual de massa no EDS; os espectros de FTIR apontaram que na metodologia X se evidenciou mais as bandas da quitosana, com discretas bandas da quercetina, já na metodologia Y, se evidenciaram as bandas da quercetina com discretas bandas da quitosana, havendo em ambas, subsídios que apontam haver interação entre os compostos utilizados: quitosana e quercetina.

Na análise dos difratogramas, observa-se a presença dos picos característicos da quercetina, em ambas as metodologias desenvolvidas; na metodologia X, a incorporação do fármaco aumentou discretamente a cristalinidade da membrana, quando comparada à de quitosana pura; no entanto, o discreto aumento na cristalinidade das membranas da metodologia Y ocorreu devido à formação do acetato de quitosana, resultante da não neutralização da solução de quitosana utilizada para obtenção das membranas.

O comportamento térmico da curva TG das metodologias X e Y apontou maior perda de massa até a temperatura de 400° C, das membranas obtidas pela metodologia Y, talvez pela formação do acetato de quitosana, em contrapartida, a reticulação em TPP das membranas tipo X, pode ter diminuído a perda de massa de tais membranas, devido a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes, tornando-se mais difícil de dissociar as estruturas ou então requerendo maior energia para as decompor.

Após análise das curvas de DSC das membranas de quitosana obtidas pelas metodologias X e Y, observou-se a presença de duas fases em ambas, contudo, a energia necessária no pico exotérmico é maior na metodologia X, fato atribuído ao processo de reticulação em TPP; viu-se que a temperatura máxima de decomposição foi maior para decompor das membranas de quitosana Y, no entanto foi requerida uma energia menor. Após a adição de quercetina, observou-se a presença de dois picos, um endotérmico e um exotérmico, nas membranas de

quitosana/ quercetina/ TPP, compatível com os termogramas; e a presença de três eventos nas membranas de quitosana/ quercetina sem TPP, corroborando com os dados TG, sendo dois endotérmicos e um exotérmico. Considera-se assim, que a decomposição térmica de uma membrana reticulada em TPP possui maior estabilidade térmica, isto é, elegendo-se a metodologia X como eficaz.

Por fim, as membranas do tipo X apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial, estando aproximadamente em 65%, compatível com a ISO 10993-5, sendo promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

Sugere-se que, novos ensaios sejam realizados partindo da metodologia X para produzir novas membranas quitosana/ quercetina, buscando aprimorar algumas das características finais do produto, contudo parâmetros fundamentais das variáveis foram estabelecidos nesse estudo, bem como a realização de outros ensaios que poderiam elucidar propriedades existentes, a partir desta interação.

Recomenda-se que, sejam desenvolvidas outras pesquisas utilizando essa mistura binária (quitosana e quercetina) até então inexplorada pela ciência, fato que representou um desafio o estabelecimento de uma metodologia válida e eficaz para concepção de tais membranas.

Torna-se de grande relevância científica, social e econômica realizar a testagem *in vivo* das membranas, para que elas representem opção terapêutica potencial da área da saúde e dos Biomateriais. Acredita-se que, esta poderia beneficiar milhares de pessoas portadoras de *Diabetes Mellitus* que possuem feridas diabéticas, inflamadas e com dificuldade de cicatrização, as quais anseiam por um tratamento não invasivo, eficaz e de baixo custo.

Nesta perspectiva, considera-se que a presente pesquisa foi exitosa por desenvolver uma proposta inédita, ampliar possibilidades terapêuticas, através da concepção de um produto resultante de fonte renovável, de baixo custo e com alto potencial de cura, sem haver necessidade de troca, uma vez que este é biodegradável.

Anseia-se que as membranas híbridas possam ser amplamente disponibilizadas, comercializadas e reconhecidas, como um produto de tecnologia nacional e de alta resolutividade no âmbito da Saúde Pública e na esfera do Sistema Único de Saúde (SUS), causando impacto positivo na qualidade de vida dos milhares de pacientes com feridas diabéticas, de todo o mundo.

## REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 1, p. 5-28, 2004.

AIMOLI, C. G. **Investigação da Adequação de Membranas de Quitosana Quimicamente Modificadas para Uso como Biomaterial: Estudo da Calcificação in vitro.** 2007. 187 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

AKNCBAY, H.; SENEL, S.; AY, Z. Y. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 80, p. 290-296, 2007.

ALDUNATE, J. L. C. B. et al. Úlceras venosas em membros inferiores. **Rev Med**, São Paulo, v. 89, p.158-163, 2010.

ALMEIDA, E. V. R. Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose. 2009. 158f. Tese (Doutorado) - Curso Ciências (Físico-Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ALVES, A. M. P. et al. ASPECTOS GERAIS E ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA QUERCETINA SOBRE AS COMPLICAÇÕES DO DIABETES CAUSADAS PELO ESTRESSE OXIDATIVO. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 14, n. 2, p.179-186, 2010.

ANTONINO, N. A. **Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões oriundo da Indústria Pesqueira Paraibana.** 2007. 89 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, p. 203-230, 2009.

ARANTES, A. A; AZEVEDO, S. X. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19, 2011, Piracicaba. **DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM PRODUTOS FITOTERÁPICOS.** Piracicaba: 2011.

AROF, A. K.; OSMAN, Z. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochim**, v. 48, p.993-999, 2003.

BARBOSA, F. S. **MODELO DE IMPEDÂNCIA DE ORDEM FRACIONAL PARA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA CUTÂNEA**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. *Bioquímica Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BLANES, L. Perfil do portador de úlcera por pressão internado no Hospital São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.

BIEGER, J. et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. **The Journal Of Nutrition**, v. 138, n. 8, p.1417-1420, ago. 2008.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p.2892-2923, 2008.

BORGES, E. L. et al. **Feridas: como tratar**. 2. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2001.

BORGHETTI, G. S. et al. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: Indication of polymorphism occurrence. **Pharmazie**, v. 61, n. 9, p.802-804, set. 2006.

BOULAIS, N et al. Merkel Cells as Putative Regulatory Cells in Skin Disorders: An In Vitro Study. **Plos One**, v. 4, n. 8, p.1-9, ago. 2009.

BRASIL. Grupo de Trabalho Internacional sobre Pé Diabético. **Consenso Internacional sobre Pé Diabético/** publicado sob a direção de Hermelinda Cordeiro Pedrosa; tradução de Ana Claudia de Andrade, Hermelinda Cordeiro Pedrosa Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica : diabetes mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.

BROUGHTON, G. 2nd; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 7, p.12-34, 2006.

BÜRGER, D. **EFEITOS DA QUERCETINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA CONTAMINADA EM RATOS WISTAR**. 2006. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CAIAFA, J. S. et al. Atenção integral ao portador de Pé Diabético. **J Vasc Bras**, v. 10, n. 4, p.1-32, 2011.

CAMPANA FILHO, S. P. et al. Extração, estrutura e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p.644-650, 2007.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. **Abcd Arq Bras Cir Dig**, v. 20, n. 1, p.51-58, 2007.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p.21-27, 2006.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p.261-268, 2001.

COSTA, A. R. M. et al. Quercetina-PVP K25 dispersões sólidas. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, v. 104, n. 1, p.273-278, abr. 2011.

COSTA, I. M. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p.241-256, 2009.

D'ACAMPORA, A. J. et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 1, p.69-75, 2007.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.D. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Matéria**, v.12, n. 1, p.134-139, 2007.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele**. 2005. 194 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. Coordenação e revisão de Rúbia Aparecida Lacerda; tradução Eliane Kanner. São Paulo: Atheneu, 2001

DE BOER, V. C. et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal Of Nutrition**, v. 135, n. 7, p.1718-1725, jul. 2005.

DIAS, R. J. S.; CARNEIRO, A. P. Neuropatia diabética: fisiopatologia, clínica e eletroneuromiografia. **Acta Fisiátrica**, 7(1): 35-44, 2000.

DIAS, A. S. **O antioxidante quercetina diminuiu o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos**. 2005. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DORA, C. L. et al. Formulation study of quercetin-loaded lipid based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v. 30, n. 2, p.289-296, 2011.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p.241-249, 2007.

DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé diabético. **Angiologia e Cirurgia Vascul**, v. 7, n. 2, p.65-79, 2011.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FERNANDES, L. M; BRAZ, E. A Utilização do Óleo de Girassol na Prevenção de Úlceras de Pressão em Pacientes Críticos. **Nursing**, Janeiro, 2002.

FIDÉLES, T. B. Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

FILHO, A. W. Potencial analgésico de flavonóides: Estudo do mecanismo de ação da quercetina. 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular **para aplicação como biomaterial**. 2005. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd.chem. Toxic**, v. 33, n. 12, p.1061-1080, dez. 1995.

FRADE, M. A. C. et al. Natural – biomembrane dressing and hypersensitivity. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 5, p.885-891, 2011.

FRAGA, C. A. et al. Matrizes hidrofílicas de quitosana/captopril: Desenvolvimento e Caracterização físico-química. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 31, n. 3, p.175-181, 2010.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F.. FERIDAS CUTÂNEAS: A ESCOLHA DO CURATIVO ADEQUADO. **Rev. Col. Bras. Cir.**, X, v. 35, n. 3, p.203-206, 2008.

FREIRE, R. D. **Estado Nutricional de Nipo-Brasileiros de Alto Risco para Síndrome Metabólica: Análise por Sexo e Geração.** 2002. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química**, v. 100, p.72-74, jan./mar. 2006.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V.; LIMA, E. D. R. P. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. **REME rev. min. enferm**; 13(1):19-27, jan.-mar. 2009.

GOMES, I.B.S. **Efeito do tratamento com quercetina sobre a nefropatia diabética em camundongos ateroscleróticos.** 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

GOULART, G. A. S. **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO PAPAÍNA.** 2006. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Processos, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p.16-26, 2002.

GROSSI, S. A. A. Prevenção de úlceras nos membros inferiores em pacientes com diabetes mellitus. **Rev. Ese. Enf. Usp**, v. 32, p.377-385, 1998.

HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons Fe<sup>3+</sup>. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HERTOG, M.G.L et al. A ingestão de flavonóides potencialmente anticancerígenas e seus determinats em adultos na Holanda. **Nutr. Câncer**, v.20, n.1, p.21-29, 2003.

HIRANO, S. Wet-spinning and applications of functional fibers based on chitin and chitosan. **Macromolecular Symposia**, v. 168, p.21-30, 2001.

HOLANDA, A. L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. 2011. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.

JE, J. Y.; KIM, S.K. Antimicrobial action of novel chitin derivative. **Biochim Biophys Acta**, v.1760, p.104-109, 2006.



JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. 378 p.

KAHN, H. Difração de Raios X. Disponível em: [http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1\\_multipart\\_xF8FF\\_2\\_DIFRACAO.pdf](http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf). Acesso em 19/11/2011.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 992 p.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de Uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, n.4, 2000.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.

KIM, I. Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 1, p.1-21, 2007.

LAMPE, K. E. Methods of Wound Evaluation. IN: KLOTH, L. C. McCULLOCH, J. M. 3.ed. **Wound Healing Alternatives in Management**. 2001. p. 153--200.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.672-678, 2009.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clin Dermatol**, 12(1):157-69, 1994.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, M. B. G. Maia. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva\*. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p.563-569, 2002.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.

LIMA, M. H. M. ARAÚJO, E. P. **Diabetes Mellitus e o Processo De Cicatrização Cutânea**. *Cogitare Enferm*. 2013 Jan/Mar; 18(1):170-2

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cien. Farm**, São Paulo, v. 41, n. 2, p.455-470, jun. 2005.

LOPES, R. M. et al. FLAVONÓIDES - Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 17, p.18-22, 2000.

MALTA, D.C. et al. **A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, vol. 15(1), n.3, p. 47 – 65, jul/set. 2006.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 78(4):393-410, jul./ago. 2003.

MARQUES, M. F. **ESTUDO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR Arnica montana L.** 2006. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Araraquara, 2006.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata** Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.

MIRANZI, S. S. C. et al. Qualidade de vida de indivíduos com diabetes mellitus e Hipertensão acompanhados por uma equipe de saúde da Família. **Texto Contexto Enferm**, Floianópolis, v. 17, n. 4, p.672-679, 2008.

MOON, J. A. et al. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm. Drug Dispos**, v. 29, n. 4, p.205-217, maio 2008.

MORAES, R. H. Avaliação do comportamento de flavonas e flavnóis frente à celulose microcristalina em estado **sólido**. 2007. 190 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Materiali da medicazione a base di chitosani. In: Convegno-Scuola Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia Delle Macromolecole. **Polimeri in Medicina**. Gargnano, p. 307-336, 1997.

NATARAJAN, V. et al. Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p.195-205, jan. 2010.

NEIVA, C. F. D. Atenção à saúde de pessoas vivendo com o diabetes mellitus tipo 2 em uma unidade de saúde da família. 2013. 119F. Dissertação (Mestrado) – Gestão da Clínica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

NEVES, J. et al. O pé diabético com infecção aguda: tratamento no Serviço de Urgência em Portugal. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, v. 27, p.19-36, 2013.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2002.

OLIVEIRA, B. G. R. B. et al. Caracterização dos pacientes com úlcera venosa acompanhados no Ambulatório de Reparo de Feridas. **Rev. Eletr. Enf.**, v. 14, n. 1, p.156-163, 2012.

O'MEARA, S., et al. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. **Health Technol. Assess.**, v.4, n.21, p.1-237. 2000.

ORREGO, C. E. E.; VALENCIA, J. S. Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, pp. 197-206, 2009.

OZANSKI, G. D.; ANDRADE, R. D. A. X. In: I CONGRESSO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO CÂMPUS RIO VERDE DO IFGOIANO, 2012, Rio Verde. **Utilização de Quitosana Como Suporte para Liberação Controlada de Fármacos Antiinflamatórios Não-Esteroidais**. Rio Verde: 2012. p. 1 - 3.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an Introduction**. 3. ed. New York: Springer, 2007. 561 p.

PASSOS, L. **Apostila de ciências e tecnologia dos materiais**. Disponível em: <[http://www.fiel.edu.br/edu.br/painel/uploads/08\\_08\\_2007\\_\\_08\\_46\\_15APOSTILA CIEN TEC.pdf](http://www.fiel.edu.br/edu.br/painel/uploads/08_08_2007__08_46_15APOSTILA CIEN TEC.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2012.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; OREFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 4, p.104-109, out./dez. 1999.

PEREIRA, K. R. **Avaliação da Biocompatibilidade "in vitro" e "in vivo" de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2008.

PEREIRA, A. L. A.; VERAS, S. S. L.; SILVEIRA, E. J. D. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.71, n.1, p.81-6, 2005

PEREZ, N. M.; MELCHIADES, F. G.; BOSCHI, A. O. Avaliação Comparativa e Caracterização de Tripolifosfatos de Sódio Comerciais. **Cerâmica Industrial**, v. 14, n. 4, p.1-13, 2009.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p.1995-2018, 1998.

PINTO, A. M. **Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: Lidel, 2007. 546 p.

PONCIANO, J. J. Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. **Bioquímica Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RATNER, B. D., 2004, "Surface properties and surface characterization of materials", In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J.E. (eds), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. 2a edição, Seção 1.4, San Diego, Elsevier.

RINAUDO, M., 2006, "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 603-632.

RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. **Pharm. Technol**, New York, v. 29, n. 6, p.42-50, 2005.

RODRIGUES, L. M. **Desenvolvimento E Estudo De Estabilidade Preliminar De Emulsões Óleo/Água (O/A) A Base De Óleos Vegetais Para Prevenção E/Ou Adjuvante No Tratamento De Úlceras Por Pressão**. 2013. 45F. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) – Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ROGÉRIO, A. P. et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airway allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p.288-297, abr. 2010.

SADER, H. S.; DURAZZO, A. Terapia antimicrobiana nas infecções do pé diabético. **J Vasc Br**, v. 2, n. 1, p.61-66, 2003.

SANCHEZ, F. **Avaliação do Processo de Reparação Tecidual em Úlceras Crônicas utilizando Curativos de Celulose Bacteriana associados ou não à Laserterapia**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2012.

SANTOS, J. B. et al. **Avaliação e tratamento de feridas : orientações aos profissionais de saúde**. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011.

SANTOS, T. C. et al. In vitro evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes. **Journal Of Biotechnology**, v. 132, p.218-236, 2007.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p.29-36, 2003.

SCAMBIA, G. et al. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. **British Journal Of Cancer**, v. 62, n. 6, p.942-946, 1990.

SCHMIDT, M. I. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **The Lancet**, Porto Alegre, v. 4, p.61-74, 2011.

SHI, C. et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **Journal Of Surgical Research**, v. 133, p.185-192, 2006.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas Formas Neutra, Acetato e Cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 11, p.58-64, 2001.

SILVA, E. F. H. **Estimulação Elétrica de Alta Voltagem em Úlceras Crônicas de Membros Inferiores**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba - Faculdade de Ciências da Saúde, Piracicaba, 2009.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p.776-785, ago. 2006.

SILVA, S. S. et al. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p.568-576, 2008.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 31, n. 3, p.125-131, 2010.

SILVA, L. F. C. **DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS LIPÍDICAS CONTENDO QUERCETINA PARA A ADMINISTRAÇÃO PULMONAR VISANDO O TRATAMENTO DE ASMA**. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SILVA, R. C. L. FIGUEIREDO, N. M. A. MEIRELES, I. B. Feridas: fundamentos e atualização em Enfermagem. 3ª ed. São Caetano do Sul: Yendis. 2010.

SIMÕES, V. N. et al. Síntese, Caracterização e Estudo das Propriedades de um Novo Complexo Mononuclear Contendo Quercetina e Íon Ga(III). **Quim. Nova**, v. 36, n. 4, p.495-501, 2013.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p.795-801, 2004.

SOUSA, W. J. B. **Desenvolvimento de Filmes Híbridos de Quitosana/Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

SPIN NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 37, p.155-161, 2008.

SRINIVAS, K. et al. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dehydrate in subcritical water. **Journal Of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p.208-218, set. 2010.

THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. *Veterinary Clinical North Equine Practice*, v.21, p.1-13, 2005.

TORTORA, G. J. GRABOWSKI, S. R. *Corpo Humano: Fundamentos da Anatomia e Fisiologia*. 6ª ed. São Paulo: **Artmed**, 2007.

VICENTINI, F. T. M. C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**. 2009. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p.1311-1326, 2008.

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydr. Polym**, v. 56, n. 1, p.21-26, maio 2004.

WIESE, L. P. L. **AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE Alternanthera tenella Colla**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

YANAGIHARA, K. et al. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. **Cancer Research**, v. 53, n. 23, p.5815-5821, 1993.