

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**BIOMATERIAL DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI:  
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA  
BIOCOMPATIBILIDADE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Jéssica Fernanda Bertolino

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani

GOIÂNIA

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**    ☒ **Dissertação**    ☐ **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: Jéssica Fernanda Bertolino

Título do trabalho: Biomaterial de quitosana, gelatina e óleo de pequi: obtenção, caracterização, avaliação da biocompatibilidade e da atividade antimicrobiana

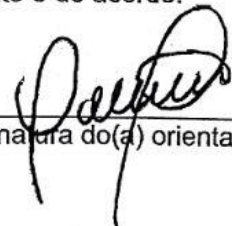
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM**    ☐ **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 18 /03/2018

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

JÉSSICA FERNANDA BERTOLINO

**BIOMATERIAL DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI:  
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA  
BIOCOMPATIBILIDADE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

**Linha de Pesquisa:**

Técnicas e modelos experimentais em clínica, cirurgia e anestesiologia

**Orientador:**

Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani -  
UFG/Jataí

**Comitê de Orientação:**

Profa: Dra. Enéida Franco Vêncio – UFG

Profa: Dra. Carla A. da S. Bitencourt Braga-  
IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Bertolino, Jéssica Fernanda

Biomaterial de quitosana, gelatina e óleo de pequi [manuscrito] : obtenção, caracterização, avaliação da biocompatibilidade e da atividade antimicrobiana / Jéssica Fernanda Bertolino. - 2018.  
xii, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani; co-orientadora Dra. Eneida Franco Vêncio; co-orientador Dr. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui gráfico, lista de figuras.

1. Caryocar brasiliense Camb. 2. Citotoxicidade. 3. MTT. 4. Quitina. I. Vulcani, Valcinir Aloísio Scalla, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO 497 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE  
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 08h30min do dia 01/03/2018, reuniu-se na sala  
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra  
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo  
6 (a) Pós-Graduando (a) **Jéssica Fernanda Bertolino**, intitulada: "*Biomaterial de quitosana,*  
7 *gelatina e óleo de pequi: obtenção, caracterização, avaliação da biocompatibilidade e da*  
8 *atividade antimicrobiana*", apresentado para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal,  
9 junto à Área de Concentração: **Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica**, desta Universidade.  
10 O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani**, iniciando os  
11 trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Jéssica Fernanda Bertolino** para exposição em  
12 **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem  
13 sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo  
14 máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores  
15 Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em  
16 sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou**  
17 **Reprovado (a):**

18 Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani (Orientador (a))

*Aprovada*

19 Profa. Dra. Vanessa de Sousa Cruz

*Aprovada*

20 Prof. Dr. Marco Augusto Machado Silva

*Aprovada*

21 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Jéssica Fernanda**  
22 **Bertolino**, *Habilitada* **[(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))]** pelo(s)  
23 motivo(s) abaixo exposto(s):

24 \_\_\_\_\_  
25 \_\_\_\_\_  
26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_  
33 \_\_\_\_\_

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

42 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani** lavrei a presente ata que,  
43 após lida e achada conforme foi por todos assinada.  
44 Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani  
45 Profa. Dra. Vanessa de Sousa Cruz  
46 Prof. Dr. Marco Augusto Machado Silva

Dedico esse trabalho aos meus pais Luciana e  
Adimilson pelo apoio e constante incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por dar a mim condições e forças para cada dia de estudo, dando-me tranquilidade nos momentos difíceis e esperança em todo o tempo. Pelas conquistas diárias que me foram concebidas até o presente momento e por colocar, em meu caminho, pessoas que de algum modo me inspiraram e me motivaram para eu chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Luciana e Adimilson e ao meu noivo Rodrigo por acreditarem em mim, em todos os momentos. Obrigado por compartilharem comigo os meus sonhos, sempre me incentivando e apoiando!

Agradeço ao meu orientador, prof. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani, pelo tempo dedicado em suas orientações, auxiliando sempre no que foi necessário, pela confiança depositada em mim. Mesmo estando um pouco distante, isso não foi empecilho para que realizássemos um bom trabalho. Obrigada pela oportunidade que me foi ofertada por trabalhar com biomateriais, e por ampliar meus conhecimentos sobre essa área em crescente desenvolvimento. Uma nova etapa nos aguarda em breve!

À professora Carla A. da S. Bitencourt Braga e ao professor Milton Adriano Pelli Oliveira pela oportunidade de desempenhar meus experimentos juntamente com suas equipes, por todas as sugestões, conselhos e ensinamentos, obrigada por toda ajuda!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e a todos os pesquisadores do grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, na Universidade de São Paulo-USP, por terem auxiliado nesta pesquisa.

À Escola de Veterinária e Zootecnia e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que permitiram a realização desse trabalho.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos da pós-graduação e aos que fiz durante essa caminhada, pelo conforto e amizade que tornaram tudo mais fácil. A todos que colaboraram de alguma forma para a conclusão de mais uma etapa.

"O único homem que está isento de erros,  
é aquele que não arrisca acertar."  
(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                                      | 1  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                            | 1  |
| 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE BIOMATERIAIS .....                                                               | 3  |
| 2.1 Técnicas de caracterização físico-química de biomateriais .....                                            | 5  |
| 2.2. Quitosana .....                                                                                           | 6  |
| 2.3. Gelatina .....                                                                                            | 8  |
| 3. PEQUI ( <i>Caryocar brasiliense</i> Camb) .....                                                             | 9  |
| 3.1. Caracterização botânica .....                                                                             | 9  |
| 3.2. Utilidades e aplicações do pequi ( <i>C. brasiliense</i> ) e seus derivados .....                         | 10 |
| 3.3. Perfil nutricional e fitoquímico do pequi.....                                                            | 11 |
| 3.4. Óleo de pequi ( <i>C. brasiliense</i> ): obtenção e composição.....                                       | 11 |
| 3.5. Aplicações populares e experimentais do óleo de pequi .....                                               | 12 |
| 4. TESTES <i>IN VITRO</i> .....                                                                                | 13 |
| 4.1. Cultura celular .....                                                                                     | 14 |
| 4.2. Avaliação da citotoxicidade.....                                                                          | 15 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                               | 20 |
| CAPÍTULO 2 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MEMBRANA DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI.....  | 1  |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                             | 1  |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                     | 3  |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                             | 5  |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                              | 7  |
| 5. CONCLUSÃO.....                                                                                              | 8  |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                               | 9  |
| CAPÍTULO 3 – CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA MEMBRANA DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI..... | 1  |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                             | 1  |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                     | 3  |
| 3.RESULTADOS.....                                                                                              | 7  |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                              | 8  |
| 5. CONCLUSÃO.....                                                                                              | 10 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                               | 10 |
| CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                         | 13 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - Representações das estruturas de quitina e quitosana, sendo “n” o grau de polimerização... ..6
- FIGURA 2 - Fluxograma representativo da produção da quitina em cinco etapas: lavagem, desmineralização, desproteinização, desodorização, despigmentação e secagem. ....7
- FIGURA 3 - Em A, pequizeiro em florescência. Observa-se as características de árvores do cerrado, com tronco e galhos tortuosos. Em B, flores do pequi. Suas flores são hermafroditas, compostas por cinco pétalas esbranquiçadas, livres entre si, com numerosos estames. ....9
- FIGURA 4 - Fruto do pequizeiro, pequi (*Caryocar brasiliense*). Em A, corte transversal permitindo a visualização do mesocarpo externo (ME) e mesocarpo interno (MI). Em B, corte transversal do endocarpo (EN) e semente (SE). .... 10
- FIGURA 5 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais. .... 17
- FIGURA 6 - Avaliação macroscópica do controle negativo realizado com papel de filtro, onde não ocorre a formação do halo (A). E controle positivo realizado com látex, nota-se a presença de diâmetro de 13 mm (B). .... 18

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Fotografia digital das membranas obtidas. Em A, MQG, de aspecto homogêneo e transparente. Em B, C e D, membranas MQGOP1, MQGOP2, MQGOP3, de quitosana, gelatina e óleo de pequi em concentrações crescentes. As três membranas apresentam aspecto homogêneo e coloração amarelada, com intensidade proporcional à concentração do óleo de pequi .....5
- FIGURA 2 - Fotomicrografias das membranas obtidas. Em A e B, MQG, 200X e 1000X. Observa-se aspecto liso e homogêneo. Em C e D, MQGOP1, 200X e 1000X. Observa-se a presença de estruturas vesiculares e filamento com aspecto de cristal. Em E e F, MQGOP2, 200X e 1000X. Observa-se a presença de estruturas vesiculares e o aumento da quantidade de filamentos com aspecto de cristal. Em G e H, MQGOP3, 200X e 1000X. Houve maior aumento da quantidade de filamentos com aspecto de cristal, entre as estruturas vesiculares..... 6

FIGURA 3 – Em A o espectro na região do infravermelho para óleo de pequi, gelatina e quitosana. Em B espectro na região do infravermelho para as membranas MQG (membrana de quitosana e gelatina), MQGOP1(membrana de quitosana, gelatina e 1 mL de óleo de pequi), MQGOP2 (membrana de quitosana, gelatina e 2 mL de óleo de pequi) e MQGOP3 (membrana de quitosana, gelatina e 3 mL de óleo de pequi). .....7

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Gráfico representativo da viabilidade celular das células L929 em diferentes grupos e em dois momentos (24 e 48 horas). Sendo MQG a membrana de quitosana e gelatina, MGOP1 Membrana de quitosana + 1,0 mL de óleo de pequi, MQPO2 Membrana de quitosana + 2,0 mL de óleo de pequi e MQGOP3 Membrana de quitosana + 3,0 mL de óleo de pequi..... 7

FIGURA 2 - Placa de Petri com cultura bacteriana de *S. aureus* representando o teste de difusão em disco em triplicata. Pode-se observar a não formação de halo.....8

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1

QUADRO 1 - Classificação morfológica qualitativa de células submetidas ao teste de citotoxicidade de extratos, segundo a Norma ISO 10993 ..... 16

QUADRO 2 - Graus de reatividade para ágar e teste de difusão de filtro e teste de contato direto em avaliações de citotoxicidade, segundo as Normas ISO 10993..... .... 19

### CAPÍTULO 2

QUADRO 1 - Composições das soluções preparadas sem e com o óleo de pequi com suas respectivas membranas.....4

### CAPÍTULO 3

QUADRO 1 - Grupos do experimento realizado em cultura celular.....5

## RESUMO

Nas últimas décadas houve aumento nas pesquisas para criação de materiais biocompatíveis que possam substituir parte ou função de organismos vivos, de maneira prática e de baixo custo, sem causar injúrias teciduais. O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de membrana constituída por quitosana, óleo de pequi e gelatina, visando a possível utilização para auxiliar na regeneração tecidual. Para isto, foram obtidas misturas dos componentes em proporções que mantivessem o material homogêneo e não fragmentado. Para a caracterização, utilizou-se análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, testes de citotoxicidade e atividade bactericida/bacteriostática e fungicida/fungistática das membranas. Observou-se que a membrana apresentou características compatíveis para emprego em tecidos moles e que não houve interação química entre os componentes. A presença do óleo de pequi não interferiu na citotoxicidade do biomaterial. Os testes com microrganismos revelaram que não houve morte e nem redução da proliferação de micro-organismos. Concluiu-se que a mistura dos componentes permite a obtenção de um material no formato de membrana, no entanto são necessárias novas investigações para compreender os mecanismos envolvidos na citotoxicidade apresentada, bem como o comportamento frente aos micro-organismos na presença de enzimas que degradem o material, simulando condições do fluido orgânico animal.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb, citotoxicidade, MTT, quitina

## ABSTRACT

Recent researches in bioscience have been focusing in the development of biocompatible materials to replace parts or function of living organisms. Moreover, versatility, low cost and minimally tissue reactivity are some of the major interest in biomaterial research. Several synthetic and natural resources have been developed. Biomaterial components' features and particularities must be thoroughly assessed to assure standardization and quality of the final product. The purpose of this research was to develop and assess physicochemical and biological features of a chitosan, pequi oil and gelatine based membrane for use in tissue regeneration. Components were mixed in a proportion that kept homogeneity and integrity of the membrane. Membrane's thermal analysis, scanning electron microscopy, cytotoxicity and bactericidal/bacteriostatic and fungicidal/fungi-static features were evaluated. It was observed that the membrane presented compatible characteristics to be used in soft tissues and that there was no interaction between the components. The presence of pequi oil did not interfere in the biomaterial cytotoxicity. Tests with microorganisms revealed that there was no death or reduction of microorganism proliferation. It was concluded that the mixture of the components allows to obtain a material in the membrane format, however, new investigations are necessary to understand the mechanisms involved in the presented cytotoxicity, as well as the behavior towards the microorganisms in the presence of enzymes that degrade the material, simulating conditions of the animal organic fluid.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb, chitin, cytotoxicity, MTT.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são substâncias ou conjunto de substâncias naturais ou sintéticas, idealizadas para substituir matéria viva que deixou de ter função e que sejam biocompatíveis, reprodutíveis, acessíveis e biodegradáveis em situações específicas<sup>1</sup>.

Para que um novo material possa ser incluso na área biomédica, são necessários conhecimentos básicos sobre a ciência que estuda os biomateriais, bem como as técnicas de caracterização físico-química. De forma complementar, é preciso compreender a interação do biomaterial com células e organismos vivos, bem como estabelecer a biocompatibilidade e possíveis aplicações práticas na rotina clínica e cirúrgica.

Dentre os biomateriais amplamente estudados, destaca-se a quitosana, um bipolímero obtido a partir da quitina encontrada em grande quantidade, principalmente, em carapaças de crustáceos, insetos, moluscos e na parede celular de fungos. Têm sido descritas características importantes como bioatividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade<sup>2</sup>. A sua utilização tem gerado interesse por parte dos pesquisadores, devido às suas possibilidades de modificações físicas e químicas que vem promovendo novas atividades para fins específicos.

Alguns autores relataram que biomateriais à base de quitosana tiveram utilizações sugeridas como molde de enxerto de pele, agente cicatrizador, material para sutura, agente antimicrobiano, géis, cápsulas e soluções<sup>3</sup>. Os biomateriais produzidos a partir de quitosana têm sido vistos como aceleradores de reparação tecidual e que apresentam a capacidade de aumentar a produção da matriz extracelular<sup>4</sup>.

O pequi é um fruto obtido do pequizeiro, árvore frutífera da família Caryocaraceae, do gênero *Caryocar*, onde se destaca a subespécie *Caryocar brasiliense* Camb<sup>5</sup>. É uma espécie que apresenta alto interesse econômico devido ao uso dos frutos na culinária e na extração de óleos para fabricação de produtos cosméticos<sup>6</sup>.

Existem dados da medicina popular das diversas propriedades atribuídas ao pequizeiro e seus frutos, como infusões diuréticas e antifebris, utilização do óleo do fruto para o tratamento de queimadura, dentre outros<sup>7</sup>. Em relação à cicatrização, há muitos relatos populares, porém, poucos estudos científicos sobre o tema. Alguns autores observaram reação inflamatória com menor intensidade e fechamento mais rápido de lesões quando utilizaram o óleo de pequi em feridas cutâneas em ratos<sup>8</sup>.

O potencial cicatrizante e a característica oleosa do pequi é um fator interessante e decisivo para sua utilização no desenvolvimento de biomaterial, além de se tratar de um produto amplamente consumido no Estado de Goiás, de fácil obtenção e que pode ser incluído no mercado biomédico.

Dessa forma, a associação de quitosana com óleo de pequi apresenta interesse para a produção de membranas que possam ser empregadas na reparação de tecidos vivos. Em função das propriedades físico-químicas dos dois componentes, o emprego de um terceiro material como a gelatina é eficiente para estabilizar a membrana e não haver fragmentação.

Portanto, o objetivo desta pesquisa científica é a obtenção, caracterização, avaliação da citotoxicidade e efeito antimicrobiano *in vitro* de um biomaterial a base de quitosana, gelatina e óleo de pequi.

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE BIOMATERIAIS

Biomateriais são substâncias ou combinações de substâncias sintéticas ou naturais, projetados para substituírem parte ou função orgânica de forma segura, econômica e aceitável fisiologicamente, agindo em contato direto com tecidos vivos e com sistemas biológicos<sup>1,9</sup>. Podem ser de uso temporário ou definitivo, os quais visam tratar ou substituir, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo<sup>10</sup>.

O uso de biomateriais não é recente e sua aplicação na correção dos mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana remonta à antiguidade<sup>11</sup>. Há registro, por exemplo, do uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 A.C.), de intestino de gatos, na Europa, durante a Idade Média, de dentes artificiais feitos de conchas pelos Maias (600 A.C.), de ferro pelos franceses (200 A.C.) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas. Substitutos ósseos feitos de madeira também foram encontrados no Antigo Egito e na Europa, na Idade Média, tendo sido observada eficiente osseointegração<sup>12</sup>.

O mercado global de biomateriais tem apresentado expressiva expansão nas últimas décadas. Em 2008, houve movimentação de US\$ 25.6 bilhões, sendo 43% nos USA, 33% na Europa, 3% na Ásia (Pacífico), 2% no Brasil e 19% no restante do mundo<sup>13</sup>. Em 2012, este mercado atingiu US\$ 44 bilhões e, em 2017, previu-se 88,4 bilhões de dólares com taxa de crescimento de 22,1% ao ano<sup>14</sup>.

Biomateriais de origem natural representam uma classe importante, pois são amplamente pesquisados, principalmente, em virtude de serem de fontes renováveis. Os principais representantes são colágeno, polissacarídeos, seda, elastina, queratina, tecidos naturais como o pericárdio bovino, dentre outros. Polímeros sintéticos, cerâmicas, metais e ligas metálicas são exemplos de biomateriais de origem sintética<sup>15-17</sup>.

Para que um material seja definido como biocompatível, não deve apresentar respostas prejudiciais ao meio biológico. Portanto, deve ser atóxico, não desenvolver mutagenicidade, alergenidade nem carcinogenicidade<sup>18</sup>. Além disso, deve apresentar também biofuncionalidade, oferecendo interação tecido-biomaterial de acordo com a situação organo-específica e com o local de aplicação<sup>17,19</sup>.

A resposta a um biomaterial no organismo é dependente do sítio de aplicação, pois a biocompatibilidade não está relacionada somente às características do material utilizado, mas também com o emprego destinado ao material fabricado<sup>20</sup>.

Os materiais bioabsorvíveis podem ser lentamente decompostos pelo organismo e gradualmente substituídos. Os materiais biotolerantes são aceitos pelo organismo, porém,

normalmente, são isolados dos tecidos adjacentes pela formação de tecido fibroso. Como exemplo de materiais biotolerantes podem ser citados alguns metais e polímeros sintéticos. Os materiais bioativos ficam em contato direto com tecidos vivos pela presença de íons no biomaterial, que estabelecem união entre os tecidos e o material implantado, estimulando o crescimento celular. Exemplos de materiais bioativos são hidroxiapatita, compostos de fosfato de cálcio e vidros bioativos<sup>21-23</sup>.

Alguns autores classificam os biomateriais em quatro diferentes classes de acordo com a sua composição: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos<sup>12,24</sup>. A maioria dos metais apresentam ótima resistência mecânica, boa capacidade de deformação, facilidade de fabricação e baixo custo de produção, além de possibilitarem esterilização e serem bem tolerados pelo organismo. Devido a essas características, os metais são muito utilizados na fabricação de próteses e elementos para estabilização de fraturas ósseas, como por exemplo, placas e parafusos<sup>25</sup>. O cobalto, cromo, aço inoxidável e ligas de titânio apesar de serem os biomateriais mais utilizados na área biomédica, ainda apresentam possibilidade de toxicidade e corrosão<sup>26,27</sup>.

As cerâmicas possuem grande diversidade de composição e aplicações biomédicas. São utilizadas na fabricação de termômetros, fibras para endoscopia, próteses ortopédicas, reconstruções odontológicas, entre outros. Nesta categoria também estão inclusos os vidros e os vitro-cerâmicas<sup>28,29</sup>.

Polímeros são macromoléculas com alta massa molar, formados por ligações de unidades repetitivas menores ao longo da cadeia principal<sup>30</sup>. Possuem pequena tenacidade à temperatura, baixa condutividade térmica e elétrica e baixa densidade, além de um amplo grupo com caráter macromolecular. Os polímeros são classificados, de acordo com sua origem, em naturais e sintéticos e sua principal característica é a biodegradabilidade<sup>31</sup>.

O primeiro grupo é oriundo de organismos vivos, porém podem ser modificados quimicamente. São representados pela celulose, quitosana, colágeno, entre outros. Além de serem biocompatíveis e biofuncionais, os polímeros naturais também apresentam capacidade de desaparecer após a inserção no organismo, classificando-o como biodegradável<sup>32,33</sup>.

Os polímeros sintéticos são obtidos a partir de reações de polimerização, os mais conhecidos em aplicações biomédicas são polimetilmetacrilato, polietileno e poliuretano<sup>33</sup>. Estes biomateriais permitem a reprodutibilidade, já que possuem composição química bem definida<sup>34</sup>.

Os polímeros podem ser utilizados para substituição de tecidos moles ou rígidos, pois apresentam diferentes ações conforme o tempo e a temperatura de exposição. A variação

na organização da sua estrutura molecular propicia a obtenção de diversos comportamentos para aplicações específicas<sup>33</sup>.

Compósitos são biomateriais formados pela fusão de dois ou mais materiais, uma fase dispersa (componente modificador ou de reforço) e uma fase contínua (matriz). Estas fases são separadas por interfaces que podem incorporar propriedades combinadas dos constituintes individuais, tendo em vista a produção de um biomaterial com propriedades aperfeiçoadas que possa corrigir possíveis restrições dos seus componentes quando utilizados separadamente<sup>26,35,36</sup>.

Para a aplicação de um biomaterial em um tecido vivo é necessário que se saiba as particularidades do material, a reação gerada quando em contato ao tecido hospedeiro e as consequências do uso a curto e longo período. Por isto, a avaliação do biomaterial *in vitro* é uma etapa fundamental antes da aplicação deste *in vivo*. A seleção dos testes é feita segundo os requisitos das normativas sobre o assunto, como por exemplo, a ISO 10993-1<sup>37</sup>.

## **2.1. Técnicas de caracterização físico-química de biomateriais**

Uma das abordagens da caracterização de biomateriais é a observação das características morfológicas e a visualização de estruturas da composição microscópica, por microscopia eletrônica. Podem ser utilizadas a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV revela características morfológicas pela emissão e interação de feixes de elétrons sobre o material. Os elétrons refletidos são detectados em anteparo do equipamento, geram sinal transformado em imagem formada ponto a ponto. Desta forma, são obtidas imagens da superfície do material, permitindo o reconhecimento de elementos da composição ultra estrutural<sup>38,39</sup>.

Outra maneira de caracterizar os materiais é estudar sua composição estrutural molecular. Isto pode ser realizado, dentre outras técnicas, pela espectroscopia na região do infravermelho, que permite identificar grupos químicos funcionais pela comparação dos modos vibracionais das moléculas de uma substância, relacionadas principalmente a um determinado tipo de ligação ou grupo funcional do material em estudo, tendo como resultados bandas do espectro que são específicas de cada substância. As bandas do espectro infravermelho são representadas em número de onda ( $\nu$ ). De forma prática, além de ser possível estudar a composição química dos materiais, pode-se analisar as interações entre materiais ou desses com tecidos biológicos<sup>40,41</sup>.

Diversos biomateriais são estudados e caracterizados por análises térmicas, com submissão de amostras a temperaturas controladas para verificação do comportamento e

modificação estrutural. Destaca-se a análise termogravimétrica (TGA), cuja finalidade é aferir, por meio de termobalança, oscilações na massa do material quando submetida a variação constante de temperatura, sob controle atmosférico. É empregada para verificar a estabilidade e possíveis modificações estruturais a diferentes temperaturas<sup>40,42</sup>.

## 2.2. Quitosana

A quitosana (Figura 1) é um polissacarídeo de cadeia linear, composto de unidades de D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) e N-acetil-D-glicosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose), unidas por ligações beta (1-4), na qual ocorre predominância das unidades de D-glicosamina de pelo menos 50-60%. É adquirido pela desacetilação parcial da quitina, considerada o segundo polímero mais abundante no meio-ambiente, e possui diferentes aplicações na área química, farmacêutica, médica, entre outras. Esse polímero pode variar de acordo com o grau de desacetilação, viscosidade, pKa, peso molecular, dentro outros fatores<sup>43-45</sup>.

A quitina (Figura 1) é um biopolímero, também formado por unidades monoméricas de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, sendo a primeira a mais predominante, um dos fatores que a diferencia da quitosana<sup>46,47</sup>. É encontrada, principalmente, no exoesqueleto de crustáceos, como caranguejos, camarões e lagostas, na parede celular de fungos e também em outros organismos vivos como algas, moluscos, dentre outros<sup>48-50</sup>.

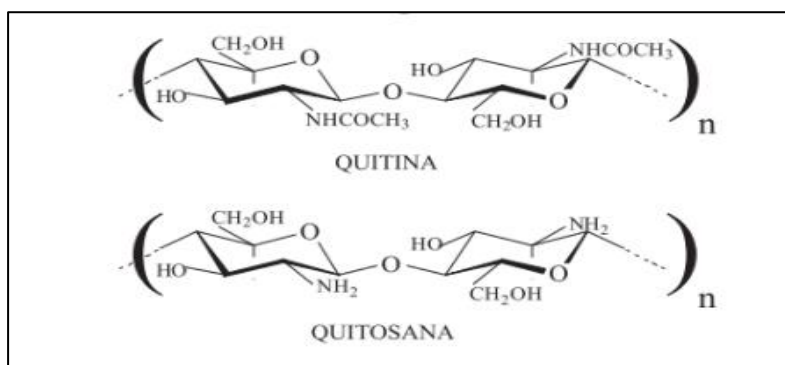


FIGURA 1 - Representações das estruturas de quitina e quitosana, sendo “n” o grau de polimerização.

Fonte: Batisti e Campana Filho<sup>51</sup>

A obtenção da quitina é feita por meio do exoesqueleto de crustáceos é realizada em cinco etapas<sup>52</sup>: lavagem, desmineralização por meio de uma solução ácida, desproteinização com solução alcalina, desodorização, despigmentação e secagem (Figura 2). São realizadas, entre etapas, lavagens para retirada dos reagentes utilizados.

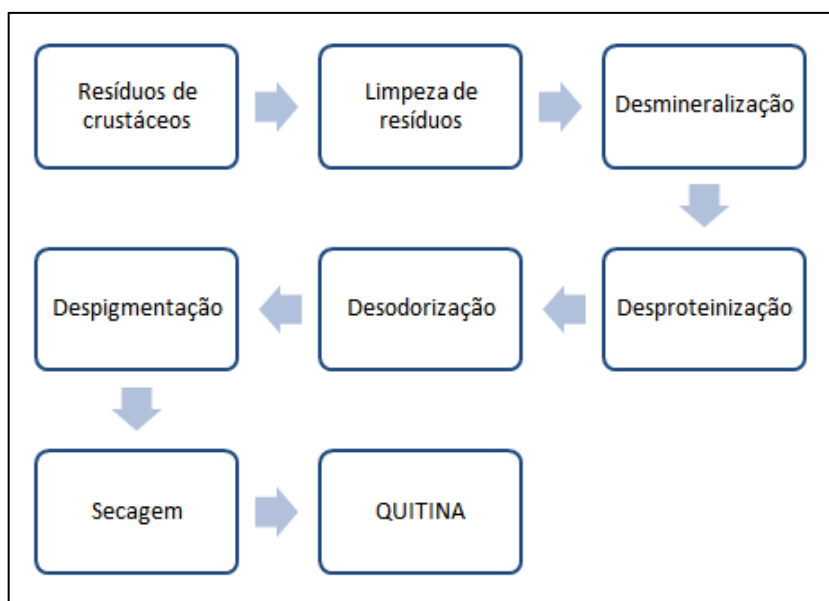


FIGURA 2 - Fluxograma representativo da produção da quitina em cinco etapas: lavagem, desmineralização, desproteínização, desodorização, despigmentação e secagem. Fonte: Adaptado de Soares<sup>52</sup>.

A quitina apresenta alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, possibilidade de estimular a cicatrização de tecidos e alguns autores citam a sua atividade antimicrobiana<sup>53-55</sup>. É considerada biodegradável por ser metabolizada por determinadas enzimas presentes no organismo, como a lisozima<sup>47</sup>. Então, membranas compostas por quitosana podem ser absorvidas pelo organismo durante a cicatrização tecidual, desde que submetida previamente a desacetilação adequada<sup>56</sup>.

O efeito antimicrobiano da quitina e da quitosana vem sendo estudado contra ampla gama de bactérias, leveduras e fungos. Este efeito pode ser influenciado pelo grau de acetilação, distribuição de cargas ao longo da cadeia, o tipo de quitosana, massa molar e pH<sup>57,58</sup>.

Rabea e seus colaboradores<sup>59</sup>, em 2003, apresentaram resultados favoráveis em estudos da atividade antimicrobiana da quitosana, com inibição significativa do crescimento de fungos, leveduras e bactérias.

Assim como a quitina, a quitosana também é renovável, de fácil obtenção e relativamente barato, quando comparadas a outros biomateriais<sup>60</sup>. Porém, a quitina possui baixas opções de aplicações devido às fortes interações entre hidrogênios intramoleculares, dificultando as modificações em sua estrutura química e tornando-a insolúvel na maioria dos solventes testados. De maneira contrária, a quitosana é solúvel em diluições aquosas de ácidos inorgânicos e orgânicos<sup>61</sup>.

A quitosana, assim como outros derivados da quitina, tem despertado interesse dos pesquisadores por apresentar diversas aplicações, sobretudo por poder ser moldado em diferentes formas físicas, como nanopartículas, microesferas, membranas, géis, soluções, filmes, entre outros, além de permitir modificações na estrutura química<sup>62,63</sup>.

A quitosana pode ser utilizada como base na produção de biomateriais para enxerto de pele, bioadesivos, suturas, bandagens, lentes de contato, agente cicatrizador, purificação das águas residuárias, prolongamento do tempo de prateleira dos alimentos, dentre outras aplicações<sup>62</sup>. O método mais utilizado no processo industrial, com utilização de reator específico, é a desacetilação por tratamento alcalino, utilizando-se frequentemente solução de hidróxido de sódio (40-60%), seguido de aquecimento (50-130°C) por tempo variável (0,5-24h)<sup>64,65</sup>. É o método mais estável, porém não se consegue quitosana totalmente desacetilada, cujo grau de desacetilação é dependente da temperatura de reação, do tempo e da concentração de hidróxido de sódio usada, do tamanho das partículas de quitina, entre outros fatores.

### 2.3. Gelatina

A gelatina é composta por proteína de alta massa molar, solúvel, classificada como biopolímero bioabsorvível, rica em prolina, glicina e 4-hidroxiprolina<sup>66</sup>. É composta por grandes cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que podem variar em composição e na sequência dos aminoácidos das cadeias<sup>67</sup>. É adquirida por hidrólise controlada (65 a 68°C) parcial via alcalina ou ácida do colágeno e, por isso, também é chamada de colágeno hidrolisado<sup>68</sup>.

Possui baixo custo de produção, é produzida em grande quantidade, apresenta capacidade de formar gel termorreversível e filmes flexíveis, propiciando utilização na indústria de fármacos, cosméticos e alimentícia<sup>69,70</sup>.

A transformação de colágeno em gelatina abrange três modificações: a ruptura de número limitado de peptídeos, o desarranjo ou ruptura das ligações entre as cadeias laterais e modificação na conformação da cadeia, constituindo mudança essencial para conversão do colágeno em gelatina<sup>71</sup>.

A preparação da gelatina a partir do colágeno é realizada industrialmente e em cinco etapas: lavagem, extração, purificação, concentração e secagem. O tipo do método escolhido para o tratamento, ácido ou alcalino, irá classificar a gelatina em tipo A ou B. A gelatina tipo A é produzida pelo tratamento em meio ácido, que acontece antes da desnaturação térmica. A do tipo B é obtida pela utilização do processamento alcalino<sup>72,73</sup>. Os

tipos de gelatina também diferem entre si pela capacidade de combinar com hidrocoloides carregados negativamente e pela sua viscosidade<sup>70,74</sup>.

Pele suína, ossos e couro bovino são as matérias-primas mais utilizadas para a produção de gelatina. O processo ácido normalmente é utilizado para tratamento da pele suína enquanto o método alcalino é utilizado para tratamento do couro bovino<sup>75,76</sup>.

### 3. PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb)

#### 3.1. Caracterização botânica

O pequi (Figura 3), pertence à família Caryocaraceae, e se subdivide nos gêneros *Caryocar* L. e *Anthodiscus* G. Mey e em 25 espécies. Dez espécies pertencem ao gênero *Caryocar* e são encontradas no território brasileiro. Especificamente no cerrado são encontradas três espécies: *Caryocar brasiliense* Camb, *Caryocar coriaceum* Wittm e *Caryocar cuneatum* Wittm<sup>77,78</sup>.

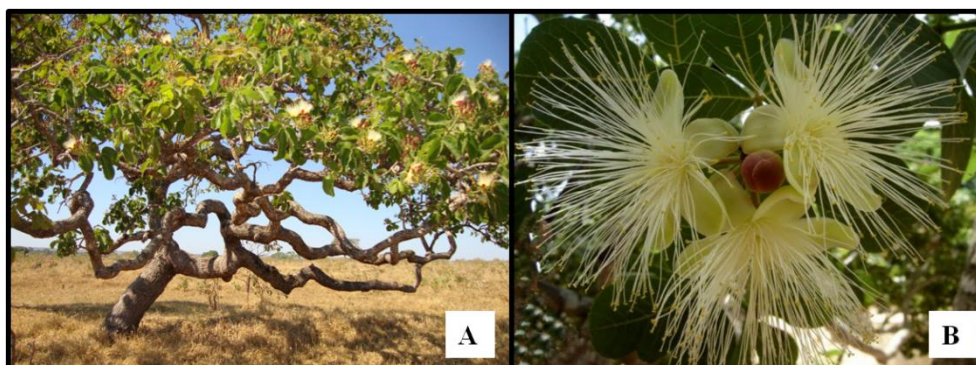


FIGURA 3 - Em A, pequi em florescência. Observa-se as características de árvores do cerrado, com tronco e galhos tortuosos. Em B, flores do pequi. Suas flores são hermafroditas, compostas por cinco pétalas esbranquiçadas, livres entre si, com numerosos estames. Fonte: <http://www.caliandradocerrado.com.br/>

Apesar da maior parte da família Caryocaraceae ser originária da região amazônica, a espécie *Caryocar brasiliense* Camb é a mais incidente na região central do Brasil, sendo característica da vegetação do cerrado<sup>8</sup>. Dentre as espécies nativas do cerrado, em Goiás, o pequi predomina sobre as outras espécies, tanto em área de ocorrência como em frequência<sup>78</sup>.

O fruto do pequi, o pequi, tem sua nomenclatura originada do tupi “pyqui”, na qual “py” significa casca ou pele e “qui” espinho, fazendo referência aos espinhos encontrados no endocarpo do fruto. É popularmente conhecido como pequiá, piqui, pequi,

amêndoa de espinho, amêndoa do Brasil ou grão de cavalo, conforme o local de sua ocorrência<sup>79</sup>.

Caracteriza-se por ser uma dupla de conformação depresso-globosa, possui cerca de seis a sete centímetros de diâmetro, podendo ultrapassar dez centímetros e possui de um a seis pirênios por frutos<sup>80</sup>.

É constituído por expocarpo ou epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo é a parte externa do fruto de coloração esverdeada a levemente amarelada quando o fruto está maduro, possui aspecto coriáceo. A região intermediária é chamada de mesocarpo, possui coloração amarelo claro e é dividida em duas regiões, mesocarpo externo e mesocarpo interno. O mesocarpo interno é a porção comestível do fruto que possui coloração amarelada, podendo apresentar cor laranja, rósea ou esbranquiçada, é pastosa e oleaginosa. O endocarpo é recoberto com alta densidade de espinhos delgados, rígidos, de 2 a 5 mm de comprimento e de coloração avermelhada, característica do gênero, que protege a amêndoa ou a semente, que também é comestível (Figura 4)<sup>80,81</sup>.

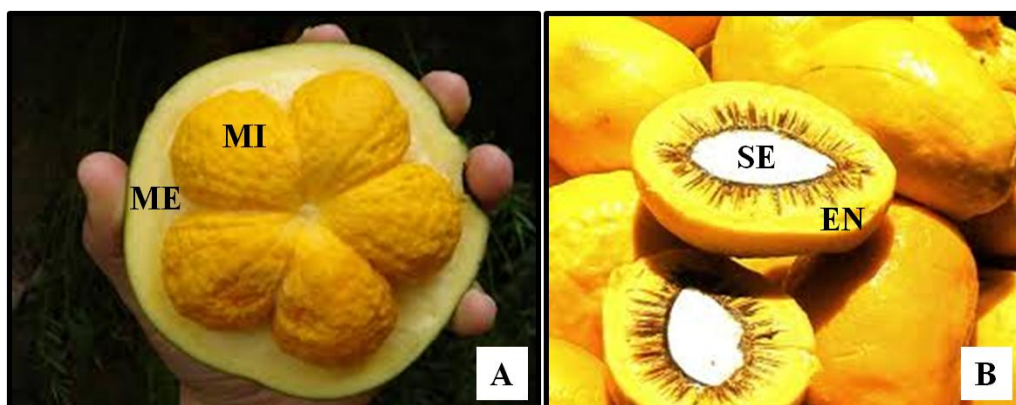


FIGURA 4 - Fruto do pequizeiro, pequi (*Caryocar brasiliense*). Em A, corte transversal permitindo a visualização do mesocarpo externo (ME) e mesocarpo interno (MI). Em B, corte transversal do endocarpo (EN) e semente (SE). Fonte: <http://www.caliandradocerrado.com.br/>

### 3.2. Utilidades e aplicações do pequi (*C. brasiliense*) e seus derivados

O pequi possui forte potencial para a exploração sustentada, gerando renda para comunidades locais. A polpa é, tradicionalmente, consumida cozida. A amêndoa é utilizada como ingrediente de doces, paçocas e farofas e é consumida também salgada, como petisco<sup>79,82</sup>. Ainda é explorado de forma artesanal e muito pouco industrializado, sendo a extração do óleo dos frutos o principal modo de processamento. Em algumas regiões tem se destacado, também, a produção de conserva e a fabricação do licor de pequi<sup>83</sup> para finalidades culinárias. A extração de óleos da polpa e da amêndoa do fruto possui também grande

importância na indústria cosmética, para produção de saponáceos e cremes, bem como na medicina popular<sup>82,84</sup>.

Popularmente, as folhas, cascas dos frutos e do pequizeiro são utilizados como diuréticos, em infusões antifebris, no tratamento de edemas, resfriados, gripes e doenças respiratórias em geral. Existem relatos do uso do óleo do pequi no tratamento de úlceras gástricas, queimaduras, reumatismo e dores musculares<sup>85,86</sup>.

### **3.3. Perfil nutricional e fitoquímico do pequi (*C. brasiliense*)**

Alguns estudos foram realizados para avaliar e determinar a composição do pequi. Os resultados revelaram variações em função do clima, solo da região, altitude e área de cultivo<sup>78,87</sup>.

A polpa do fruto do pequizeiro é a parte mais utilizada do fruto, possui alto valor energético, aproximadamente, 358 calorias a cada 100 gramas e é uma fonte importante de fibra alimentar, lipídios e proteínas<sup>88</sup>. Encontra-se também vitaminas A, B1, B2, B3 e C<sup>89,90</sup>.

Dentre os lipídios presentes na polpa, 61,35% são de ácidos graxos insaturados e 37,97% são de ácidos graxos saturados. Predominam os ácidos oleico, palmítico, com aproximadamente 55,87% e 35,17%, respectivamente, semelhantes aos teores encontrados na amêndoa. Encontram-se, também, no pequi, os ácidos palmitoleico, esteriárico, linoleico e outros ácidos graxos em menores quantidades<sup>88</sup>.

A polpa do pequi e a amêndoa também são fontes consideráveis de magnésio, zinco, cobre, fósforo, cálcio, ferro, manganês, potássio, sódio e fonte potencial de vitamina C<sup>86,91</sup>. A elevada proporção de lipídios que compõem esse fruto e a alta incidência de radiação solar favorecem a geração de radicais livres e a lipoperoxidação. Desta forma, o pequi necessita de meios para interromper a degradação dos lipídios presentes no fruto. Compostos secundários presentes na planta, como os carotenoides, compostos fenólicos e vitamina E, possuem propriedades antioxidantes que apresentam papel importante na prevenção do estresse oxidativo no pequizeiro o que evita a formação de radicais livres<sup>92,93</sup>. Entende-se que estes compostos antioxidantes possuem importância na prevenção e tratamento do estresse oxidativo<sup>94,95</sup>.

### **3.4. Óleo de pequi (*C. brasiliense*): obtenção e composição**

A extração do óleo pode ser feita de modo artesanal, com a utilização de água aquecida. Inicia-se com a retirada da casca dos frutos e coloca-se sob cozimento por cerca de 40 minutos. Após o cozimento, os frutos são resfriados e refrigerados para posterior

maceração. O processo de maceração frequentemente é realizado nas horas do dia em que a temperatura não é muito alta, para facilitar a coagulação da gordura. Em seguida, a gordura é separada e levada a novo cozimento para retirada da água. Dessa forma, com o derretimento da gordura, obtém-se o óleo que é envasado em garrafas<sup>96</sup>.

A extração artesanal por maceração é realizada, normalmente, por pequenos produtores e possui baixo rendimento. No entanto, em pequenos processos industriais, realiza-se a extração por solventes como o hexano, o etanol e o isopropanol. O processo envolve a maceração inicial dos frutos e posterior contato com o solvente em equipamentos específicos, sob agitação<sup>96,97</sup>.

Mais recentemente, novas formas de extração tem sido pesquisadas, com o uso da associação de solventes com fluídos supercríticos, enzimas e membranas com diversos tipos de pré-tratamento como micro-ondas, ultrassom e pulsos elétricos<sup>96</sup>.

### 3.5. Aplicações populares e experimentais do óleo de pequi

Diversas comunidades do bioma cerrado brasileiro têm relatado o uso do óleo de pequi como tonificante, expectorante, no tratamento de bronquites, gripes, resfriados, úlceras gástricas, edemas e queimaduras<sup>77</sup>.

Em estudos experimentais, os óleos essenciais das amêndoas apresentaram atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* em testes *in vitro*<sup>102</sup> por terem muitos compostos com propriedades antioxidantes<sup>98</sup>.

Mais recentemente, em estudo sobre a ação antimicrobiana do óleo de pequi em preparação de sabonetes, utilizando-se de determinação da concentração inibitória mínima, demonstrou-se atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. Além disso, foi relatada atividade moderada para os fungos *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*<sup>99</sup>.

Além da atividade antimicrobiana, outros trabalhos relataram ação anti-inflamatória do óleo de pequi. A aplicação tópica de óleo da amêndoa de *C. coriaceum* foi capaz de reduzir a inflamação em edema agudo de orelha e acelerou o reparo de feridas cutâneas de ratos de maneira dose-dependente<sup>86</sup>.

Batista e seus colaboradores<sup>8</sup>, utilizaram óleo de pequi em feridas cutâneas em ratos e concluíram que o processo inflamatório foi atenuado e o cicatricial otimizado em relação ao grupo controle. Diniz<sup>100</sup> utilizou microemulsões contendo óleo de pequi em lesões na pata de camundongos e verificou atividade anti-inflamatória satisfatória. Outros

pesquisadores relataram efeito positivo como anti-inflamatório e gastroprotetor em lesões gástricas induzidas experimentalmente em ratos<sup>101</sup>.

Em trabalho experimental com ratos, incorporou-se o óleo de pequi em membranas de colágeno e gelatina. A presença do óleo atenuou o processo inflamatório, recrutou maior quantidade de fibroblastos e consequentemente estimulou maior produção de colágeno em relação às membranas sem óleo de pequi<sup>102</sup>.

#### 4. TESTES *IN VITRO*

Testes *in vitro* são cruciais para o desenvolvimento e validação de novos biomateriais, sobretudo por avaliarem estímulos potencialmente geradores de reação biológica<sup>103</sup>. Ressalte-se que esses testes não substituem os testes *in vivo*. Porém, estudos do comportamento celular *in vitro* são essenciais para obtenção do uso coerente e seguro na prática médica e fazem com que ocorra considerável diminuição do número de animais utilizados em pesquisas, principalmente segundo rigorosa regulamentação de utilização de animais em laboratório<sup>103, 104</sup>.

A partir dessa necessidade, foi criado um guia para avaliação de testes iniciais de biocompatibilidade para a seleção apropriada das avaliações iniciais para cada material e seu tempo de contato, a Norma ISO 10993<sup>37</sup>. Para reduzir as necessidades de avaliações *in vivo*, o Comitê Europeu para padronização (CEN) também recomenda a standardização da utilização de métodos *in vitro*<sup>105</sup>.

Segundo a *International Organization for Standardization* (ISO)<sup>37</sup>, os testes de citotoxicidade *in vitro* devem ser os primeiros a avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso biomédico e verificar aqueles que são citotóxicos. Materiais citotóxicos geralmente não requerem avaliação *in vivo*<sup>106,107</sup>.

Ensaio *in vitro* são utilizados para seleção inicial e para a avaliação da biocompatibilidade do material. O teste de citotoxicidade avalia o efeito tóxico do material em nível celular, tais como alterações da permeabilidade da membrana, inibições enzimáticas e até morte celular. A citotoxicidade representa fator adverso à resposta adequada do hospedeiro, isto é, a não compatibilidade do material testado<sup>108,109</sup>. Além da avaliação da citotoxicidade, nos testes *in vitro* é possível notar crescimento celular diretamente sobre os biomateriais e avaliar características e mecanismos de permeação e adesão celular<sup>104</sup>.

Além de serem reprodutíveis, os testes *in vitro* proporcionam maior facilidade de execução quanto à avaliação clínica, são executados em menor tempo, são sensíveis e de fácil

acesso financeiramente. Porém, deve-se analisar a fidelidade e representatividade do teste diante das condições em que o biomaterial deve ser empregado<sup>109,110</sup>.

Normas e compêndios indicam testes *in vitro* em culturas celulares para a avaliação de biocompatibilidade. As culturas celulares em monocamadas ou bidimensionais constituem método eficaz para avaliação da citotoxicidade de biomateriais<sup>111</sup>.

A viabilidade celular pode ser analisada mediante aplicação de distintos métodos, como a inibição da formação de colônias celulares e principalmente pela incorporação de corantes vitais<sup>112</sup>. O corante vermelho neutro, por exemplo, é solúvel em água, passa pela membrana celular e acumula-se nos lisossomos. Quando o material a ser testado danifica as membranas celulares resulta em decréscimo de captura e ligação desse corante e então, a medida de intensidade de cor da cultura celular permite diferenciar células vivas e danificadas de células mortas<sup>113,114</sup>.

A linhagem de fibroblasto de camundongo (L929) são as mais recomendadas para utilização em testes de citotoxicidade de biomateriais, pois é de fácil cultivo e fornece resultados que apresentam alta correlação com fibroblastos provenientes de tecidos biológicos<sup>106</sup>.

#### **4.1. Cultura celular**

Quando iniciaram os experimentos com cultivo celular, os meios de cultura eram extraídos de linfa e coágulos de plasma, o que restringia os estudos, pois a composição dos meios era muito variável. Esta limitação ocasionou o interesse em desenvolver meios de cultura quimicamente definidos, os quais permitissem reconhecer os componentes dos meios de cultura que eram imprescindíveis para a sobrevivência e o crescimento de cada tipo celular<sup>115</sup>.

O primeiro meio quimicamente estabelecido foi criado somente na década de 1950, composto por aminoácidos, vitaminas, carboidratos, fatores séricos e sais. Nesta época pesquisadores acreditavam que o soro era fundamental para disponibilizar algum nutriente. Mais tarde, descobriram que a função do soro era fornecer fatores de crescimento e não apenas nutrientes<sup>115</sup>.

As linhagens celulares utilizadas em testes *in vitro* podem ser linhagens celulares permanentes ou culturas primárias, como os fibroblastos da pele. Essas células são obtidas de determinadas linhagens e fornecidas por bancos celulares ou de tecidos<sup>116,117</sup>.

Para a realização de testes *in vitro* são necessários três componentes, o sistema biológico, o contato da célula com o material e o resultado. O sistema biológico mais

comumente utilizado é a cultura de células, que podem ser oriundas de linhagens permanentes ou de cultura primária<sup>118</sup>.

As células L929 são linhagens de fibroblasto de camundongos. São células aderentes que frequentemente são utilizadas para avaliação da biocompatibilidade de materiais<sup>119</sup>. Possuem morfologia fibroblastóide e são encontradas majoritariamente em tecidos conectivos danificados, sendo muito importante na regeneração tecidual<sup>120</sup>.

#### **4.2. Avaliação da citotoxicidade**

Testes de citotoxicidade baseiam-se em colocar o material direta ou indiretamente em contato com cultura de células de mamíferos e avaliar as modificações celulares por diferentes procedimentos, como incorporação de corantes ou inibição da formação de colônias celulares<sup>121</sup>.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são classificados em três categorias pela norma ISO 10993-5: teste de contato indireto, de contato direto e de extrato do material em diferentes diluições. Testes de contato direto e de extrato propiciam a avaliação quantitativa e qualitativa da citotoxicidade de biomateriais e, quando em contato com os materiais, possibilitam a avaliação da viabilidade celular<sup>37,122</sup>. No teste de eluição, adiciona-se o extrato do material em diferentes concentrações nas culturas celulares. Posteriormente, é realizada análise por meio da observação da inibição ou não do crescimento das células com o uso de corantes vitais<sup>123</sup>.

No teste de contato indireto, ou de difusão, o material a ser testado é aplicado sobre uma camada de ágar que reveste a camada de células. Se o material liberar substâncias tóxicas, estas irão difundir-se pela camada de ágar, atingir as células e, consequentemente, causar rupturas celulares e formação de um halo. Este teste possibilita a avaliação qualitativa da citotoxicidade<sup>123</sup>.

Portanto, os testes de citotoxicidade têm como finalidade identificar se o material ou dispositivo possui capacidade de gerar efeitos subletais ou letais no meio biológico em nível celular. É um teste padronizado pelas normas ISO 10993-5, sensível, rápido e de baixo custo<sup>124</sup>.

Os testes *in vitro* que avaliam a citotoxicidade das células estão relacionados com modificações que ocorre nas células, desde alterações leves, de determinadas funções celulares, até a morte celular. A morte celular é evidenciada por alterações na morfologia celular, como o arredondamento das células e aumento da vacuolização do citoplasma,

redução da adesão celular, ausência ou mudança na atividade metabólica, lise das células e proliferação celular diminuída<sup>125</sup>.

Os resultados dos testes de citotoxicidade são extraídos do contato direto das células com o biomaterial a ser testado. A viabilidade celular é demonstrada pela porcentagem de células vivas do material testado em relação à porcentagem de células do controle positivo de citotoxicidade<sup>126-128</sup>.

Para a avaliação quantitativa da viabilidade celular, realiza-se métodos colorimétricos com uso de corantes como o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-2-IL)-5-difenil brometo de tetrazolio) e o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2IL)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazólio)<sup>129</sup>. A avaliação quantitativa determina se ocorreu inibição do crescimento, proliferação ou morte celular. Com redução da viabilidade celular em mais de 30%, já se conclui que existe um efeito citotóxico<sup>37</sup>.

A avaliação qualitativa é realizada pela avaliação microscópica das células com a utilização de colorações citogênicas, na qual observam-se alterações na morfologia celular como integridade de membrana, vacuolização, entre outras alterações morfológicas. Esta avaliação, em ensaios *in vitro*, é definida, segundo as normas da ISO 10993 em cinco categorias que estão descritas no Quadro 1<sup>37</sup>.

QUADRO 1 - Classificação morfológica qualitativa de células submetidas ao teste de citotoxicidade de extratos, segundo a Norma ISO 10993

| GRAU | REATIVIDADE | CONDIÇÃO DAS CÉLULAS                                                                                                                                                    |
|------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0    | Nula        | Grânulos intracitoplasmáticos discretos; sem lise celular e sem redução do crescimento celular                                                                          |
| 1    | Leve        | Menos de 20% das células estão arredondadas, sem fixação e sem grânulos intracitoplasmáticos; presença de células rompidas; ligeira inibição do crescimento é observado |
| 2    | Suave       | No máximo 50% das células estarão arredondadas ou rompidas. Não apresenta mais de 50% de inibição do crescimento celular                                                |
| 3    | Moderado    | Ate 70% das células estão arredondadas ou lisadas; mais de 50% de inibição do crescimento é observado                                                                   |
| 4    | Grave       | Destruição quase completa ou completa das camadas de células                                                                                                            |

A escolha do teste depende da natureza da amostra a ser testada, localidade em que será aplicado o material e do objetivo de uso<sup>129</sup>. Os tempos de exposição dos materiais testes podem ser curtos, de até quatro horas, ou de longo intervalo, com períodos de 24 horas ou mais<sup>37,130</sup>. Segundo Hanks e colaboradores<sup>130</sup>, a citotoxicidade aguda pode ser constatada no período de 24 horas.

#### 4.2.1. Tipos de testes de citotoxicidade

##### a) Ensaio do MTT

O teste do MTT refere-se a um método laboratorial colorimétrico e quantitativo desenvolvido para análise da viabilidade celular, por meio da avaliação da atividade mitocondrial. É utilizado para avaliar a citotoxicidade de medicamentos e materiais<sup>131</sup>.

O sal tetrazólio amarelo ou MTT é reduzido (Figura 5) na mitocôndria, pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, transformando-se em cristais de formazan de cor púrpura. Esta redução acontece somente na mitocôndria de células que estão vivas e metabolicamente ativas e não acontece em células mortas<sup>131,132</sup>.

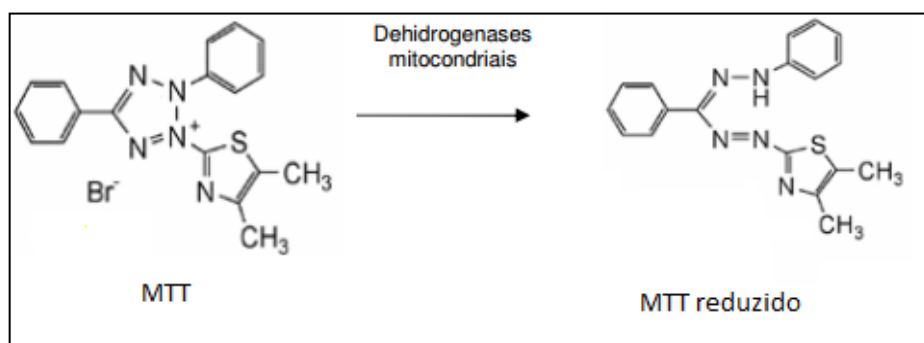


FIGURA 5 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais.

Fonte: [http://www.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/juliana\\_pizarro-completo.pdf](http://www.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/juliana_pizarro-completo.pdf)

Assim sendo, a viabilidade celular pode ser estabelecida pela intensidade da coloração atingida que é equivalente à quantidade de cristais de formazan produzidos, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria. Portanto, o teste irá avaliar a atividade mitocondrial das células vivas e representa um parâmetro da sua atividade metabólica<sup>131,132</sup>.

O uso de solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido (DMSO) ou isopropanol, é necessário, pois os cristais de formazan não são solúveis em água, o que impede as análises espectrofotométricas diretas. Assim sendo, foi sintetizado um novo sal de tetrazólio, o MTS

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(-4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), que demonstrou possuir importantes vantagens<sup>133</sup>.

#### b) Ensaio do MTS

O teste de MTS é fundamentado na análise quantitativa de células viáveis depois da exposição ao agente tóxico. O corante MTS também forma cristais de formazan pela redução realizada pela enzima desidrogenase mitocondrial, porém esses cristais são solúveis em água, ao contrário do corante MTT, e consequentemente não é necessária utilização de solventes orgânicos. Porém o corante é utilizado juntamente com um agente acoplador de elétrons, chamado fenazina metossulfato. A quantidade de MTS incorporada nas células é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura<sup>129</sup>.

#### c) Método difusão em ágar

Neste teste, o material a ser testado é colocado sobre uma camada de ágar que reveste uma camada de células, quando na presença de substâncias tóxicas, estas irão se difundir pela camada fina de ágar, proporcionando rompimento ou morte celular, observado pelo halo formado, como representado pela figura 2.

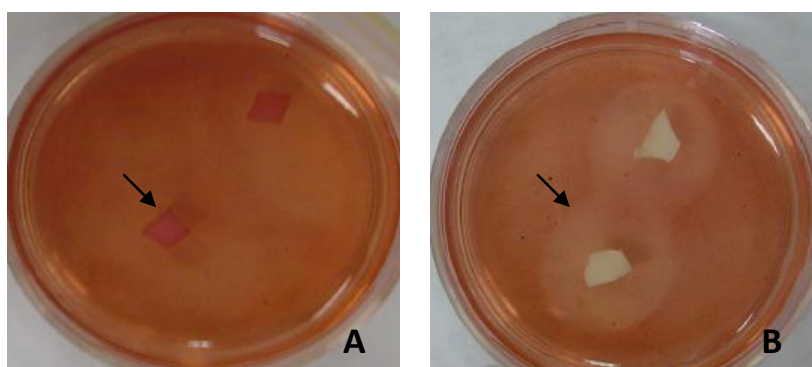


FIGURA 5 - Avaliação macroscópica do controle negativo realizado com papel de filtro, onde não ocorre a formação do halo (seta em A). E controle positivo realizado com látex, nota-se a presença de halo com diâmetro de 13 mm (seta em B).  
Fonte: Amaral<sup>109</sup>

No entanto, o halo só pode ser notado quando ocorre morte celular, devido a liberação do corante vermelho neutro absorvido pelas células o qual irá apresentar aparência transparente na região<sup>124</sup>. O resultado é obtido pela medida do índice do halo demonstrado pela área não corada pelo corante vital, representado pelo quadro 2<sup>37</sup>.

QUADRO 2 - Graus de reatividade para ágar e teste de difusão de filtro e teste de contato direto em avaliações de citotoxicidade, segundo as Normas ISO 10993<sup>37</sup>

| GRAU | REATIVIDADE | DESCRIÇÃO DA ZONA DE REATIVIDADE                         |
|------|-------------|----------------------------------------------------------|
| 0    | Nula        | Nenhuma zona detectável ao redor ou sob o espécime       |
| 1    | Leve        | Algumas células mal formadas ou degeneradas sob espécime |
| 2    | Suave       | Zona suave limitada à área sob espécime                  |
| 3    | Moderada    | Ampliação do tamanho da amostra até 1,0 cm               |
| 4    | Grave       | Se estende mais de 1,0 cm além do espécime               |

d) Teste do vermelho neutro

O vermelho neutro (*3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride*) é um corante que atravessa a membrana plasmática em pH fisiológico e concentra-se no interior de lisossomos das células vivas, e fixa-se devido a ligações eletrostáticas nos sítios aniônicos da matriz lisossomal<sup>134,135</sup>.

A cultura de células de mamíferos é posta em contato com os extratos a serem testado em microplacas de 96 poços e a avaliação da citototoxicidade pode ser feita com a utilização do método de incorporação do corante vermelho neutro. Este teste é um teste de baixo custo, eficaz, quantitativo e determina se a substância testada é potencialmente tóxica<sup>123</sup>.

Quando a célula foi danificada pelo material testado, ocorre o decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro e é possível diferenciar células vivas de células mortas pela intensidade de coloração final por meio da espectrofotometria<sup>123</sup>.

Os valores obtidos com a espectrofotometria permite-se o cálculo da média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células, o que determina a concentração do material que induz 50% de lise ou morte celular e como consequência a inibição de incorporação do vermelho neutro. O cálculo do IC50 permite a graduação do efeito citotóxico (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular)<sup>37</sup>.

e) Teste do azul de *Trypan*

O teste de azul de *Trypan* é utilizado para determinar a viabilidade celular, é um teste rápido e de fácil execução. Este teste demonstra o número de células viáveis com a utilização do uso do corante azul de *Trypan* e da câmara de *Neubauer*, já que as células não viáveis são permeáveis a este corante devido a presença de poros na membrana que possibilita a penetração do corante e assim, essas células apresentam coloração azul após o tratamento<sup>136</sup>.

A viabilidade celular é avaliada com auxílio de microscópio óptico e a porcentagem de viabilidade celular calculada conforme equação abaixo (2):

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100 \quad (2)$$

Os testes de citotoxicidade podem apresentar resultados positivos e negativos. Resultados positivos demonstram que a substância testada apresenta uma ou mais substâncias que podem causar morte celular. Já o resultado negativo é indicativo de ausência de toxicidade na substância testada<sup>137</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Rev. Quím. Nova. 2010; 33(6):1352-8.
2. Senel S, Ikinici G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. Int J Pharm. 2000; 193:197-203.
3. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56:1467-80.
4. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. Biomaterials. 1999; 20(15):1407-14.
5. Silva, CRS. Biomiméticos com ativos da Amazônia. Cosmetics & Toiletries. 2003; 15(5):66 – 71.
6. Almeida SD, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1998:464 p.
7. Vieira RF, Martins MVM. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. International Savanna Symposium; 1996; Brasília, Brasil. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1996. p.169-171.
8. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. Arquivo do Instituto Biológico. 2010; 77(3):441-7.
9. Wong JY, Bronzino JD. Biomaterials. Boca Raton: CRC Press; 2007. 296p.
10. William DF. The William Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press; 1999. 368 p.

11. Ratner BD. A History of Biomaterials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, Eds. Biomaterials Science- an introduction to materials in medicine. 3rd ed. Oxford: Elsevier; 2013. 1573p.
12. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. Rev. Quim. Nova. 2015; 38(7):957-71.
13. Regional analysis of biomaterials marked. Nord-Pas-De-Calais and Pys de La Loire, FR - South West Germany, GE-Limburg province, NL - East Midlands, UR. Biomaterial Inovation Network. Paris, 2011.[acesso 20 out 2017] Disponível em: [http://www.biomatin.eu/pdf/Regional analysis of the biomaterial market.pdf](http://www.biomatin.eu/pdf/Regional%20analysis%20of%20the%20biomaterial%20market.pdf).
14. Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2021. 2016. [acesso 02 nov 2017]. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>.
15. Oliveira SM, Mijares DQ, Turner G, Amaral IF, Barbosa MA, Teixeira CC. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. Tissue Eng. Part A. 2009;15(3):635-43.
16. Chung WJ, Oh JW, Kwak K, Lee BY, Meyer J, Wang E, Hexemer A, Lee SW. Biomimetic self-templating supramolecular structures. Nature. 2011; 478:364-68.
17. Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Progress in Polymer Scienc. 2016; 53:86-168.
18. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research. 2003 ;6(3):317-20.
19. Morais LS, Guimarães GS, Elias CN. Liberação de íons por biomateriais metálicos. Revista Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2007; 12(6):48-53.
20. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008; 29: 2941-53.
21. Bhat SV. Synthetic Polymers. In: Bhat SV. Biomaterials.New Delhi: Narosa Publishing House; 2002. 206p.
22. Hench LL, Best S. Ceramics, glasses and glass-ceramics. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Londres: Elsevier Academic Press. 2004. p.153-70.
23. Camilo CC. Escafolds para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânicas e in vitro. [Dissertação de Mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2006. [acesso 04 out 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18146/tde-01112006-120430/en.php>.
24. Hoffman AS. Introduction. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen F, Lemons J, editors. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 2ed. Amsterdam:Elsevier; 2004. p. 67.

25. Pereira MM, Buono VTL, Zavaglia CAC. Materiais metálicos: ciência e aplicação como biomateriais. In: Oréfice RL, Magalhães MM, Mansur HS, eds. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro:Cultura Médica; 2006. p.41-58
26. Eisenbarth E. Biomaterials for tissue engineering. *Advanced Engineering Materials*. 2007; 9(12):1051-60.
27. Barrere F, Mahmood TA, Groot R, Blitterswijk CAV. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering*. 2008; 59(1):38- 71.
28. Smith WF, Hashemi J. Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais. 5ª ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill; 2012. 734 p.
29. Hench LL, Best SM. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine. 3ª ed. Oxford: Elsevier; 2013. 1573p.
30. Wong JY, Bronzino JD, Peterson DR. Biomaterials: Principles and Practices. New York: CRC press; 2012. 281p.
31. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface*. 2009; 6:311-24.
32. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Friement B, Claes L. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials*. 2005; 26(3):311–18.
33. Oréfice RL. Materiais poliméricos - ciência e aplicação como biomateriais. In: Oréfice RL, Magalhães MM, Mansur HS, eds. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. p.87-155.
34. Willerth SM, Sakiyama ES. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In: StemBook [internet];2008. p.1-18.
35. Cheung H, Lau K, Lu T, Hui D. A critical review on polymer-based bioengineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*. 2006; 38(3):291–300.
36. Habraken WJ, Wolke JG, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2007; 59(4):234-48.
37. International Organization For Standardization. ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices. Genève, 2009.
38. Costa MBG, Pontes KCS, Benjamin LS, Borges AP, Abreu CC. Microscopia eletrônica de varredura de cavidades orbitárias preenchidas por membrana amniótica e hidroxiapatita. *Anais Simpac*. 2005;7(1).
39. Mora ND. Apostila de materiais elétricos. Foz do Iguaçu: 2010.

40. Jahno VD. Síntese e caracterização do poli (L-ácidoácético) para uso como biomaterial [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. [acesso em 12 out 2017]. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/6945>.
41. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction to Spectroscopy, 4<sup>th</sup> ed. Belmont, CA: Cengage Learning; 2009. 752p.
42. Leiva RRC, Crnkovic PM, Santos AM. O emprego da termogravimetria para determinar a energia de ativação do processo de combustão em óleos combustíveis. Ver. Quím. Nov. 2006; 29(5):940 – 46.
43. Moura C, Muszinski P, Schmidt C, Almeida J, PintoL. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. Revista de Ciências Exatas e Engenharias. 2005;15(1):7-17.
44. Azevedo VVC, Costa ACFM, Chaves AS, Bezerra DC, Fook MVL. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. 2007;2:27-34.
45. Peter MG. Chitin and chitosan from animal sources. In A. Steinbüchel (Ed.), Biopolymers Online. 2002;6:481-574.
46. Campos-Takaki GM. The Fungal Versatility on the Co-Polymers. In: Dutta PK (org.). Chitin and Chitosan: Opportunities & Challenges. Midnapore: Contal. 2005;1:69-94.
47. Berger LRR. Produção e caracterização de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e aplicação em membranas na remoção de cádmio. [tese de doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2013. [acesso 10 out 2017]. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/13403/Tese%20Lucia%20Raquel%20Ramos%20Berger.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
48. Campana SPF. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -Quitina. Química Nova. 2007;30(3):644-50.
49. Campos MGN. Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos. [tese de doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2007. [acesso 15 out 2017]. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/267226>.
50. Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. European Journal of Cell Biology. 2011;90(9):759-69.
51. Battisti MV, Campana-Filho SP. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. Química Nova. 2008;31:2014-19.
52. Soares NM, Moura C, Vasconcelos S, Rizzi J, Pinto LAA. Obtenção e Purificação de Quitosana a partir de Resíduos de Camarão em Escala Piloto. Revista Univap. 2003;10(18):88-92.

53. Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 2001;22:165-73.
54. Rodrigues AP, Sanchez EMS, Costa AC, Moraes AM. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;109:2703-10.
55. Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, Satsangi N. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;20:537-42.
56. Craveiro AA, Craveiro AC. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. Patente brasileira, PI 9805480-5A. 12/09/2000.
57. Oliveira, R.A. Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação da quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans*. [dissertação mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004. [acesso 02 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-19012005-103055/pt-br.php>.
58. Silva, GL. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatogenos: *Salmonella enteric*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*. [dissertação de mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2005. [acesso 10 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006-095954/pt-br.php>.
59. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smogghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol*. 2003;4:1457-65.
60. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009;34(7):641-78.
61. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31(7):603-32.
62. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym*. 2000;46:1- 27.
63. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57:19-34.
64. Peniche C, Arguelles-Monal W, Peniche H, Acosta N. Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*. 2003;3(10):511-20.
65. Prashanth KH, Kittur FS, Tharanathan RN. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2002;50(1):27-33.
66. Ziegler FLF, Sgarbieri VC. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e mistura dos dois produtos. *Revista de Nutrição*. 2009;22:61-71.

67. Nemati M, Oveisi MR, Abdollahi H, Sabzivari O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;34(3):485-92.
68. Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001;41(6):481-92.
69. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*. 2001;22:763-68.
70. Roman JA, Sgarbieri VC. Caracterização Físico-química do Isolado Protéico de Soro de Leite e Gelatina de Origem Bovina. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2007;10(2):137-43.
71. Bosch EVD, Gielen C. Gelatin degradation at elevated temperature. *Biol Macromol* 2003;32:129-38.
72. Singh, S, Rama Rao KV, Venugopal K, Manikandan R. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. *Pharmaceutical Technology*, v.4, p.36-58, 2002.
73. Karim AA, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 2008; 23(3):563-76.
74. Deman JM. *Principles of food Chemistry*. Aspen: Maryland; 1999.
75. Wong DWS. *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. Zaragoza; 1995.
76. Tabarestani HS, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi Mahoonak AR. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource Technology*. 2010;101:6207-14.
77. Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2006. 640p.
78. Naves RV. Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos. [tese de doutorado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 1999. [acesso 20 ago 2017]. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=651461&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22NAVES,%20R.%20V.%22&qFacets=autoria:%22NAVES,%20R.%20V.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>.
79. Ribeiro PAM, Arantes MCB, Sandoval CS, Amorim LLRSS, Paula JR, Bara MTF. Controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais. *Revista Eletrônica Farmácia Suplementar*. 2008;2(2):176-9.
80. Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília:Embrapa Informação Tecnológica. 2008;3.
81. Melo AFJ, Carvalho D, Pova JSR, Beazorti E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Sci. For*. 2004;66(1):56-65.

82. Faleiro FG, Farias-Neto AL. Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008;32-46
83. Vieira RF, Agostini-Costa TS, Silva DB, Sano SM, Ferreira FR. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília: Embrapa –Informação Tecnológica, 2010
84. Pianovski AR, Vilela AFG, Silva AAS, Lima CG, Silva KK, Carvalho VFM, Muasis CR, Machado SRP, Ferrari M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2008;44(2):249-59.
85. Brandão M, Laca-Buendía JP, Macedo JF. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528p.
86. Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Mota EF, Lima-Verde IA, Pinheiro FGM, Campello CC, Moraes SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. Journal of Ethnopharmacology. 2010;129:214-19.
87. Vera R, Souza ERB, Fernandes EP, Naves RV, Soares JRMS, Caliar M, Ximenes PA. Caracterização física e química de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical. 2009;37(2):93-9.
88. Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura. 2007;29(3):695-98.
89. Almeida SP, Costa TSA, Silva JA. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF (Ed.). Cerrado: ecologia e flora. Brasília: EMBRAPA Cerrados. 2008;1:351-81.
90. Gonçalves GAS, Boas EVBV, Resende JV, Machado ALL, Boas BMV. Qualidade dos frutos do pequi submetidos a diferentes tempos de cozimento. Ciência e Agrotecnologia. 2011;35(2):377-85.
91. Mariano-da-silva, S, Brait JDDA, Faria FPD, Silva SMD, Oliveira SLD, Braga PF, Mariano-da-silva FMD. Chemical characteristics of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás-Brazil. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2009;29(4):771-77.
92. Kerr WE, Silva FR, Tchcarramae B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. Revista Brasileira de Fruticultura. 2007;29(1):169-71.
93. Lima, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. [acesso 20 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-30042008-090010/pt-br.php>.

94. Khouri J, Resck IS, Poças-Fonseca M, SousaTMM, Pereira LO, Oliveira ABB, Grisólia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Genet. Mol. Biol. 2007;30.
95. Miranda-Vilela AL, Resk IS, Grisólia CK. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. Genetics and Molecular Biology. 2008;31(4):956-63.
96. Aquino LP. Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*): influência das variáveis operacionais. [dissertação de mestrado]. Lavras, Universidade Federal de Lavras; 2007. [acesso 21 out 2017]. Disponível em: [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/3139/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Extra%C3%A7%C3%A3o%20do%C3%B3leo%20da%20polpa%20de%20pequi%20%28Caryocar%20brasiliense%29%20influ%C3%Aancia%20das%20vari%C3%A1veis%20operacionais.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/3139/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Extra%C3%A7%C3%A3o%20do%C3%B3leo%20da%20polpa%20de%20pequi%20%28Caryocar%20brasiliense%29%20influ%C3%Aancia%20das%20vari%C3%A1veis%20operacionais.pdf)
97. Pessoa AS. Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum*) utilizando propano subcrítico e cossolventes. [dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013. [acesso 05 set 2017]. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/107031>.
98. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GA. Antioxidant activity of cerrado fruits. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. 2008;27(1):53-60.
99. Soares NR. Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de sabonete líquido à base de óleo de baru, buriti e pequi. [dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013. [acesso 05 out 2017]. Disponível em: [https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3885?locale=pt\\_BR](https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3885?locale=pt_BR).
100. Diniz DM. Atividade anti-inflamatória de microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.). [trabalho de conclusão de curso]. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba. [acesso e, 12 set 2017]. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/8235>.
101. Quirino GS. Atividade cicatrizante e gastroprotetora de *Caryocar coriaceum* Wittm. [dissertação de mestrado]. Crato: Universidade Regional de Cariri; 2009. [acesso em 14 set 2017]. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=163786](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=163786).
102. Rabbers AS. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de compósito a base de colágeno e óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). [dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2016. [acesso 31 out 2017]. Disponível em: [https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_\\_\\_ANDRESSA\\_SABINE.pdf](https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O___ANDRESSA_SABINE.pdf).
103. Schmalz G, Langer H, Schweikl H. Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. Journal of dental research. 1998;77(10):1772-8.

- 104.Muller U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical devices. Medical device technology. 2008;19(2):30-2.
- 105.Directive 98/79/EC of The European Parliament and of The Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. OJ L337, 7. 1998.
- 106.Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2 ed. Amsterdam: Elsevier; 2004. P.67.
- 107.Cao Y, Croll TI, Lees JG, Tuch BE, Cooper-Wite JJ. Scaffolds, stem cells, and tissue engineering: A potent combination!. Australian journal of chemistry. 2005;58(10):691-703.
- 108.Song E, Kim SY, Chun T, Byun HJ, Lee YM. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. Biomaterials. 2006;27(15):2951-61
- 109.Amaral RH, Rogero SO, Cruz AS, Lugao AB. Caracterização físico-química e biocompatibilidade in vitro de membranas de hidrogel. Anais do Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais; 2008. [acesso 8 set 2017]. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2008/eventos/13479.pdf>.
- 110.Keong LC, Halim AS. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical grade chitosan derivatives in wound management. International Journal of Molecular Sciences. 2009;10:1300-13.
- 111.Sun T, Jackson S, Haycock JW, Macneil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agentes. J Biotechnol. 2006;122:372-381.
- 112.Rogero SO, Higa OZ, Saiki M, Correa OV, Costa I. Toxicology in Vitro. 2000;14(6):497-504.
- 113.Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. Biomaterials. 1996;17(13):1259-64.
- 114.Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research. 2003;6(3):317-20.
- 115.Dulbecco R, Elkington J. Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. Nature. 1973;246:197-9.
- 116.Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3 ed. New York: Wiley-Liss; 1994.
- 117.Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila A, Izquierdo I, Portolés MT. In vitro biocompatibility assessment of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblast. Biomaterials 2004;25(25):603-11.
- 118.Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. J. Dent. 1994;22(2):S6-11.

- 119.Serrano MC, Pagani R, Peña J, Portolés MT. Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly(epsilon-caprolactone) films. *Biomaterials*. 2005;26:5827-34.
- 120.Pan H, Jiang HL, Chen WL. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomaterials*. 2006;27(17):3209-20.
121. Rogero SO, Higa OZ, Saiki M, Correa OV, Costa I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in vitro*. 2000;14(6):497-504.
- 122.Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials*. 2001;22(12):1467-74.
123. Daguno JK, Santos C, Rogero SO. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Revista Matéria*. 2007;12(1):134-9.
- 124.Pereira KR. Avaliação da biocompatibilidade in vitro e in vivo de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica. [dissertação de mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2008. [acesso 11 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-17052010-113423/pt-br.php>.
- 125.Kumar V. Respostas celulares ao estresse e as agressões tóxicas; adaptação lesão e morte. In: Kumar V, Abbas A, Aster JC. *Bases Patológicas das Doenças*. 9 ed. Local de publicação:Elsevier; 2016. 1440 p.
- 126.Girotto D, Urbani S, Brun P, Renier D, Barbucci R, Abatangelo G. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials*. 2003;24(19):3265-75.
- 127.Castro CM, Aguiar JL, Melo FD, Silva WT. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb*. 2004;49(2):119-23.
- 128.Cárdenas G, Anaya P, von Plessing C, Rojas C, Sepúlveda J. Chitosan composite films. Biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(6):2397-405.
- 129.Nozaki AC, Marques RF, Manzine LM, Ferreira M, Marchi J. Caracterização de intumescimento e degradação de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. In: *Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais 2012*.
- 130.Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*. 1996;12(3):186-93.
- 131.Tang LL, Liu H, Wang YL, Xian CY, Su AH. Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;57(2):215-8.
- 132.Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Técnicas Básicas em Culturas de Células*. 4 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004. p. 10-12.

- 133.Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. PLoS One. 2010;5(4):10.137-10.
- 134.Harbell JW, Koontz SW, Lewis RW, Lovell D, Acosta D. IRAG working group 4: cell cytotoxicity assays. Food and Chemical Toxicology. 1997;35(1):79-126.
- 135.Cruz, A.S. Teste de Citotoxicidade *In Vitro* como Alternativa ao Teste *In Vivo* de Draize na Avaliação de Produtos Cosméticos.[tese de doutorado]. São Paulo: Universidade São Paulo; 2003. [acesso 02 out 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-03082007-170357/pt-br.php>.
- 136.Konopka AK, Pretzer E, Felgner PL, Duzqunes N . Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. Biochimica et Biophysica Acta. 1996;1312(3):186-196.
- 137.Dallan PRM, Moreira PL, Petinari L, Malmonge SM, Beppu MM, Genari SC, Moraes AM. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2007;80:394-405.

## **CAPÍTULO 2 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MEMBRANA DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI**

### **RESUMO**

Para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis que possam ser utilizados na área biomédica é necessário que se conheça particularidades e características destes materiais. Estas avaliações são realizadas por meio da caracterização físico-química do produto isolado, assim como do produto final. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e a caracterização físico-química de um biomaterial, na forma de membrana, composto por quitosana, gelatina e diferentes proporções do óleo de pequi, que possibilitasse a produção de uma membrana resistente e homogênea para auxiliar na regeneração tecidual. Empregou-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, análises térmicas e espectroscopia de absorção na região do infravermelho, as quais permitiram observar que a associação foi efetiva sem interação entre os componentes utilizados, possibilitando a produção de membrana com potencial para utilização em feridas.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica

## **PRODUCTION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A CHITOSAN-GELATINE-PEQUI OIL-BASED MEMBRANE**

### **ABSTRACT**

For the development of biocompatible materials that can be used in the biomedical area it is necessary to know the characteristics and characteristics of these materials. These evaluations are carried out by means of technical analyzes for the characterization of the isolated product as well as the final product. The objective of this study was the development and physical-chemical characterization of a biomaterial, in the form of membrane, composed of chitosan, gelatine and different proportions of pequi oil, that allowed the production of a resistant and homogeneous membrane to aid in tissue regeneration . Scanning electron microscopy, thermal analysis and absorption spectroscopy techniques were used, which allowed to observe that the association was effective without interaction between the elements used, allowing the production of membrane with potential for use in wounds.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb, electron microscopy, infrared spectroscopy

### **1. INTRODUÇÃO**

Biomateriais são substâncias elaboradas para substituírem parcial ou totalmente, tecido, órgão ou função do corpo, de forma econômica e aceitável fisiologicamente. Podem

ser substâncias ou associações de substâncias naturais e/ou sintéticas, que irão estar em contato direto com os tecidos vivos<sup>1, 2</sup>.

Um material é classificado como biocompatível quando este não é tóxico, não desenvolve mutagenicidade, alergenidade, nem carcinogenicidade<sup>3</sup>. A resposta deste material no organismo irá depender, além de suas propriedades e características, do local de aplicação<sup>4</sup>.

A quitosana é um polissacarídeo adquirido pela desacetilação parcial da quitina, a qual é encontrada, principalmente, no exoesqueleto de crustáceos, parede celular de fungos e em outros organismos como algas e moluscos<sup>5,6</sup>. É composta de unidades de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina<sup>7,8</sup>. Vem despertando interesse por se tratar de um composto biodegradável e biocompatível<sup>9</sup>. Além de permitir variações na sua forma física e na estrutura química, possibilita diversas aplicações práticas como, por exemplo, no tratamento de águas e efluentes, na regeneração tecidual, na produção de membranas artificiais, loções e cremes<sup>10</sup>.

A gelatina é um polímero bioreabsorvível com alta massa molar, composta por cadeias de aminoácidos<sup>11</sup>. É obtida por meio da hidrólise do colágeno<sup>12</sup>. Apresenta capacidade de formar filmes flexíveis e géis termorreversíveis, viabilizando a sua utilização na indústria de fármacos<sup>13, 14</sup>.

O pequi é fruto do pequizeiro pertencente à família Caryocaraceae. Comunidades do cerrado brasileiro tem relatado o uso de cascas, folhas e frutos do pequi na medicina popular. O óleo do pequi tem sido utilizado, por populares, no tratamento de doenças respiratórias, úlceras gástricas, edemas e queimaduras<sup>15</sup>. O óleo do pequi apresenta ação anti-inflamatória. A aplicação tópica desse extrato foi capaz de reduzir a inflamação de edema agudo de orelha em ratos<sup>16</sup>. Há relatos de aceleração da cicatrização de feridas cutâneas, devido à atenuação do processo inflamatório e otimização da cicatrização<sup>16, 17, 18</sup>.

As características físico-químicas afetam o comportamento *in vivo* dos biomateriais, sendo determinadas mediante testes variados. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a caracterização dos materiais de acordo com sua organização morfológica e estrutural, por meio da emissão e interação de feixes de elétrons<sup>19</sup>. A espectroscopia de infravermelho permite compreender a composição química dos materiais e presumir possíveis interações com outros materiais ou mesmo com o tecido biológico por meio da comparação dos modos vibracionais das moléculas de uma substância<sup>20, 21</sup>. A termogravimetria (TGA) é utilizada para verificar estabilidade e possíveis modificações estruturais em diferentes temperaturas, esta técnica analisa a alteração da massa do material quando sujeito a uma variação constante de temperatura<sup>19, 22</sup>.

Não há na literatura científica atual relatos sobre o emprego da associação ente quitosana, gelatina e óleo de pequi. Dessa forma, a associação na forma de membrana demonstra-se interessante devido as propriedades dos componentes quando utilizados separadamente para a obtenção de membranas que podem ser empregadas na reparação tecidual. Para tanto, são necessárias análises técnicas para a caracterização e determinação da possível aplicabilidade dos compostos em estudo na regeneração tecidual de feridas dado as características cicatrizante e antiinflamatórias dos componentes utilizados.

Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver membrana composta por quitosana, gelatina e óleo de pequi e avaliar suas propriedades físico-químicas visando aplicação como biomaterial.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A quitosana foi obtida a partir da quitina de gládios de lulas do gênero *Loligo* sp, cedidas por Miami Comércio e Exportação e Pescados Ltda. (Cananéia-SP). A manipulação e preparo do material foram realizados no Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP. Inicialmente os gládios de lula foram lavados com água corrente para a remoção de resíduos e submetidos em estufa a 40°C para a secagem completa do material, por três horas, e posterior a trituração. Em seguida, foi realizada a desproteínização-desmineralização, por meio de tratamento alcalino com uma solução de NaOH 0,3 mol L<sup>-1</sup>, obtendo-se a  $\beta$ -quitina. Na etapa final, foi feita a desacetilação com NaOH 40%<sup>23</sup>. A quitosana foi submetida à solução de ácido acético 1% para a obtenção de gel de quitosana a 2%.

Para a obtenção do gel, foi utilizada gelatina suína do tipo A (SIGMA®), solubilizada em água, sob agitação constante por trinta minutos e temperatura de 60°C, resultando em solução a 2%. Em seguida, a solução de gelatina foi resfriada a 5°C para a gelificação. Os procedimentos foram realizados segundo instruções do fabricante.

O óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) foi obtido junto à Cooperativa dos Agricultores Familiares e Agroextrativista Grande Sertão, em Minas Gerais, cuja extração foi realizada de forma artesanal em recipiente de alumínio. A polpa do fruto foi submetida a cozimento em água, com separação do óleo sobrenadante. Em seguida, o óleo foi seco em pelo método de evaporação e, após a retirada da água por decantação, por meio da utilização de papel de filtro<sup>24</sup>.

As membranas foram desenvolvidas a partir de emulsões obtidas da mistura quitosana-gelatina, na proporção 2:1 com a adição lenta de solução com ou sem óleo de pequi,

descritas no quadro 1, para cada 50 g da mistura sob agitação a 2000 rpm, durante uma hora e em banho de ultrassom (40kHz).

QUADRO 1 – Composições das soluções preparadas sem e com óleo de pequi com suas respectivas membranas

| MEMBRANA | COMPOSIÇÃO                                                         |
|----------|--------------------------------------------------------------------|
| MQG      | 1,0 mL etanol + 3,0 mL ác. acético                                 |
| MQGOP1   | 1,0 mL de óleo de pequi + 1,0 mL de etanol + 2,0 mL de ác. acético |
| MQGOP2   | 2,0 mL de óleo de pequi + 1,0 mL de etanol + 1,0 mL de ác. acético |
| MQGOP3   | 3,0 mL de óleo de pequi + 1,0 mL de etanol + 1,0 mL de ác. acético |

As preparações foram desaeradas e estocadas sob refrigeração. Para obtenção do formato das membranas, utilizou-se cinco gramas de cada preparação que foram despejadas em moldes de teflon® de 1,5 x 11,0 x 0,2 cm. Todos os materiais foram neutralizados em vapor de amônia durante 24 horas e em seguida foram deixadas sob fluxo de ar por dez dias.

As membranas obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, termogravimetria e espectroscopia de absorção no infravermelho.

Com a microscopia eletrônica de varredura é possível obter fotomicrografias, por meio do equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda) com detector Oxford (Oxford Instruments Inc.), a partir de amostras da membrana controle e membranas com as diferentes concentrações do óleo de pequi, nas dimensões de 0,5 x 0,5 cm, recobertas, previamente, por uma camada de ouro para observar-se a morfologia das membranas.

As curvas termogravimétricas foram obtidas pela utilização de amostras de aproximadamente 10 mg, em atmosfera de ar sintético com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> em um equipamento TGA Q50 (TA Instruments).

Os espectros do óleo de pequi, gel de quitosana e gel de gelatina foram obtidos individualmente, preparados em pastilha de silício. O óleo foi gotejado sobre as pastilhas e os géis de quitosana e gelatina foram dispostos formando uma camada delgada e seca sobre as pastilhas. Também foram feitos filmes das preparações da quitosana, gelatina e óleo de pequi nas diferentes concentrações, após diluição em solução de ácido acético pH 3,5, na proporção

de 1:3. A análise foi feita em um intervalo entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 *scans* e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  utilizando-se um espectrofotômetro de FT-IR Shimadzu IR Affinity – 1.

As membranas a serem submetidas aos experimentos foram acondicionadas em embalagens de papel grau cirúrgico específico e em seguida foram esterilizadas em óxido de etileno (ETO), por seis horas a 55°C e 60% de umidade. O mesmo foi realizado com as amostras de controle negativo (papel filtro) e controle positivo (fragmentos de luvas de látex). As amostras foram mantidas armazenadas em papel grau cirúrgico lacrado até o início do experimento.

### 3. RESULTADOS

O aspecto macroscópico e coloração das membranas podem ser observados na Figura 1.

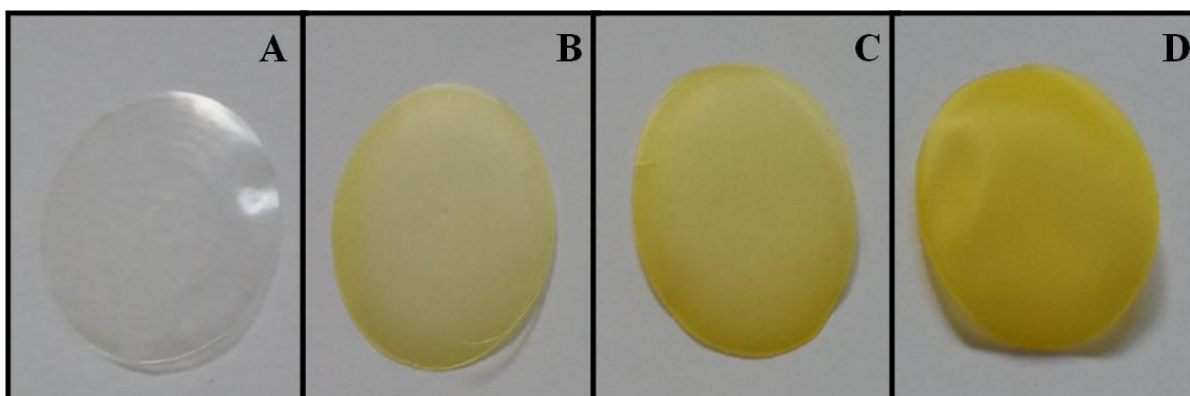


FIGURA 1 - Fotografia digital das membranas obtidas. Em A, MQG (membrana de quitosana e gelatina), de aspecto homogêneo e transparente. Em B, C e D, membranas MQGOP1 (membrana de quitosana, gelatina e 1,0 mL de óleo de pequi), MQGOP2 (membrana de quitosana, gelatina e 2 mL de óleo de pequi), MQGOP3 (membrana de quitosana, gelatina e 3 mL de óleo de pequi), respectivamente, com óleo de pequi em concentrações crescentes. As três membranas apresentaram aspecto homogêneo e coloração amarelada, com intensidade proporcional à concentração de óleo de pequi.

Quanto ao aspecto macroscópico, observou-se que as membranas controle, compostas por gel de quitosana e gel de gelatina, apresentaram-se transparentes e delgadas. As membranas contendo óleo de pequi apresentaram-se delgadas e amareladas, com intensidade proporcional à concentração do óleo.

As fotomicrografias por MEV para as membranas estão na Figura 2. É possível observar que a membrana controle, sem a presença do óleo de pequi, ficou com aspecto e filme homogêneo e liso. No entanto, as membranas com a presença do óleo de pequi apresentam vesículas com tamanhos variados e contornos não definidos bem como filamentos com aparência de cristal. O aumento na proporção do óleo reduziu o tamanho das vesículas e

aumentou sua uniformidade. A presença de filamentos com aspecto de cristal também foi proporcional à concentração do óleo de pequi.

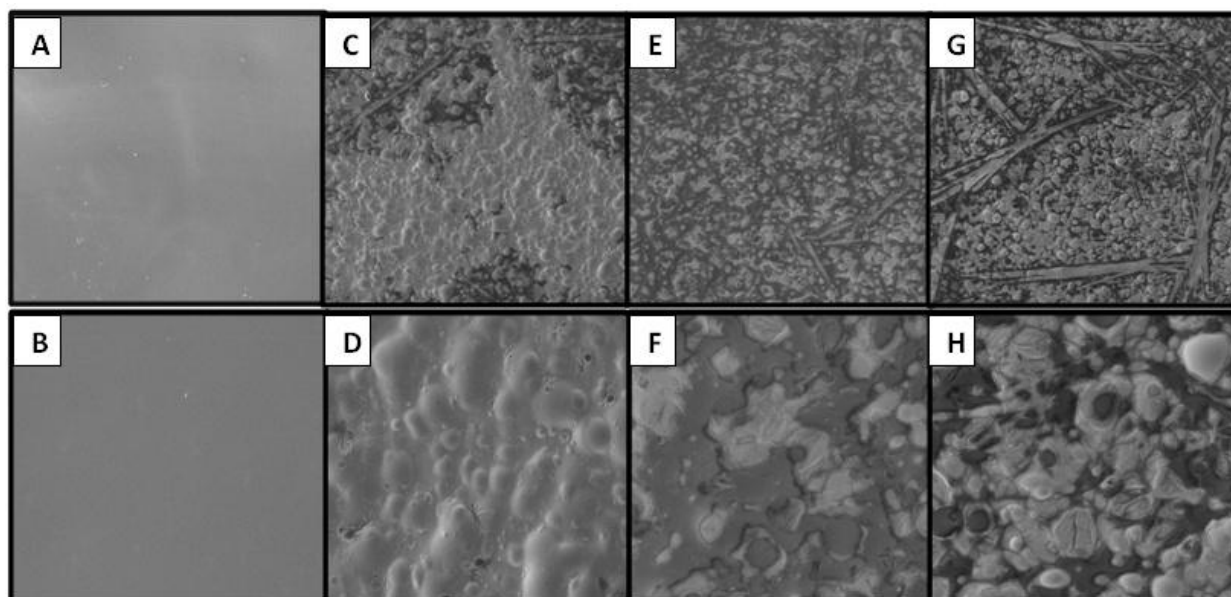


FIGURA 2 - Fotomicrografias das membranas obtidas. Em A e B, MQG, 200X e 1000X. Observa-se aspecto liso e homogêneo. Em C e D, MQGOP1, 200X e 1000X. Observa-se a presença de estruturas vesiculares e filamento com aspecto de cristal. Em E e F, MQGOP2, 200X e 1000X. Observa-se a presença de estruturas vesiculares e o aumento da quantidade de filamentos com aspecto de cristal. Em G e H, MQGOP3, 200X e 1000X. Houve maior aumento da quantidade de filamentos com aspecto de cristal, entre as estruturas vesiculares.

Para o óleo de pequi (Figura 3), o espectro mostrou bandas na região de 3000 a 2780  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação C-H de alcanos; a banda em 1743  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do grupo carbonila (C=O), característico dos ésteres; e as bandas em 1238, 1163 e 1116  $\text{cm}^{-1}$  referentes às vibrações da ligação C-O da ligação éster no triacilglicerol. A deformação angular da ligação C-H simétrica e assimétrica estão presentes nas bandas em 1464 e 721  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente<sup>25</sup>.

O espectro de absorção da gelatina (Figura 3) mostra uma banda intensa em 1653  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à amida I devido à deformação axial da ligação C=O. A amida II está presente na banda em 1552  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C-N e à deformação angular N-H. A banda em 1240  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à amida III devido ao estiramento C-N e a deformação N-H. A banda na região de 3320  $\text{cm}^{-1}$  é referente à amida A.

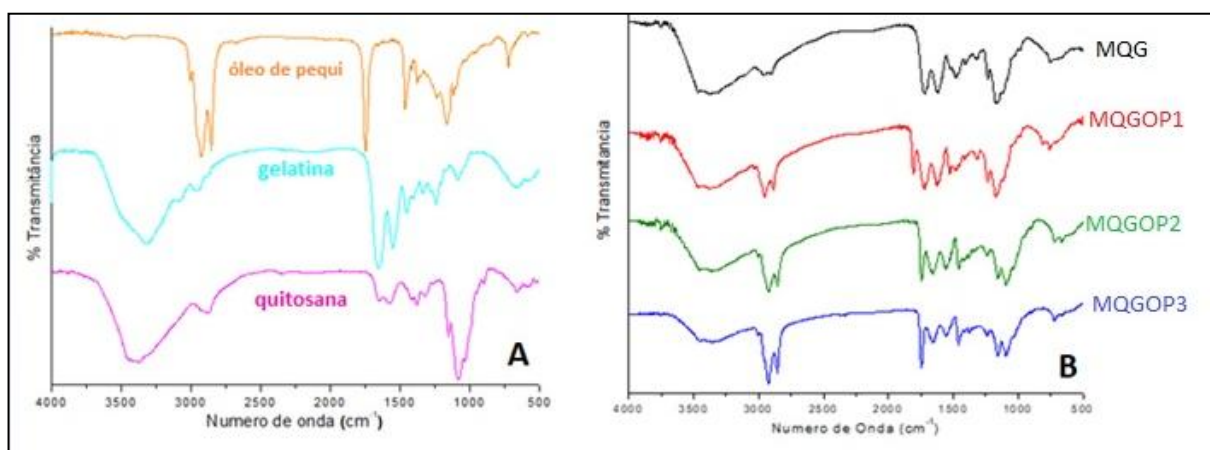


FIGURA 3 – Em A o espectro na região do infravermelho para óleo de pequi, gelatina e quitosana. Em B Espectro na região do infravermelho para as membranas MQG (membrana de quitosana e gelatina), MQGOP1 (membrana de quitosana, gelatina e 1 mL de óleo de pequi), MQGOP2 (membrana de quitosana, gelatina e 2 mL de óleo de pequi) e MQGOP3 (membrana de quitosana, gelatina e 3 mL de óleo de pequi).

Para a quitosana, seu espectro (Figura 3) mostra uma banda larga e intensa na região entre  $3720\text{--}2990\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento O–H a qual se sobrepõe a banda da ligação N–H. Em  $1651\text{ cm}^{-1}$ , banda correspondente à amida I atribuída à vibração da ligação C–O das unidades acetiladas; em  $1581\text{ cm}^{-1}$ , refere-se à amida II; e em  $1323\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento do grupo –CO–N–. A banda entre  $850\text{ e }1200\text{ cm}^{-1}$  relaciona-se com os anéis piranosídicos<sup>26</sup>.

Para os filmes das emulsões contendo quitosana, gelatina e óleo de pequi, observam-se nos espectros no infravermelho (Figura 3) as bandas características de cada material, sem deslocamentos, indicando que não ocorreu interação entre eles. O teor crescente do óleo de pequi nas emulsões está evidenciado por meio das bandas na região de  $3000\text{ a }2780\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação C–H de alcanos, juntamente com a banda em  $1745\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C=O, característico dos ésteres.

#### 4. DISCUSSÃO

A obtenção do biomaterial composto por quitosana, gelatina e óleo de pequi foi realizada a contento, obtendo-se diferentes concentrações do óleo em relação à mistura de quitosana e gelatina. As membranas apresentaram-se delgadas, com certa flexibilidade, com potencial para serem adaptadas sobre feridas, caso sua aplicação prática seja viável.

As diferentes concentrações de óleo foram obtidas conforme o limite de mistura dos componentes que não tornasse a membrana frágil e fragmentada, uma vez que não existem relatos de obtenção anterior da utilização destes materiais associados.

Biomaterial semelhante, utilizando colágeno, gelatina e óleo de pequi foi obtida por Rabbers<sup>27</sup>, que descreveu que diferentes concentrações do óleo em relação ao colágeno e gelatina dependeram das características macroscópicas finais de fragilidade e fragmentação. Apesar de serem componentes com composição química diversa e complexa, a mistura e associação são efetivas, observando-se o produto final desejado, considerando-se a aplicação prática em feridas para o material<sup>28</sup>.

A espectroscopia na região do infravermelho da quitosana, gelatina e óleo de pequi isolados, revelou bandas correspondentes às ligações e estiramentos característicos da sua composição química. A partir destas informações, a comparação com a espectroscopia realizada para o biomaterial contendo os três componentes, demonstrou que a quitosana, a gelatina e o óleo de pequi mantiveram os mesmos espectros, correspondentes às ligações e estiramentos característicos, demonstrando que não houve interação e consequentemente alterações moleculares.

Este achado torna-se importante para comprovar que a mistura destes materiais não modifica características físico-químicas e não proporciona reação química resultando no surgimento de outros compostos. Resultados semelhantes, utilizando colágeno, gelatina e óleo de pequi foram observados por Rabbers<sup>27</sup>, afirmando não haver interação entre os componentes e manutenção da estrutura em hélice tripla do colágeno.

A morfologia revelada por microscopia eletrônica de varredura foi importante para observar que o óleo de pequi na mistura com quitosana e gelatina permanece confinado na forma de vesículas indicando que não houve interação com os outros componentes. A formação de vesículas nas membranas pode aumentar a interação das células com as membranas, devido o aumento da superfície de contato<sup>29</sup>. Além disso, o aumento das concentrações do óleo proporcionou e intensificou o aparecimento de filamentos, provavelmente derivados da precipitação da quitosana. As vesículas também foram observadas na mistura com colágeno e gelatina<sup>27</sup> e podem ser explicados pela insolubilidade do óleo em relação à quitosana e gelatina.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível a obtenção de membrana a partir da quitosana, gelatina e óleo de pequi e que não há reação química entre os componentes utilizados. A presença do óleo de pequi promove alterações macroscópicas de coloração, tornando as membranas amareladas, em intensidade diretamente proporcional à concentração do óleo.

Microscopicamente, a presença do óleo promove o aparecimento de vesículas no material, em concentrações diretamente proporcionais à sua concentração.

## REFERÊNCIAS

1. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Ver. Quim Nova. 2010; 33(6):1352-8.
2. Wong JY, Bronzino JD. Biomaterials. Boca Raton: CRC Press; 2007. 296p.
3. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research. 2003 ;6(3):317-20.
4. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008; 29: 2941-53.
5. Campana SPF. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -Quitina. Química Nova. 2007;30(3):644-50.
6. Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. European Journal of Cell Biology. 2011;90(9):759-69.
7. Moura C, Muszinski P, Schmidt C, Almeida J, Pinto L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. Revista de Ciências Exatas e Engenharias. 2005;15(1):7-17.
8. Azevedo VVC, Costa ACFM, Chaves AS, Bezerra DC, Fook MVL. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. 2007;2:27-34.
9. Berger LRR. Produção e caracterização de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e aplicação em membranas na remoção de cádmio. [tese de doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2013. [acesso 10 out 2017]. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/13403/Tese%20Lucia%20Raquel%20Ramos%20Berger.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
10. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. React. Funct. Polym. 2000;46:1- 27.
11. Ziegler FLF, Sgarbieri VC. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e mistura dos dois produtos. Revista de Nutrição. 2009;22:61-71.
12. Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2001;41(6):481-92.
13. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials. 2001;22:763-68.
14. Roman JA, Sgarbieri VC. Caracterização Físico-química do Isolado Proteico de Soro de Leite e Gelatina de Origem Bovina. Brazilian Journal of Food Technology. 2007;10(2):137-43.
15. Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2006. 640p.

16. Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Mota EF, Lima-Verde IA, Pinheiro FGM, Campello CC, Moraes SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. Journal of Ethnopharmacology. 2010;129:214-19.
17. Diniz DM. Atividade anti-inflamatória de microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.). [trabalho de conclusão de curso]. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba. [acesso em 12 set 2017]. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/8235>.
18. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. Arquivo do Instituto Biológico. 2010; 77(3):441-7.
19. Costa MBG, Pontes KCS, Benjamin LS, Borges AP, Abreu CC. Microscopia eletrônica de varredura de cavidades orbitárias preenchidas por membrana amniótica e hidroxiapatita. Anais Simpac. 2005;7(1).
20. Jahno VD. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. [acesso em 12 out 2017]. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/6945>.
21. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction to Spectroscopy, 4<sup>th</sup> ed. Belmont, CA: Cengage Learning; 2009. 752p.
22. Leiva RRC, Crnkovic PM, Santos AM. O emprego da termogravimetria para determinar a energia de ativação do processo de combustão em óleos combustíveis. Ver. Quím. Nov. 2006; 29(5):940 – 46.
23. Horn MM, Martins VCA, Peplis AMG. Determinação da energia de ativação em hidrogeis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. Rev. Polímeros. 2010;20(3):201-04.
24. Facioli NL, Gonçalves LAG. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Quím. Nova. 1998;21(1):16-19.
25. Sena DM, Rodrigues FFG, Freire PTC, Lima SG, Coutinho HDM, Carvajal JCL, Costa JGM. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil. Grasas y Aceites. 2010;61(2):191-6.
26. Czechowska-Biskup R, Jarosinska D, Rokita R, Ulanski P, Rosiak JM. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2012;XVII.
27. Rabbers AS. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de compósito a base de colágeno e óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). [dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2016. [acesso 31 out 2017]. Disponível em: [https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_ANDRESSA\\_SABINE.pdf](https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O_ANDRESSA_SABINE.pdf).
28. Hench LL, Best S. Ceramics, glasses and glass-ceramics. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Londres: Elsevier Academic Press. 2004. p.153-70.

29. Elias, CN. Diferentes superfícies dos implantes dentários. III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Campinas-SP. 2004.

### **CAPÍTULO 3 – CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA MEMBRANA DE QUITOSANA, GELATINA E ÓLEO DE PEQUI**

#### **RESUMO**

Os biomateriais estão sendo muito estudados devido sua utilização na busca de melhor qualidade de vida. A avaliação da biocompatibilidade *in vitro*, por meio do contato dos materiais com células e seus efeitos em microrganismos são fundamentais para compreender as respostas orgânicas aos biomateriais. O objetivo deste trabalho é a avaliação da biocompatibilidade e da atividade antimicrobiana de um biomaterial obtido em forma de membrana, composto por quitosana, gelatina e diferentes proporções de óleo de pequi. Para avaliação da biocompatibilidade das membranas foi realizado o teste de citotoxicidade com a utilização do MTT e para a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em disco. Os testes permitiram observar que as membranas foram tóxicas para as células em 48 horas e não houve atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: biomateriais, *Caryocar brasiliense* Camb, MTT

#### **CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A CHITOSAN-GELATINE-PEQUI OIL-BASED MEMBRANE**

#### **ABSTRACT**

Biomaterials are being studied extensively because of their use in the search for a better quality of life. For the use of biomaterials in the biomedical area it is necessary to pre-evaluate the material and its response when in contact with living tissue. Mouse fibroblasts are the cells indicated in most cases to evaluate the cytotoxicity of the materials. The objective of this work is the evaluation of the biocompatibility and antimicrobial activity of a biomaterial obtained in membrane form, composed of chitosan, gelatine and different proportions of pequi oil. To evaluate the biocompatibility of the membranes, the cytotoxicity test was performed using MTT and the disc diffusion test was used to evaluate the antimicrobial activity. The tests allowed to observe that the membranes were toxic to the cells in 48 hours and there was no antimicrobial activity.

Keywords: biomaterials, *Caryocar brasiliense* Camb, MTT

## **1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos os biomateriais vêm sendo muito utilizados na produção de dispositivos médicos para utilização na área biomédica, como materiais para suturas, placas, válvulas cardíacas, lentes, dispositivos para liberação de fármacos, dentre muitos outros.

Biomateriais são materiais que agem em contato direto com o sistema biológico, sem causar respostas prejudiciais ao organismo. São planejados para substituírem parte ou

função do corpo de maneira segura, podem ser de uso provisório ou permanente. Apresentam aplicações preventivas, diagnósticas ou terapêuticas<sup>1,2</sup>.

Biomateriais de origem natural são amplamente pesquisados por serem de fontes renováveis, são representados, principalmente, pela queratina, colágeno e polissacarídeos. Já os biomateriais de origem sintética mais utilizados são as cerâmicas, os metais e os polímeros sintéticos<sup>3,4</sup>.

As características particulares, as reações geradas quando em contato com tecido vivo e as consequências a curto e longo prazo destes materiais são importantes para a aplicação no organismo. Testes fundamentados em normativas, como a ISO 10993, são cruciais para a avaliação do biomaterial *in vitro* antes da sua utilização *in vivo*<sup>5</sup>.

Os testes de citotoxicidade avaliam o efeito tóxico que o material pode causar em nível celular, desde alterações de membranas até a morte celular<sup>6</sup>. Estes testes avaliam a viabilidade celular, principalmente, por meio da incorporação de corantes vitais<sup>7</sup>.

Os fibroblastos de camundongos (L929) são as células mais indicadas para testes de citotoxicidade de biomateriais, por serem de fácil cultivo e permitir resultados com alta correlação biológica<sup>8</sup>. Apresentam morfologia fibroblastoide e são encontradas predominantemente em tecidos conectivos danificados apresentando grande importância na regeneração tecidual<sup>9</sup>.

O método colorimétrico mais utilizado é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-2-il)-5-difenil brometo de tetrazolio), método quantitativo que avalia a atividade mitocondrial através da redução do sal tetrazólio amarelo pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial. Esta redução acontece somente na mitocôndria de células que estão metabolicamente ativas<sup>10,11</sup>.

A viabilidade celular é obtida pela intensidade da coloração atingida, que é proporcional à quantidade de cristais de formazan produzidos que são quantificados por espectrofotometria<sup>10,11</sup>.

A produção de biomateriais a base de quitosana tem sido foco dos estudos, pois vem apresentando diferentes formas de aplicações em diversas formas físicas e por possibilitar modificações na sua estrutura química<sup>12,13</sup>. Pode ser empregada na obtenção de biomateriais para utilização como agente cicatrizador, bandagens, suturas, lentes de contatos, bioativos dentre outras aplicações<sup>12</sup>.

A quitosana é um polissacarídeo natural proveniente da desacetilação parcial da quitina, encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos. Apresenta cadeia linear composta de unidade de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina<sup>14,15</sup>. É um polímero

biocompatível e biodegradável, podendo ser metabolizadas por enzimas presentes no organismo como a lisozima<sup>16</sup>. Apresenta possibilidade de estimular a cicatrização de tecidos e alguns autores citam sua atividade antimicrobiana<sup>17,18</sup>.

O efeito antimicrobiano tem sido estudado por pesquisadores contra bactérias, fungos e leveduras, os quais têm relatado que este efeito é dependente de diferentes condições, como o tipo de quitosana utilizada, o grau de polimerização e outras características físico-químicas<sup>19,20</sup>.

A gelatina é muito usada na indústria de cosméticos, alimentos e fármacos devido às suas propriedades de formar filmes flexíveis e géis estáveis e termorreversíveis através da retenção de água. E também pelo baixo custo de produção<sup>21,22</sup>. É obtida por hidrólise controlada parcial do colágeno, por via ácida ou alcalina<sup>23</sup>.

O uso do óleo de pequi tem sido muito relatado pela população do cerrado brasileiro para tratamento de doenças respiratórias, úlceras gástricas e em lesões de pele, como queimaduras<sup>24</sup>, o que vem despertando interesse de pesquisadores.

Por apresentar compostos com propriedades antioxidantes<sup>25</sup> tem-se despertado o interesse em estudos experimentais utilizando óleo de pequi para testar atividades antifúngicas e antimicrobianas, apresentando-se resultados positivos<sup>26,27</sup>.

Existem pesquisas que relatam também a ação anti-inflamatória do óleo de pequi em aplicações tópicas de maneira dose-dependente<sup>28,29</sup>, e também processo cicatricial intensificado quando comparado ao grupo controle<sup>27,30</sup>.

Visto que a quitosana é um biopolímero com grande potencial de uso na produção de biomateriais e que o óleo de pequi apresenta características anti-inflamatórias e antimicrobianas, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação de citotoxicidade e da atividade antimicrobiana de membranas de quitosana, gelatina e óleo de pequi.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios de cultura celular foram realizados no Laboratório de Citocinas, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás.

Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos de camundongos (L929), adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro. O meio de cultura utilizado para o cultivo celular foi o meio RPMI (Sigma-R6504) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion - FB 0010S®), L-glutamina (Gibco 100x®), Hepes (Sigma H0763®), 2-

Mercaptoetanol (Sigma M6250®), estreptomicina (Sigma P7794®) e penicilina (Sigma S9137®).

Os fibroblastos são células que aderem à superfície de placas e frascos de cultura e crescem em monocamadas. As células permaneceram armazenadas em reservatório de nitrogênio líquido, congeladas a -70°C em meio com DMSO 5% (Mallinckrodt®). Para o experimento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas rapidamente ao banho-maria a 37°C para descongelar sob agitação.

No fluxo laminar, preparado adequadamente para o uso, a amostra foi colocada em tubo tipo Falcon estéril e, em seguida, acrescentou-se o meio RPMI completo gota a gota sob agitação. O frasco foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, a 10 °C, formando na parte inferior do frasco um pelete de células e na parte superior o meio de cultura sem células, o sobrenadante.

Em seguida foi desprezado o meio sobrenadante, vertendo rapidamente o tubo no descarte e feito a ressuspensão celular em 1 mL do meio até que a amostra ficasse homogênea. Na placa de seis poços estéril foi adicionado 3 mL de meio RPMI completo e adicionado a suspensão celular. As células foram mantidas em incubadora (Sanyo® Modelo COM - 5M) a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência desejada para o experimento (80-90%).

Com a confluência desejada, as células foram desaderidas da placa de cultura com o auxílio de uma pipeta e com a utilização do próprio meio de cultura da placa que foi aspirado e pipetado em movimentos circulares até a desaderência de todas as células. A solução foi transferida para um tubo de propietileno de 15 mL e então centrifugada por 10 minutos, a 1500 rpm e 10°C, formando na parte inferior do frasco um pelete de células e na parte superior o sobrenadante.

O meio sobrenadante foi descartado, vertendo rapidamente o tubo no descarte. Ao pelete foi adicionado 1 mL de novo meio de cultura RPMI completo e realizada a ressuspensão celular até manter a homogeneidade da amostra. Em seguida, foi realizada a contagem celular por meio da Câmara de *Neubauer*, determinando o volume da suspensão celular a ser utilizado no experimento.

A contagem das células viáveis foi realizada com o uso do corante azul de *trypan*, o qual cora células mortas. Em um recipiente adicionou-se 90 µL do corante e dez µL da suspensão celular homogeneizada, obtendo-se uma solução de 1/10. Após homogeneização desta amostra retirou-se uma alíquota de 10 µL, que foi cuidadosamente adicionada entre a lamínula e a câmara de *Neubauer*, preenchendo-a completamente para realização da contagem

com auxílio de microscópio. A contagem foi feita nos quatro quadrantes e o valor obtido foi dividido por quatro, obtendo-se a média dos quadrantes. O número de células contadas foi multiplicado pelo fator de correção da câmara ( $1 \times 10^4$ ), e pelo fator de diluição (10), obtendo-se a quantidade de células/mL.

Foram semeadas  $1 \times 10^4$  células por poço da placa de 96 poços a ser utilizada no experimento. Após 24 horas das células serem semeadas, as membranas foram divididas em grupos conforme demonstrado pelo quadro 1, e adicionadas aos poços, sendo a placa incubada em estufa a 37°C e em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

QUADRO 1 - Grupos do experimento realizado em cultura celular

| GRUPO | AMOSTRA                                                  |
|-------|----------------------------------------------------------|
| 1     | Controle de células                                      |
| 2     | Membrana de quitosana - MQG                              |
| 3     | Membrana de quitosana + 1,0 mL de óleo de pequi - MQGOP1 |
| 4     | Membrana de quitosana + 2,0 mL de óleo de pequi - MQGOP2 |
| 5     | Membrana de quitosana + 3,0 mL de óleo de pequi - MQGOP3 |

Cada grupo do experimento, representados pelo quadro 1, foi representado por duas placas, uma placa para avaliação em 24 horas e a outra para avaliação em 48 horas, com suas respectivas amostras. Em ambas as placas todos os tipos de amostras foram preparadas em duplicata e os testes foram realizados em três repetições. Todas as operações envolvidas no manuseio das células e de seus meios foram realizadas em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar.

A avaliação quantitativa da citotoxicidade foi feita por meio de testes de viabilidade celular com a utilização do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina). Após as 24 horas e 48 horas do tratamento, foi realizada a observação das placas no microscópio invertido e em seguida foi adicionados em cada poço 10 µL de MTT. As placas foram mantidas na incubadora por três horas, em seguida foi adicionado em cada poço SDS 10% (docedil sulfato de sódio) para a solubilização dos cristais formados.

Após 24 horas da adição do SDS, as placas foram removidas da incubadora e o conteúdo dos poços foram transferidos, com utilização de pipetas, para nova placa para a quantificação da densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm, pois a presença das membranas nos poços iria interferir nos valores obtidos pela espectrofotometria.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica das membranas produzidas foi realizado teste de difusão em disco em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Candida*.

Inicialmente foram preparados todos os meios necessários para o cultivo, replicação, expansão e demais soluções utilizadas no teste. Foram então distribuídos nos respectivos recipientes na quantidade necessária.

Os meios de replicação, específicos para cada micro-organismo, foram preparados respeitando-se a quantidade especificada de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. Os meios utilizados foram manitol para a replicação de *S. aureus* (ATTC 25923), Mac Conkey para *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), e meio Cled para replicação de *P. mirabilis* (nwp 0133).

O meio de Ágar Mueller Hinton foi utilizado para os testes de difusão em ágar, por apresentar boa reprodutibilidade nos testes e por suportar o crescimento da maioria dos micro-organismos. O meio líquido BHI (*brain heart infusion*) foi utilizado para o cultivo dos micro-organismos após o descongelamento, sendo o meio distribuído (5 mL) em tubos de ensaio 15x100mm.

O descongelamento das cepas foi realizado de forma rápida, em seguida, com o auxílio de uma alça flambada, foi realizada a homogeneização da amostra e retirado uma porção do conteúdo do tubo de polipropileno, utilizados em microcentrífugas. Com essa amostra, foi feita a replicação no meio apropriado, já armazenado em placa de Petri estéril, conforme o tipo da cepa utilizada. A semeadura foi feita por meio de estrias no Ágar, por esgotamento. As placas semeadas foram então armazenadas em estufa, a 37°C, por 24 horas, em aerobiose. A replicação da *Candida* foi realizada diretamente no meio nutriente.

Após decorrido tempo estabelecido para crescimento as cepas foram isoladas em ágar nutriente e incubadas sob as mesmas condições supracitadas.

Transcorridas as 24 horas, cada amostra de micro-organismos foi suspensa em solução de NaCl 0,9% estéril, até uma concentração de 0,5 na escala *MacFarland*, e então os inóculos foram distribuídos uniformemente sobre a superfície das placas com ágar Müller Hinton com auxílio de swab esterilizado. Os discos das membranas foram dispostos na

superfície do ágar. Em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. Após este período, as zonas de inibição de crescimento em torno dos discos foram medidas para avaliação da inibição de crescimento. Todo o teste foi realizado em triplicata.

### 3. RESULTADOS

Os resultados do teste demonstram que em 24 horas as membranas de quitosana e gelatina (MQG) e quitosana, gelatina e óleo de pequi em diferentes concentrações (MQGOP1, MQGOP2 e MQGOP3) não diferiram do controle negativo, apresentando-se, portanto, não citotóxica. No entanto, em 48 horas de contato, as membranas de quitosana e gelatina e quitosana, gelatina e óleo de pequi apresentaram-se citotóxicas, com diferença significativa com o grupo controle. Entre as membranas de quitosana e gelatina e quitosana, gelatina e óleo de pequi em diferentes concentrações não houve diferença significativa.

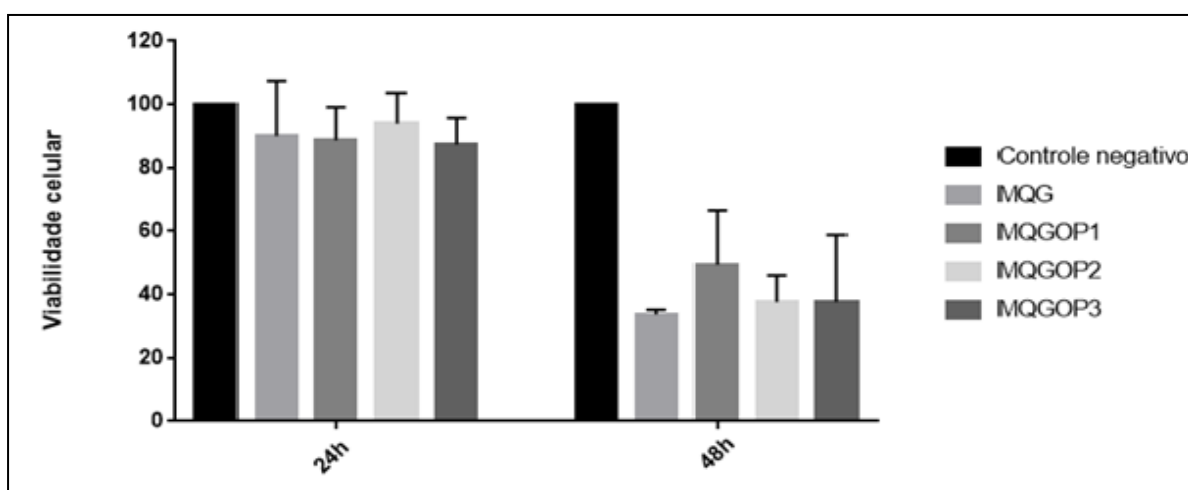


FIGURA 1 - Gráfico representativo da viabilidade celular das células L929 em diferentes grupos e em dois momentos (24 e 48 horas). Sendo MQG a membrana de quitosana e gelatina, MQGOP1 Membrana de quitosana + 1,0 mL de óleo de pequi, MQGOP2 Membrana de quitosana + 2,0 mL de óleo de pequi e MQGOP3 Membrana de quitosana + 3,0 mL de óleo de pequi

Como demonstrado na figura 2, no teste de difusão em disco realizado com culturas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e cultura fúngica de *Candida*, não foi observado a formação de halo, portanto não houve ação bactericida/bacteriostática nem fungicida/fungistática para as espécies utilizadas.



Figura 2 – Placa de Petri com cultura bacteriana de *S. aureus* representando o teste de difusão em disco em triplicata. Pode-se observar a não formação de halo

#### 4. DISCUSSÃO

Os testes de citotoxicidade demonstraram que as membranas contendo ou não óleo de pequi não foram tóxicas aos fibroblastos nas primeiras 24 horas, mas sim em 48 horas. Portanto, parece haver citotoxicidade dependente do tempo de exposição. No entanto, não houve diferença da viabilidade celular entre membranas contendo óleo e membranas sem óleo. Dessa forma, é possível inferir que a toxicidade não é proveniente do óleo de pequi, mas sim de um dos componentes restantes, seja a quitosana ou a gelatina.

As avaliações de citotoxicidade da quitosana, em diferentes formatos, estruturas e formas de obtenção demonstram grande variedade de resultados de citotoxicidade. Huang et al.<sup>31</sup> avaliaram a influência do peso molecular e do grau de desacetilação da quitosana, verificando que há influência dos dois parâmetros na toxicidade de fibroblastos. Na avaliação de quitosana nanoestruturada, Zaky<sup>32</sup> verificaram citotoxicidade das partículas, atribuindo à influência da concentração e peso molecular da quitosana. Estes fatores interferem no potencial zeta e tamanho das partículas e consequentemente na interação com a membrana celular.

Outros autores verificaram a citotoxicidade da quitosana e quitosana associado a outro material, obtendo resultados promissores quanto à biocompatibilidade. Fernandes et al.<sup>33</sup> avaliaram a quitosana com grau de desacetilação de 80% e quitosana com colágeno, verificando que não há citotoxicidade dos materiais separados ou associados. Marangon<sup>34</sup>

verificou que o gel de quitosana de alto peso molecular e gel de quitosana associada à gelatina não foram citotóxicos. Além disso, a autora verificou a associação da quitosana, gelatina e óleo de copaíba e do óleo separadamente. Apesar do óleo apresentar-se citotóxico, quando associado com a quitosana e gelatina, apresentou viabilidade celular de 78%.

No presente trabalho, não foi possível realizar os testes de citotoxicidade com a quitosana, a gelatina e o óleo de pequi de forma separada padronizando-se no mesmo tipo de teste. A utilização do gel de quitosana somente seria possível com pH próximo de 5, o que poderia interferir nos resultados, uma vez que a quitosana na forma de membrana apresenta pH mais alto. O trabalho executado por Marangon<sup>44</sup> verificou a atividade da quitosana, gelatina e óleo de copaíba na forma de emulsão, diferentemente da proposta deste trabalho, no qual obteve-se biomaterial sólido no formato de membrana, de quitosana, gelatina e óleo de pequi.

Além disso, os autores citados, que trabalharam com a quitosana ou quitosana, gelatina e associação com outro material ou óleo, realizaram os testes de citotoxicidade indireto, no qual os materiais são colocados em contato com meio de cultura celular e utiliza-se o extrato deste meio para em contato com as células. Neste trabalho, optou-se por avaliar as membranas de quitosana, gelatina e óleo de pequi pelo teste de citotoxicidade direto, inserindo a membrana em contato com as células, o que pode explicar, em parte a elevada citotoxicidade, divergindo dos resultados de outros pesquisadores.

Os testes de atividade antimicrobiana das membranas de quitosana e gelatina e quitosana, gelatina e óleo de pequi demonstraram não haver ação contra os micro-organismos utilizados. Foster e Butt<sup>34</sup> utilizaram filmes de quitosana em testes de atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* e obtiveram resultado semelhante, concluindo não haver efeito inibitório. No entanto, quando testaram as soluções de quitosana utilizadas para a preparação dos filmes, obtiveram inibição acima de 98%. Os autores atribuíram a atividade bactericida, principalmente, à acidez das soluções de quitosana, com pH 5. Além disso, os mesmos autores ressaltam que atribuir atividade antimicrobiana a todos os dispositivos confeccionados a partir de quitosana é um equívoco, pois diversos fatores, formatos e estruturas que influenciam diretamente nesta atividade.

Quanto à atividade antimicrobiana da quitosana, foram propostos três modelos, sendo o mais aceitável a interação entre moléculas de quitosana carregadas positivamente e membranas de células carregadas negativamente. Neste modelo, a interação é mediada pelas forças eletrostáticas entre os grupos protonados de  $\text{NH}^{+3}$  e os resíduos negativos, ao competir com  $\text{Ca}^{2+}$  para sítios eletronegativos na superfície da membrana do micro-organismo. Esta

interação eletrostática promove mudanças nas propriedades da permeabilidade da parede da membrana, provocando desequilíbrios osmóticos internos e consequentemente inibem o crescimento de micro-organismos e causam hidrólise dos peptideoglicanos na parede de microorganismos, levando ao extravazamento de eletrólitos intracelulares, tais como íons de potássio, proteínas, ácidos nucleicos e glicose. Além disso, a utilização de derivados da quitosana solúveis em água aumentam a atividade antimicrobiana<sup>35,36</sup>.

Neste trabalho, a composição em membrana de quitosana e gelatina e quitosana, gelatina e óleo de pequi, não houve solubilização do material, confinando a quitosana à estrutura composta pelos outros materiais, explicando, pelo menos em parte, não ter havido ação antimicrobiana. De forma semelhante, o óleo de pequi, citado na literatura como bactericida e fungicida, manteve-se confinado na estrutura da membrana e não interagiu com os micro-organismos<sup>25,37</sup>. Este fato não ocorre quando a quitosana entra em contato com fluidos orgânicos, uma vez que a ação da lisozima cliva as moléculas de quitosana, tornando-a solúvel e permitindo contato com micro-organismos.

Portanto, apesar do resultado negativo quanto à atividade antimicrobiana da membrana de quitosana, gelatina e óleo de pequi, novas avaliações devem ser realizadas, considerando a solubilização da membrana ou a clivagem da quitosana em lisozima, permitindo a liberação das moléculas de quitosana, gelatina e óleo de pequi para simular as condições do organismo animal.

## 5. CONCLUSÃO

As membranas de quitosana, gelatina e óleo de pequi são citotóxicas para cultura celular de fibroblastos em 48 horas de contato direto e não apresentam atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

1. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Rev. Quim Nova*. 2010; 33(6):1352-8.
2. Wong JY, Bronzino JD. *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press; 2007. 296p.
3. Chung WJ, Oh JW, Kwak K, Lee BY, Meyer J, Wang E, Hexeer A, Lee SW. Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature*. 2011; 478:364-68.
4. Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Scienc*. 2016; 53:86-168.

5. International Organization For Standardization. ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices. Genève, 2009.
6. Amaral RH, Rogero SO, Cruz AS, Lugao AB. Caracterização físico-química e biocompatibilidade in vitro de membranas de hidrogel. Anais do Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais; 2008. [acesso 8 set 2017]. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2008/eventos/13479.pdf>.
7. Rogero SO, Higa OZ, Saiki M, Correa OV, Costa I. Toxicology in Vitro. 2000;14(6):497-504.
8. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2 ed. Amsterdam: Elsevier; 2004. P.67.
9. Pan H, Jiang HL, Chen WL. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. Biomaterials. 2006;27(17):3209-20.
10. Tang LL, Liu H, Wang YL, Xian CY, Su AH. Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007;57(2):215-8.
11. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Técnicas Básicas em Culturas de Células. 4 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004. p. 10-12.
12. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. React. Funct. Polym. 2000;46:1- 27.
13. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2004;57:19–34.
14. Moura C, Muszinski P, Schmidt C, Almeida J, Pinto L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. Revista de Ciências Exatas e Engenharias. 2005;15(1):7-17.
15. Azevedo VVC, Costa ACFM, Chaves AS, Bezerra DC, Fook MVL. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. 2007;2:27-34.
16. Campana SPF. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -Quitina. Química Nova. 2007;30(3):644-50.
17. Rodrigues AP, Sanchez EMS, Costa AC, Moraes AM. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. Journal of Applied Polymer Science. 2008;109:2703-10.
18. Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, Satsangi N. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2009;20:537–42.
19. Oliveira, R.A. Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação da quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans*. [dissertação mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004. [acesso 02 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-19012005-103055/pt-br.php>.
20. Silva, GL. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatogenos: *Salmonella enteric*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*. [dissertação de mestrado]. São Carlos:

- Universidade de São Paulo; 2005. [acesso 10 set 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006-095954/pt-br.php>.
21. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*. 2001;22:763-68.
  22. Roman JA, Sgarbieri VC. Caracterização Físico-química do Isolado Protéico de Soro de Leite e Gelatina de Origem Bovina. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2007;10(2):137-43.
  23. Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001;41(6):481-92.
  24. Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2006. 640p.
  25. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GA. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 2008;27(1):53-60.
  26. Soares NR. Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de sabonete líquido à base de óleo de baru, buriti e pequi. [dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013. [acesso 05 out 2017]. Disponível em: [https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3885?locale=pt\\_BR](https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3885?locale=pt_BR).
  27. Rabbers AS. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de compósito a base de colágeno e óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). [dissertação de mestrado]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2016. [acesso 31 out 2017]. Disponível em: [https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_ANDRESSA\\_SABINE.pdf](https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/DISSERTA%C3%87%C3%83O_ANDRESSA_SABINE.pdf).
  28. Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Mota EF, Lima-Verde IA, Pinheiro FGM, Campello CC, Moraes SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* wittm. Seeds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;129:214-19.
  29. Diniz DM. Atividade anti-inflamatória de microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.). [trabalho de conclusão de curso]. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba. [acesso e, 12 set 2017]. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/8235>.
  30. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arquivo do Instituto Biológico*. 2010; 77(3):441-7.
  31. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res*. 2004;21(2):344-53.
  32. Zaki SSO, Ibrahim MN, Katas H. Particle Size Affects Concentration-Dependent Cytotoxicity of Chitosan Nanoparticles towards Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Drug Delivery and Novel Targeting Research Group*. 2015.
  33. Marangon CA. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana, gelatina e óleo de copaíba. [dissertação de mestrado]. São Carlos: Universidade

- Estadual de São Paulo; 2015. [acesso 02 out 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-03102017-152846/pt-br.php>.
34. Foster LJ, Butt J. Chitosan films are not antimicrobial. *Biotechnology letters*. 2011;33(2):417-21.
  35. Goy RC, Moraes STB, Assis, OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2016;26(1).
  36. Bessa-Junior AP, Gonçalves AA. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. *Acta Fish. Aquat. Res*. 2013;1(1):13-28.
  37. Passos XS, Costa M, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos AA, Ferri PH, Santos SC, Silva MRR. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma capsulatum*. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*. 2001;60:71.

## CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das condições em que este trabalho foi realizado foi possível obter um material com aspecto de membrana a partir da junção da quitosana, óleo de pequi e gelatina, cujas características demonstram ser aplicáveis em tecidos vivos. No entanto, os resultados dos testes de citotoxicidade e atividade antimicrobiana não foram satisfatórios, demonstrando, aparentemente, que o material possa não apresentar biocompatibilidade quando *in vivo*.

Em face destes resultados, é necessário considerar que os testes selecionados, particularmente o de citotoxicidade de contato direto, é realizado com o material sólido em contato com as células e pode gerar informações muito diversas das observadas em testes de contato indireto, conforme discutiu-se nos artigos gerados a partir deste trabalho. Além disso, este trabalho encontrou indícios da citotoxicidade da quitosana, observada por outros autores em algumas formulações da quitosana, fato este que deve ser melhor investigado. De forma semelhante, os testes de atividade antimicrobiana podem ter revelado resultados diversos ao que aconteceriam *in vivo*. O material sólido em contato com os microrganismos não liberou substâncias, o que não ocorreria com a clivagem da quitosana pela lisozima, quando em contato com fluídos orgânicos.

Para ambos os testes, não se deve considerar que foram equivocadamente selecionados para a caracterização das membranas, uma vez que são recomendados na literatura científica e nas normas de caracterização *in vitro* de biomateriais. Soma-se a isto, o enfrentamento da dificuldade técnica em poder realizar os mesmos testes com os componentes em separado, bem como após o contato com enzimas que permitiriam sua degradação.

Portanto, se considera que houve contribuições pela obtenção e caracterização do material assim como na verificação inicial da biocompatibilidade *in vitro*, levantando questionamentos sobre o consenso geral de biocompatibilidade da quitosana e os efeitos do óleo de pequi. Foram percebidas lacunas das técnicas utilizadas, que não respondem aos questionamentos iniciais da biocompatibilidade mas que se somarão ao conhecimento sobre as diferenças entre a utilização das diversas técnicas e diferenças da experimentação *in vitro* e *in vivo*.

De forma geral, as respostas que não foram obtidas com este trabalho direcionam para novos estudos e técnicas que permitam a avaliação da citotoxicidade por outros métodos, como o de contato indireto com cada material isoladamente e em conjunto, bem como pela

avaliação da atividade antimicrobiana seguindo os mesmos parâmetros. Para este segundo teste, também é interessante realizar a degradação enzimática das membranas quando em contato com a cultura de microrganismos, na tentativa de simular da melhor forma a interface com organismos vivos.

Os projetos futuros pretendem, portanto, estudar melhor a biocompatibilidade *in vitro* das membranas confeccionadas e compreender os efeitos quando em contato com fibroblastos e microrganismos.