

INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PIAUI



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM
INCORPORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DO
Chenopodium ambrosioides PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

FRANCISCA DE FÁTIMA DOS ANJOS

**Orientadora: Profa. Dr^a. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo
Co-Orientador: Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo**

TERESINA

2017

FRANCISCA DE FÁTIMA DOS ANJOS

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM
INCORPORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DO
Chenopodium ambrosioides PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Caracterização e processamento de materiais.

Orientadora: Profa. Dr^a. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo
Co-Orientador: Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo

TERESINA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

617p DOS ANJOS, FRANCISCA DE FATIMA
PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM
INCORPORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DO *Chenopodium*
ambrosioides PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL / FRANCISCA DE FATIMA
DOS ANJOS - 2017.
74 f. : il. p&b.

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, Mestrado em Engenharia de Materiais,
2017.

Orientadora : Profa Dra. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo.
Coorientadora : Profa Dra. Haroldo Reis Alves de Macêdo.

1. *Chenopodium ambrosioides*. 2. Quitosana. 3. Membrana. I. Título.

CDD 620.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DE *Chenopodium ambrsioides* PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL”

ALUNO (A): FRANCISCA DE FÁTIMA DOS ANJOS

DATA: 18 de agosto de 2017

Este trabalho foi julgado adequado e aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí:

Assinado no original

Prof. Dr. Hudson Chagas dos Santos

Coordenador do PPG-EM/IFPI- Campus Teresina Central

COMISSÃO EXAMINADORA

Assinado no original

Prof. Dr^a. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí
Orientadora

Assinado no original

Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Maranhão
Avaliador Interno

Assinado no original

Prof. Dr. Haroldo Reis Alves Macêdo

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Maranhão
Avaliador Interno

Assinado no original

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí
Avaliadora Externo

Teresina-PI, 23 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua infinita bondade e à família dos Anjos pela base e apoio inquestionável.

À professora Dra. Marina Macêdo por sua orientação e sempre acreditar em meu trabalho.

Ao professor Dr. Haroldo Macêdo por sua co-orientação e estar sempre disponível para sugestões neste trabalho.

Aos professores Dr. Nilton Maciel (UFMA) e Dr. José Tatmatsu (UFC) por me inserirem no campo da pesquisa ainda na graduação, pela confiança depositada ao longo de todos esses anos e pelo envio de cartas de recomendações para o seletivo desse mestrado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí- FAPEPI pela oportunidade de cursar este mestrado na cidade onde resido.

Aos professores do PPGEM-IFPI, em especial professor Dr. Luiz Fernando Meneses, Dr. Galber Viana e Dr. Mário Alberto Altoé (UFES) por suas importantes contribuições neste trabalho. Ao professor Dr. José Joaquim por ceder seu laboratório. E à sua orientanda Maria das Dores pela solicitude.

Aos professores da UFPI, Dr. Francisco Leal, pelo carinho com o qual cedeu o material vegetal, Dr. Fernando Aécio, por sua grande destreza na docência, por ser sempre solícito e por suas orientações. E ao seu orientando Michel Mualém, por realizar o teste de citotoxicidade. Ao Dr. Lívio Nunes, pela atenção e por doar seu laboratório.

Ao professor Francisco Soares (UESPI) pela atenção e identificação do vegetal utilizado nesta pesquisa.

Aos técnicos do IFPI, Max Wagno, Carlos Eduardo Nunes e ao Douglas Sousa, amigo de grande valia que contribuiu imensamente para essa pesquisa. .
técnicos da UFPI, Bernado Ferreira, Leandro Miranda e Edgar Araújo, e A
Carvalho (UESPI) pela atenção e solicitude.

Aos servidores do IFPI, em especial os vigilantes, Sr. Adão dos Santos, Jacilúcio Araújo e os demais, que muitas vezes abriram ou fecharam o portão para que eu pudesse desenvolver meus experimentos.

À minha turma de mestrado, em especial Yuri Lima, João Porto, Nelson Rios, Mário Viana, James Gomes e Rayssilane Cardoso, pela convivência, amizade e apoio compartilhados. Ao grupo de biomateriais por compartilhar conhecimentos, em especial Thiara Lorena e Mayrana Sousa.

Aos amigos, Oscar Correia, Adriana, Pauline Sousa, Suellen Patrício, Jessé Fialho, Alessandra Freitas, Thaísa Cardoso, Ricardo Araújo, Kaio Barros (amigo e professor de inglês), David Guimarães, Ronney Brandão e Rafael Soares por dividirem angústias e êxitos dessa pesquisa. Ao Me. Edmilson Araújo por me apresentar essa pós-graduação, pela amizade antiga e preciosa colaboração neste trabalho.

À minha psicóloga, Jennifer, por me ajudar a compreender meu universo e a superar desafios.

À minha mãe, Maria de Fátima dos Anjos, e mãe-vó, Francisca Ferreira Lima, pelo amor infinito, apoio incondicional e por sempre apostarem em minha educação. Aos familiares, em especial, Joanka dos Anjos (irmã), Agostinho Vieira (pai), Suelane Vieira, Suellen Vanessa, Lilian dos Anjos e Raimunda dos Anjos.

RESUMO

O desafio para obter biomateriais cicatrizantes é o desenvolvimento de um biomaterial com característica adequada ao tratamento e que seja produzido com matéria prima renovável, de baixo custo e de fácil obtenção. O objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar membranas de quitosana com incorporação de extrato hidroalcóolico liofilizado de *Chenopodium ambrosioides* L. para aplicação como biomaterial cicatrizante. Para preparar as membranas puras (mem Q/P) utilizou-se o pó de quitosana e ácido acético. Enquanto que para as membranas incorporadas (mem Q/E) foi acrescentado 0,5% e 1% do extrato hidroalcoólico de *C.ambrosioides* à mesma formulação das membranas puras. Para caracterização do extrato de *C.ambrosioides* utilizou-se a *Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier* (FTIR). As membranas foram caracterizadas por FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), teste absorção em água e teste de molhabilidade (técnica da gota séssil). A citotoxicidade das membranas foi avaliada pelo teste MTT em macrófagos murinos e citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro. Foram obtidas membranas com aspecto macroscópico: contínuas, homogêneas e flexíveis. O FTIR mostrou que a banda de ligação O–H sofreu um alargamento nas mem Q/E. As análises de MEV para mem Q/E revelou uma morfologia mais heterogêneas do que a mem Q/P e a presença de poros nas membranas com menor concentração do extrato (mem Q/E 0,5%). As análises de TGA e DSC mostraram comportamentos térmicos semelhantes nas mem Q/P e mem Q/E 0,5% e maior estabilidade térmica para a mem Q/E 1%. As membranas com extrato incorporado absorveram mais água que as membranas puras. O ensaio de molhabilidade evidenciou que todas as amostras apresentaram caráter hidrofílico e que as componentes polar e total aumentaram com a presença do extrato. O teste de citotoxicidade MTT em macrófagos murinos e citotoxicidade em eritrócitos de carneiros mostrou que as membranas não apresentaram citotoxicidade. Assim, sugere-se que as membranas Q/E apresentam condições satisfatórias para aplicação como curativo cicatrizante dérmico.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*. Quitosana. Membrana.

ABSTRACT

The challenge to obtain healing biomaterials is developing biomaterial with appropriate characteristics to the treatment. In addition, materials from renewable sources with easy and inexpensive production process are desirable. Therefore, the purpose of this work was to produce and characterize chitosan based membranes with the incorporation of lyophilized hydroalcoholic extract of *Chenopodium ambrosioides* to its use as cicatrizing biomaterial. Chitosan power and acetic acid was used for the preparation of the pure membranes (mem P/C). Incorporated membranes (mem E/C) were produced by adding 0.5% and 1% of hydroalcoholic extract of *C.ambrosioides* to the same formulation of the pure membranes. It was used Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy to characterize the *C. ambrosioides* extract. The membranes were characterized by FTIR, Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Exploration Calorimetry (DSC), water absorption test and wettability test (sessile gout technique). The cytotoxicity of the membranes was evaluated by the MTT test and cytotoxicity on sheep erythrocytes. Membranes with macroscopic appearance were obtained: continuous, homogeneous and flexible. The FTIR showed that the O–H binding band was widened in the membranes E/C. Regarding mem C/E the SEM revealed morphology more heterogeneous than mem P/C and the presence of pores in membranes with lower concentration of extract (mem E/C 0.5%). TGA and DSC analysis showed similar thermal behavior for both the P/C and mem c/e 0.5% and higher thermal stability for 1% E/C membranes. Membranes with incorporated extract absorbed more water than pure membranes. The wettability test showed that all the samples had a hydrophilic character and that the surface tension and polar component increased with the presence of the extract. The MTT test in murine macrophages and cytotoxicity in sheep erythrocytes shows no cytotoxicity to the membranes. Thus membranes E/C present satisfactory conditions for application as a dermal healing dressing

Key words: *Chenopodium ambrosioides*. Chitosan. Membrane.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécie <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	20
Figura 2 – Estrutura da quitina e quitosana.....	23
Figura 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa.....	27
Figura 4 – Informações sobre o pó da quitosana	28
Figura 5 – Processo de obtenção do extrato de <i>C. ambrosioides</i>	29
Figura 6 – Preparo das membranas puras e com incorporação do extrato	30
Figura 7 – Membranas de quitosana (mem Q/P), membranas com extrato (mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%).....	33
Figura 8 – Obtenção do ângulo de contato no Programa Surftens	34
Figura 9 – FTIR do pó das folhas de <i>C. ambrosioides</i> (CAPÓ) e extrato de <i>C. ambrosioides</i> (extrato CA).....	38
Figura 10 – FTIR do pó da quitosana- QUI PÓ	40
Figura 11 – Aspecto macroscópico das (a) mem Q/P, (b) Q/E 0,5% e (c) mem Q/E 1%	41
Figura 12 – Espectroscopia de infravermelho da interação das membranas.....	42
Figura 13 – Micrografia do pó das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (5000x)....	43
Figura 14 – Micrografia do pó da quitosana-QUI PÓ(500x).....	43
Figura 15 – Micrografia das membranas Q/P; Q/E 0,5% e Mem Q/E 1%, com magnificação 5000X.....	44
Figura 16 – Micrografia transversal das membranas com magnificação de 2.500x. .	45
Figura 17 – Curva termogravimétrica do CA PÓ e Extrato CA.	46
Figura 18 – Derivada Termogravimétrica (DTG) do CA PÓ e Extrato CA.....	47
Figura 19– Curva termogravimétrica e DTG do QUI PÓ	47
Figura 20 – Curva termogravimétrica das membranas de quitosana sem o extrato (mem Q/P) e membranas com a incorporação do extrato mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%.	49

Figura 21 – Derivada termogravimétrica (DTG) das membranas de quitosana sem o extrato (mem Q/P) membranas com a incorporação do extrato mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%.....	49
Figura 22 – Curva DSC do CA pó, extrato CA, QUI PÓ, mem Q/P,mem Q/E 0,5% e 1%	52
Figura 23 – Análise do prcentageual do ganho massa nas membranas puras (mem Q/P)	54
Figura 24 – Dinâmica da molhabilidade em água nas membranas (mem Q/P/ mem Q/E 0,5%, mem Q/E 1%)	56
Figura 25 – Componente total, componente polar e dispersiva. O experimento foi realizado em triplicata ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$	57
Figura 26 – Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos murinos das membranas de quitosana pura (mem Q/P); membranas de quitosana com incorporação de 0,5% do extrato <i>C.ambrosioides</i> (mem Q/E 0,5%) e membranas de quitosana com incorporação de 1% de extrato <i>C. Ambrosioides</i> (mem Q/E 1%). O grupo controle foi composto por macrófagos. Os dados representam a média da triplicata das amostras com * $p < 0,05$	59
Figura 27 – Porcentagem de viabilidade celular de eritrócitos de carneiros das membranas de quitosana pura (mem Q/P); membranas de quitosana com incorporação de 0,5% do extrato <i>C.ambrosioides</i> (mem Q/E 0,5%) e membranas de quitosana com incorporação de 1% de extrato <i>C. ambrosioides</i> (mem Q/E 1%). O grupo controle foi composto por eritrócitos em PBS. Os dados representam a média da triplicata das amostras com * $p < 0,05$	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão taxonômica do <i>C. ambrosioides</i>	19
Quadro 2 – Atividades biológicas da espécie <i>C. ambrosioides</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores energia de superfície, da componente polar e componente dispersiva da água, formamida e glicerina.	35
Tabela 2 – Temperaturas e valores de ΔH envolvidos nos picos endotérmicos exotérmicos do pó de <i>C. ambrosioides</i>	51
Tabela 3 – Temperaturas e valores de ΔH envolvidos nos picos endotérmicos e exotérmicos das membranas.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA –	Análise de variância
APG –	Grupo de Filogenia das Angiospérmicas
CA PÓ –	Pó da folha de <i>Chenopodium ambrosioides</i>
CC ₅₀ –	Concentração citotóxica média
CEEA –	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CH ₅₀ –	Concentração hemolítica média
CI ₅₀ –	Concentração inibitória média
DMA –	Análise Mecânica Dinâmica
DRX –	Difração de Raios X
DSC –	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
Extrato CA	Extrato de <i>Chenopodium ambrosioides</i>
FRX –	Fluorescência de Raios– X
FTIR –	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GC/EM –	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa acoplada
mem –	Mssaqembrana
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT –	3 –[4,5–dimetiltiazol–2–il]–2,5–difeniltetrazolium brometo
m _s –	Massa seca
m _u –	Massa úmida
NaOH –	Hidróxido de sódio
NUPLAM –	Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais
pH –	Potencial hidrogeniônico
Q/E –	Quitosana com Extrato
Q/P –	Quitosana Pura
QUI PÓ	Pó da quitosana
RENISUS–	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
T _{endset} –	Temperatura onde a transição finaliza o desvio da linha de base
T _{onset} –	Temperatura onde a transição inicia o desvio da linha de base
T _{pico} –	Temperatura máxima do pico

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{\AA}$ –	<i>Angström</i>
γ^d –	Componente dispersiva da energia de superfície
γ^p –	Componente polar da energia de superfície
ΔH –	Variação de entalpia
θ –	Ângulo de contato
μ –	<i>Micro</i>
mJ/m^2 –	<i>MiliJoule</i> por metro quadrado
KBr –	Brometo de potássio
kV –	Quilovolt
mA –	<i>Miliampère</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	18
2.2	ESPÉCIE VEGETAL <i>Chenopodium ambrosioides</i>	18
2.2.1	Composição química da espécie	20
2.2.2	Atividades farmacológicas	22
2.3	QUITOSANA.....	23
2.3.1	Propriedades biológicas.....	24
2.3.2	Quitosana e a incorporação de extratos vegetais	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAL	27
3.1.1	Matéria prima.....	27
3.1.2	Coleta do material vegetal e preparação da exsicata	28
3.1.3	Preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>C. ambrosioides</i>	28
3.1.4	Preparo das membranas.....	29
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
3.2.1	Espectroscopia no infravermelho	30
3.2.2	Microscopia eletrônica de varredura – MEV.....	31
3.2.3	Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	31
3.2.4	Análise Termogravimetria –TGA	31
3.2.5	O pH de superfície.....	32
3.2.6	Ensaio de absorção de água	32
3.2.7	Molhabilidade das membranas	33
3.2.8	Avaliação da citotoxicidade in vitro	35
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

4.1	EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Chenopodium ambrosioides</i>	38
4.2	QUITOSANA EM PÓ	39
4.3	PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS DAS MEMBRANAS	40
4.4	pH	41
4.5	ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO DAS MEMBRANAS	41
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	42
4.7	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	46
4.8	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	50
4.9	ABSORÇÃO DE ÁGUA.....	54
4.10	MOLHABILIDADE	55
4.11	CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS PELO TESTE DO MTT	58
4.12	CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS DE CARNEIROS	60
5	CONCLUSÕES	63
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA COM USO DE ANIMAIS-UFPI.....	74

1 INTRODUÇÃO

Chenopodium ambrosioides L. (mastruz), é uma espécie medicinal de ocorrência em todo o Brasil (MATOS, 1993). Sua composição química é influenciada por fatores como localização de coleta e características do solo (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). A ação cicatrizante dessa planta foi descrita na literatura com a validação de um medicamento fitoterápico na regeneração óssea (PINHEIRO NETO et al., 2013), em estudos *in vitro* (SONG et al., 2015) e *in vivo* em modelo de feridas cutâneas com efetiva cicatrização e reparo da ferida (SÉRVIO et al., 2011; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013). Além de relevantes efeitos cicatrizantes em feridas orais (LISBOA NETO et al., 1998).

A quitosana é outro derivado natural com atividade cicatrizante, um dos biopolímeros mais abundantes na natureza com evidências em pesquisas médicas devido a sua capacidade reparadora tecidual (KHA; PEH, 2003; AZEVEDO et al., 2007). Esse polímero é um material biocompatível, de baixa toxicidade e biodegradável (GE et al., 2004). As membranas desse biopolímero possuem boa resistência mecânica e permeabilidade molecular seletiva, por isso, são utilizadas na produção de pele artificial e em curativos para ferimentos (CHEN et al., 2002). Estudos apontam que a quitosana tem capacidade de favorecer neoformação óssea (ORZELANNY et al., 2010) e aceleração no processo cicatrizante de lesões (MUZZARELLI, 1997; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

O desafio na área da cicatrização é o desenvolvimento de biomateriais que possuam características adequadas ao tratamento e que sejam produzidos com matérias-primas renováveis, econômicas e de fácil obtenção. A utilização de biomateriais poliméricos pela indústria farmoquímica tem-se destacado pelo uso e aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil acesso (TRINDADE, 2006).

A escolha da *C. ambrosioides* para esta pesquisa deve-se ao seu potencial cicatrizante e interesse do sistema de saúde brasileiro nesse material botânico. O mastruz encontra-se na 17ª posição na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009). Além disto, tanto a quitosana quanto essa espécie vegetal são produtos naturais obtidos a baixo custo e de fácil extração. E a incorporação do extrato de *Chenopodium ambrosioides* pode melhorar as

características das membranas de quitosana colaborando para o desenvolvimento de um biomaterial alternativo mais efetivo na cicatrização dérmica.

Assim, o objetivo deste estudo foi preparar membranas de quitosana com incorporação de extrato hidroalcoólico liofilizado de *C. ambrosioides* e caracterizá-las através de: espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Análise Termogravimétrica (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), ensaio absorção em água, teste de molhabilidade, teste MTT em macrófagos murinos e citotoxicidade em eritrócitos de carneiro com o propósito de utilizá-las como um possível biomaterial cicatrizante dérmico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Historicamente, as plantas medicinais foram utilizadas pelas antigas civilizações na cura e tratamento de doenças (BADKE et al., 2011). No contexto atual, sabe-se que esse recurso terapêutico é acessível, disponível e culturalmente aceito na medicina popular (WHO, 2014). O emprego dessas plantas na cicatrização foi elucidado no estudo de Piriz et al. (2014). Esse reportou que das 52 (cinquenta e duas) plantas medicinais estudadas experimentalmente ou clinicamente 46 (quarenta e seis) apresentaram potencial elevado de cicatrização de feridas. Dentre essas plantas com potencial cicatrizante, destaca-se a *Chenopodium ambrosioides* (SÉRVIO et al., 2011; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013).

O Mistério da Saúde brasileiro implementou políticas de relacionadas a plantas medicinais e fitoterápicos, tais como: a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b). Essas políticas visam estimular o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais para o cuidado com a saúde de forma eficaz e segura.

Outra abordagem do Ministério da Saúde brasileiro é a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Essa relação contém 71(setenta e uma) plantas medicinais que devem ser objeto de pesquisa e implementação dos setores e serviços de saúde públicos brasileiros (Brasil, 2009). A espécie *C. ambrosioides* encontra-se na 17ª posição RENISUS.

2.2 ESPÉCIE VEGETAL *Chenopodium ambrosioides*

Chenopodium ambrosioides Lineu é uma planta medicinal herbácea, originária da América do Sul de ocorrência em todo o Brasil (CHEVALLIER, 1996), conhecida popularmente como: erva Santa Maria, mastruço e mastruz (MATOS, 1993; TRINDADE et al., 2015). A divisão taxonômica desse vegetal descrita por Corrêa (1984) com atualização da família proposta pelo APG IV (2016) está exposta no quadro 1.

Quadro 1 - Divisão taxonômica do *C. ambrosioides*

Reino	Vegetal
Divisão:	<i>Angiosperma</i>
Classe:	<i>Dicotyledoneae</i>
Sub-classe:	<i>Archichlamydeae</i>
Ordem:	<i>Centrospermae</i>
Família:	<i>Amaranthaceae*</i>
Gênero:	<i>Chenopodium</i>
Espécie:	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.

Fonte: Corrêa (1984) com classificação da família * atualizada pelo APG IV (2016).

Essa espécie possui caule ereto variando a altura de 0,20 a 1,50 m, sulcado e muito ramificado. Seus ramos floríferos são delgados e muito folhosos, de coloração verde-clara ou verde-amarelada, lustrosos. Suas folhas são alternas, oblongas, compridas, lanceoladas, agudas ou obtusamente insinuosas, denteadas, raramente inteiras, glabras na face superior e um pouco hirsutas na face inferior (FIGURA 1). Possui inflorescência em glomérulos de muitas flores, muito pequenas e verde-amareladas. Essa planta ainda possui fruto envolto no cálice e sementes muito pequenas, pretas e lustrosas (CORREA, 1984; PINHEIRO NETO et al., 2013).

Figura 1 - Espécie *Chenopodium ambrosioides* L.



Fonte: Autora (2017).

A *C. ambrosioides* pode ser cultivada em jardins, quintais ou áreas agrícolas (BLANCKAERT et al., 2012). Seu desenvolvimento é favorecido por uma boa iluminação, tornando mais evidente em algumas regiões e épocas de dias longos. Ela apresenta melhor adaptação em solos de textura média, de boa fertilidade e com suprimento moderado de água (CORREA, 1984; KISMANN; 1991).

2.2.1 Composição química da espécie

A composição química dos extratos brutos e óleos essenciais extraídos dessa planta é influenciada pela localização geográfica da coleta, pela fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, poluição atmosférica e poluição do solo (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Assim, por exemplo, a análise do óleo essencial das folhas dessa espécie cultivada no Brasil (Recife-PE) a partir da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, mostra que os componentes majoritários foram α -terpineno (42,14%), α -terpinenil-acetato (31,57%) e timol (7,90%) (SÁ et al., 2014). Enquanto que o óleo essencial das sementes cultivadas na Índia (Uttarkashi-Uttarakhand) analisadas por CG/EM, mostrou a presença de ascaridol (40,7%),

isoascaridol (22.7 %), α -terpineno (17.9 %) e p-cimeno (8.5 %) na sua composição majoritária (KANDPAL; JOSHI; JOSHI, 2016).

Em outra análise da composição química de óleos essenciais foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. brasileira por CG/EM observou-se que ascaridol foi o componente mais relevante, em seguida o carvaerol, ascaridol, p-cimene, α -terpine, α -terpineol, piperitona, acetato de piperitol, β -cresol e álcool benzílico (JARDIM et al., 2008). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa de Jardim et al. (2010) permitiu a identificação de α -terpineno, p-cimeno, (Z)-ascaridol, (E)-ascaridol, carvacrol e álcool benzílico. Ambos os estudos mostram a importância do ascaridol como antifúngico.

Esse componente pode apresentar a capacidade de provocar problemas renais e hepáticos, conforme descrito por Souza (1991). Porém, Pereira et al. (2010) mostraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* não apresenta toxicidade na dose 5 mg/kg. A presença do ascaridol e outras substâncias como isoascaridol, p-cimene, piperitona, isotimol e 3,4-epoxi-p-metan-2-ona, 2-careno, α -terpineno foram verificadas por Chu; Hu e Liu (2011). Song et al. (2015) descobriram cinco novos bioativos isolados a partir do extrato etanólico desse vegetal. Eles foram denominados chenopodiumamines A–D (1–4) e chenopodiumoside A (5).

Outra técnica para verificar componentes químicos em extratos é estudo fitoquímico. Com esse tipo de análise do extrato dessa espécie vegetal Kokanova-Nedialkova; Nedialkov; Nikolov (2009) identificaram grupos como terpenóides (α -terpineol, hidroperóxidos de monoterpeno) e fenólicos (isoramnetina). Flavonoides, saponinas e éter fenólico em extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* foram identificados por CRUZ et al. (2007).

Barros et al. (2013) encontraram componentes hidrofílicos como frutose, glicose, sacarose, trealose e ácidos orgânicos como ácido quínico, málico, ascórbico, cítrico e fumárico. Esse relatou também componentes lipofílicos como α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol.

2.2.2 Atividades farmacológicas

Experimentalmente, já foi demonstrado que a espécie *C. ambrosioides* tem diversas ações farmacológicas, tais como as apresentadas no quadro 2.

Quadro 2 - Atividades biológicas da espécie *C. ambrosioides*

Atividade farmacológicas	Estudos
Antimalárico	Cysne et al., 2016
anti-inflamatório, antinociceptivo e curativo	Trivellato-Grassi et al., 2013
Antimicrobiana	Souza et al., 2015
Antitumoral	Nascimento et al., 2006
prevenção da perda óssea	Soares et al., 2015

Fonte: Autora (2017).

A ação cicatrizante do *Chenopodium ambrosioides* já foi evidenciada em um estudo com modelo de feridas em camundongos. Esses receberam o extrato etanólico de *C. ambrosioides* na forma de creme em diferentes concentrações (1%, 3% e 5%) e compararam com outros dois grupos de controle negativo e positivo, esse último utilizou-se dexametasona. Foi possível verificar que houve diminuição do edema, cicatrização efetiva e reparo da ferida. Isso foi identificado através do mecanismo de ação de inibição dos mediadores (bradicinina, óxido nítrico, prostaglandina (PGE₂) e fator de necrose tumoral α e enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA) envolvidas no processo inflamatório (TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013).

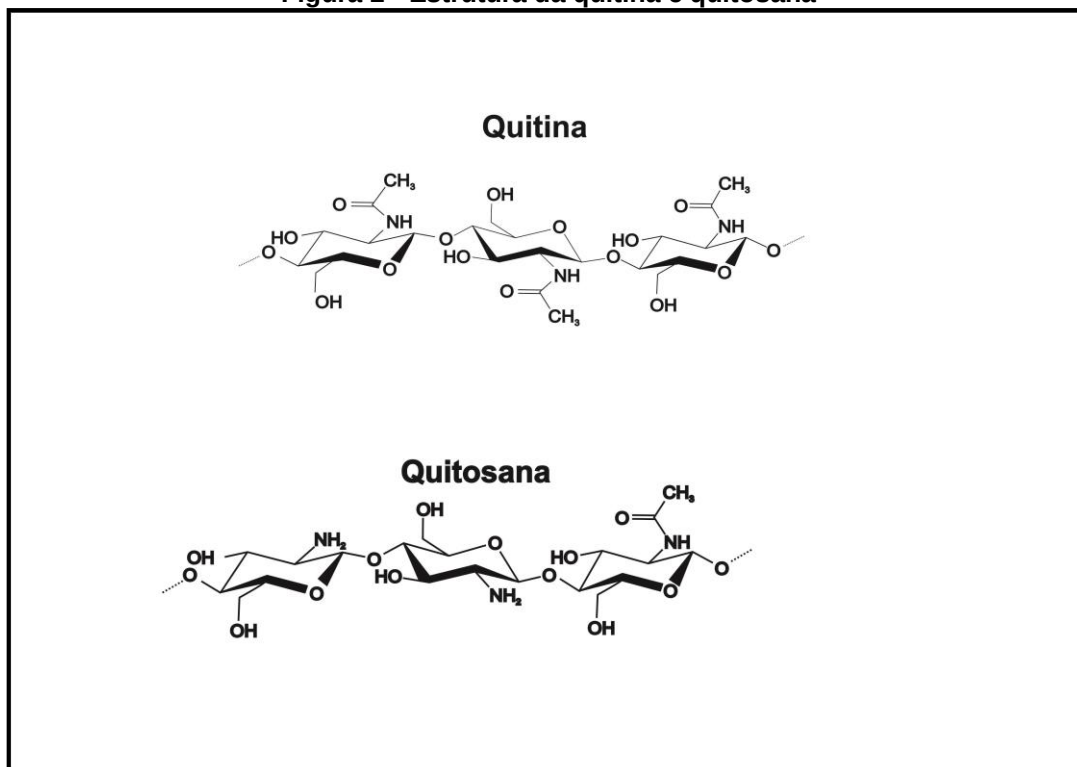
Sérvio et al. (2011) em sua pesquisa evidenciou o favorecimento da contração da ferida no grupo que utilizou o extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* sem cobertura de curativo. As feridas foram tratadas com solução salina 0,9% (grupo 1); extrato do *Chenopodium ambrosioides* (grupo 2) e com o extrato do *Chenopodium ambrosioides* recobertas com curativo (grupo 3). Houve maior contração da ferida nos animais tratados com mastruz sem cobertura no 4º e 7º dia. No 14º dia, não houve diferença significativa da contração das áreas lesadas e os achados histológicos exibiram maior organização da matriz e reepitelização parcial das lesões de todos os grupos (SÉRVIO et al., 2011).

Song et al. (2015) realizou testes *in vitro* de novos componentes isolados de *C. ambrosioides*. Eles conseguiram verificar que os compostos 1-3 (chenopodiumamines A–C) tiveram bons resultados no mecanismo de inibição de lipopolissacarídeo, fator de necrose tumoral α e interleucina-6 elucidando que essa planta tem atividade anti-inflamatória.

2.3 QUITOSANA

A quitosana (FIGURA 2) é um polissacarídeo linear constituído por unidades de β -(1-4)-D-glucosamina ligadas e N-acetil-D-glucosamina. Produzido pela desacetilação da quitina, composto estrutural encontrado no exoesqueleto de crustáceos. Apresenta-se como um biopolímero abundante na natureza com excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Figura 2 - Estrutura da quitina e quitosana



Fonte: Autora (2017).

A eficiência da desacetilação e as características da quitosana são afetadas pela temperatura e tempo de reação; concentração da solução de álcali e adição de diluentes (alcoóis de cadeia curta e cetonas); razão quitina/álcali; tamanho das

partículas de quitina; atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al., 2007). O grau de acetilação influencia nas interações hidrofóbicas e nas ligações de hidrogênio na quitosana (WANG et al., 2006). Esse polímero policatiónico em condições de pH neutro e alcalino, apresenta grupamentos amino livres sendo insolúvel em água. E em meio ácido, os grupamentos amino podem ser protonados, tornando o polissacarídeo solúvel na faixa de pH entre 2,0 e 6,0 (GOMES, 2007).

2.3.1 Propriedades biológicas

A literatura ressalta diversas aplicações biológicas da quitosana, que vão da engenharia alimentar ao campo biomédico, algumas dessas propriedades como antimicrobiana (QI et al., 2004); analgésica (OKAMOTO et al., 2002); coagulante (OKAMOTO et al., 2003) e cicatrizante (TANG et al., 2016) apresentam correlação no processo de reparação tecidual.

A quitosana é um polímero cicatrizante, por possui propriedade imunomoduladora isso dá a ela capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Dessa forma o mecanismo de cicatrização ocorre quando os macrófagos são ativados pelos oligômeros de quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1 estimulando a proliferação de fibroblastos e influenciando a estrutura do colágeno. O N-acetilglicosaminidase também é liberado esse hidrolisa a quitosana em monômeros de N acetilglicosamina e glicosamina, necessários à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (MUZZARELLI, 1997; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Além disso, esse polímero tem capacidade de favorecer neoformação óssea por estimular a liberação de citocinas, favorecendo a angiogênese e osteogênese (ORZELANNY et al., 2010).

Por seguinte, sabe-se que as membranas de quitosana possuem boa resistência mecânica e permeabilidade molecular seletiva. Devido á estas características são utilizadas em: pele artificial, cicatrização de ferimentos, sistemas de liberação de fármacos e outras (CHEN et al., 2002).

Assim as membranas puras desse material ou misturada com outros polímeros, são utilizadas com efetividade na produção de curativos, como pele artificial no tratamento de queimaduras promovem cicatrização acelerada do tecido,

reduzem os riscos de infecção na área afetada e é facilmente degradada pelo organismo pela atuação da lisozima (VASCONCELOS et al., 2001).

2.3.2 Quitosana e a incorporação de extratos vegetais

Membranas preparadas a partir de polímeros naturais tornaram-se estratégia para uma variedade de aplicações biotecnológicas incluindo os sistemas de liberação de fármacos, embalagens para conservação de alimentos, tratamentos de águas residuais, scaffolds biocompatíveis (MARTINS; MORGADO; ASSIS, 2016) e curativos biológicos (CHEN et al., 2002; TANG et al., 2016). Os biomateriais naturais a partir de plantas medicinais, possuem relevância, visto que podem ser biocompatíveis e de fácil aplicação (FRANCO et al., 2001; PINHEIRO NETO et al., 2013).

A incorporação de óleos essenciais (UGALDE, 2014; KIMURA et al., 2016) e extratos brutos (SILVA et al., 2013; VALÊNCIA-GÓMEZ et al., 2016) em membranas de quitosana têm sido utilizados na engenharia alimentícia (TORLAKA; SERTB, 2013; UGALDE, 2014) e em curativos biológicos (LIU; HUANG, 2010; BARRAL, 2014).

Em experimento com uso de membrana de quitosana associado ao extrato hidroalcoólico de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) realizado em ratas com modelo de feridas, observou-se que promoveu maiores taxas de cicatrização das feridas cutâneas complexas, tanto no terceiro quanto no oitavo dia de observação (BARRAL, 2014). Liu e Huang (2010) confeccionaram um filme de quitosana com extrato aquoso *Bletilla striata*, planta medicinal originária da China, e concluíram que o biomaterial desenvolvido foi eficaz na epitelização e reconstrução da ferida em ratos.

Nesse sentido estudos estão sendo desenvolvidos para produzir e caracterizar membranas com extratos vegetais para utilização como curativos. Kimura e colaboradores (2016) prepararam membranas de quitosana com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*), na composição de 0,1%, 0,5% e 1% desse extrato. O estudo citado caracterizou: propriedades térmicas (a partir de TG e DSC) e morfológicas (MEV) e mecânicas. Eles relataram que os filmes obtidos de quitosana contendo óleo de andiroba possuíam propriedades satisfatórias para uso como curativo para feridas.

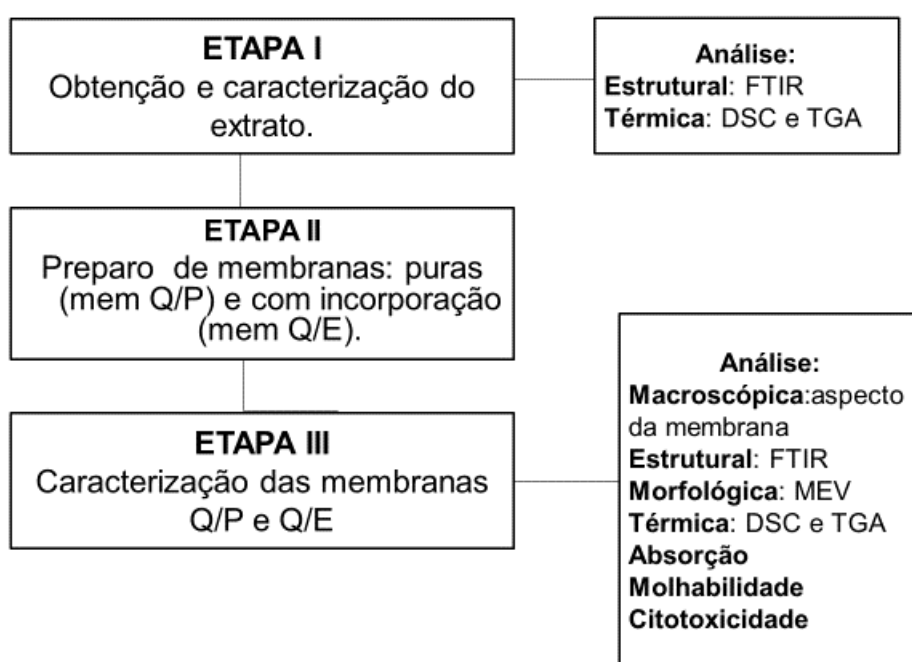
Silva et al. (2013) preparou membranas de quitosana com extrato de aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller). Essas foram caracterizadas por FTIR, MEV, Microscopia de Força Atômica (MFA), ângulo de contato, Análise Mecânica Dinâmica (DMA) e propriedades biológicas (atividade antibacteriana, isolamento e cultura de fibroblastos dérmicos humanos). Constatou-se que as membranas baseadas em aloe vera apresentaram satisfatória degradação, rugosidade, molhabilidade e propriedades mecânicas. Além de potencial antibacteriano, os ensaios *in vitro* demonstraram que as membranas incorporadas têm boa compatibilidade celular com fibroblastos dérmicos humanos.

Valência-Gómez e colaboradores (2016) incorporaram extrato hidroalcólico de *Mimosa tenuiflora* em membranas de quitosana. Eles fizeram análises físico-química e biológica com o auxílio das técnicas: MEV, DMA, TG, DRX, FTIR, molhabilidade, citotoxicidade *in vitro* e atividade antibacteriana. A caracterização sugeriu que as membranas desenvolvidas apresentam atividade antibactericida, sem toxicidade e com propriedades satisfatórias para a utilização no processo cicatrizante e de regeneração das feridas dérmicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desta pesquisa foi delineada em três etapas. A primeira consiste na obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico liofilizado de *C. ambrosioides*. A segunda no preparo de membranas puras de quitosana (Q/P) e membranas de quitosana com a incorporação do extrato (Q/E). A terceira etapa na caracterização das membranas (FIGURA 3).

Figura 3 - Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: Autora (2017).

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria prima

Os materiais utilizados foram: a quitosana (Polymar Ltda, Fortaleza, Brasil) com grau de desacetilação de 86,7% (FIGURA 4) e folhas de *Chenopodium ambrosioides* cedidas pelo Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais (NUPLAM-UFPI) localizado no Centro de Ciências Agrárias, Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-Piauí.

Figura 4 - Informações sobre o pó da quitosana


Densidade aparente.....	2,6 g/ml
pH.....	8,10
Viscosidade.....	199,5 cPs
Grau de desacetilação.....	86,7%

Fonte: Polymar (2014) e imagem do pó da quitosana autora (2017)

3.1.2 Coleta do material vegetal e preparação da exsicata

As folhas da espécie *C. ambrosioides*, foram coletadas no mês de outubro de 2015, na horta do NUPLAM-UFPI (5°04'35"S, 42°78'38"O). Para exsicata da espécie foi catalogada, identificada e depositada sob registro com numeração HAF 03745, pelo professor Francisco Soares do Santos Filho, no Herbário Afrânio Gomes Fernandes - UESPI.

3.1.3 Preparo do extrato hidroalcoólico das folhas do *C. ambrosioides*

As folhas foram separadas e postas para secarem naturalmente, ao sol em um ambiente com boa circulação de ar. A secagem foi realizada em temperatura ambiente. Após uma semana as folhas estavam secas, essas foram trituradas a princípio em triturador industrial e posteriormente em moinho de facas. Separou-se 226,5 g de folhas, essas foram transferidas para um erlenmeyer.

Adicionou-se cerca de 700 mL de etanol e 300 mL de água ao erlenmeyer contendo a amostra. O sistema ficou sob agitação em aparelho de ultrassom por um período de 30 minutos. O extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* foi filtrado e levado ao evaporador rotatório (Laborota 4000 - Heidolph), acoplado a bomba de vácuo (modelo 34 – Primar), para eliminar o solvente.

Esse procedimento foi feito no Laboratório de Química Orgânica do IFPI. Em seguida foi para o Liofilizador Micro Modulyo Edwards acoplado a bomba de alto vácuo (ValPump VLP80 Savant), para retirada da água residual (processo realizado no Laboratório de Alimentos e panificação– IFPI). O processo de obtenção do

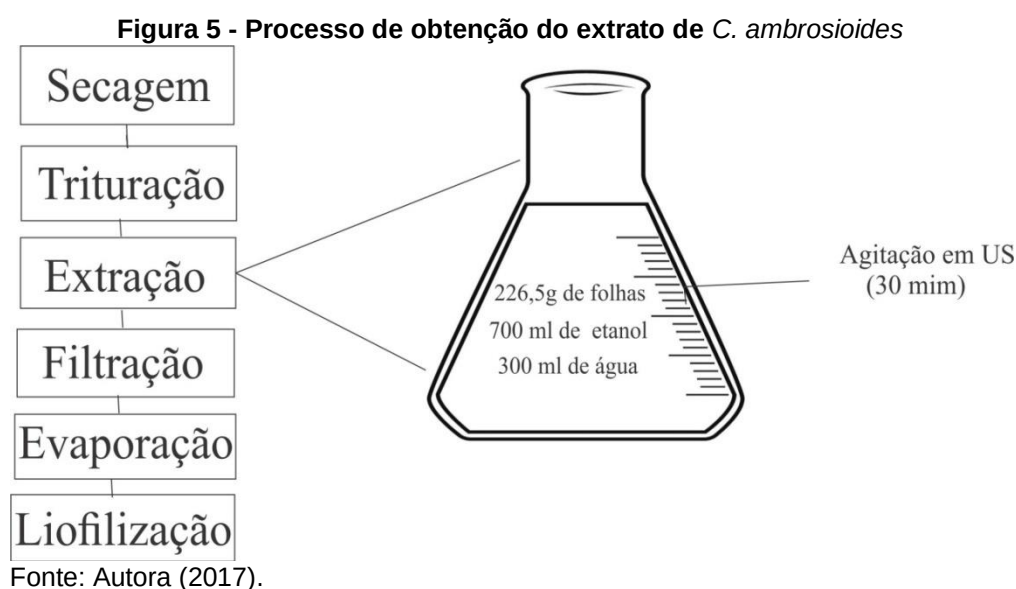
extrato está expresso na Figura 5. O rendimento do extrato foi calculado pela fórmula (1) descrita abaixo:

$$Re = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P_{ext} : peso do extrato

P_{folhas} : peso das folhas secas



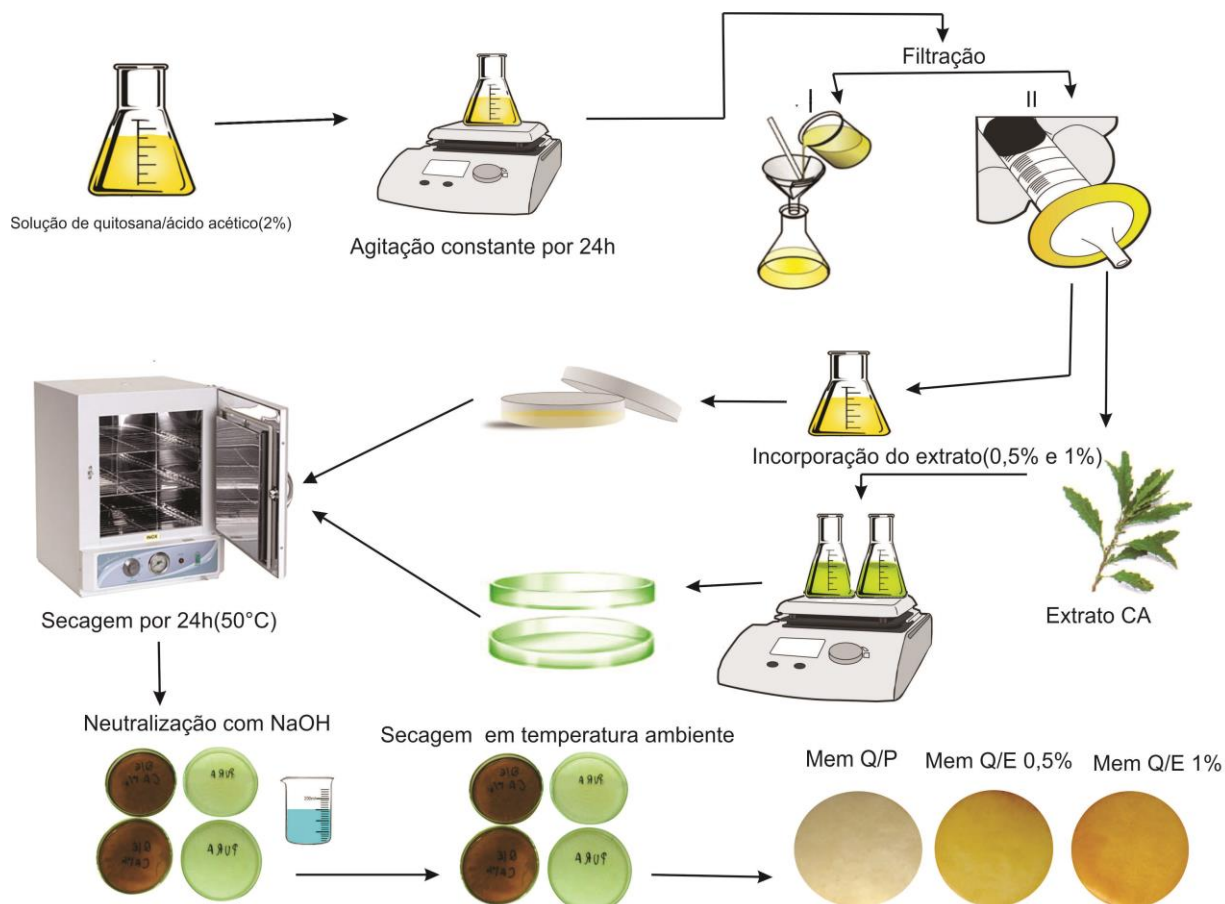
3.1.4 Preparo das membranas

As membranas foram produzidas pela técnica de evaporação de solventes (MACÊDO, 2013). Inicialmente a quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético a 2% com agitação constante durante 24h. Depois desse período a solução de quitosana passou por duas filtrações, para retirada de impurezas. A primeira em um filtro com tela de nylon e a segunda em um filtro Mille Millipore® (41µm).

Após esse procedimento três volumes foram separados. O primeiro para produção das membranas puras (mem Q/P) e os outros dois para incorporação do extrato. Esse foi incorporado nas concentrações 0,5% e 1%. As soluções com o extrato foram submetidas à agitação por 1h. Em seguida retirou-se um volume de 30 ml das soluções, essas foram colocadas em placas petri e as mesmas acondicionadas em estufa por 24 h em temperatura de 50°C. Posteriormente, as membranas formadas foram neutralizadas com NaOH a 5%, seguido de

acomodação e secagem em temperatura ambiente por 24h, protocolo adaptado de Macêdo (2013) (FIGURA 6).

Figura 6 - Preparo das membranas puras e com incorporação do extrato



Fonte: Autora (2017).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Espectroscopia no infravermelho

Para identificação dos grupos funcionais e seus possíveis deslocamentos utilizou-se um espectrômetro FTIR (Perkin Elmer precisely, modelo Spectrum 100). A faixa de comprimentos de onda usada foi de 700 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , com 32 varreduras. Para análise dos pós tanto de quitosana quanto das folhas de *C. ambrosioides* e membranas foi utilizada a técnica de pastilhas com KBr (Brometo de Potássio). As membranas foram picotadas e homogeneizadas em pastilha de KBr. Esse procedimento feito no Laboratório de Biodiesel e Materiais do UFPI.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Para observar a morfologia das superfícies das amostras utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo da marca FEI, modelo Quanta 250 FEG. Os pós foram colocadas no porta amostra em cima de uma fita de carbono. Já as membranas foram cortadas com tesoura e fixadas em fita de carbono. As amostras foram metalizadas com ouro por pulverização catódica durante 30 segundos, com corrente de 20 mA no metalizador (marca Quorum Technologies Ltd, modelo Q150R E). A energia empregada foi de 5 kV. Foram obtidas micrografias na secção frontal para todas as amostras e na transversal apenas para as membranas. Essa secção foi obtida para análise da espessura. Esse procedimento foi executado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados– UFPI.

3.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

O DSC foi usado no intuito de verificar as propriedades térmicas das amostras. Essa análise foi executada em equipamento da marca Shimadzu – Modelo DSC 60 PLUS. O pó, extrato e membranas foram prensados (8mg) em uma panelinha de alumínio e foram submetidos ao ensaio com as seguintes condições: faixa de temperatura de ensaio de 25 °C a 600 °C, taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 ml.min⁻¹. Análises executadas no Laboratório de Materiais do IFPI.

3.2.4 Análise Termogravimetria –TGA

O TGA foi utilizado para avaliar a estabilidade térmica e processos de decomposição das amostras. Elas foram submetidas a esse ensaio em equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-51. Para essa análise foi pesado 8mg das amostras, colocadas em cadinho de platina macro e submetidas a seguintes condições: faixa de temperatura de 25 °C a 900 °C, taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 ml.min⁻¹.

3.2.5 O pH de superfície

As membranas foram colocadas para intumescer durante 15 min em solução tampão fosfato e em seguida foi colocado sobre a superfície intumescida o pHmetro (PHS-3E, pHteck), metodologia adaptada de Shidhaye et al. (2008). A análise das membranas e solução quitosana/ ácido acético foram feitas em triplicata no Laboratório de Inovação Tecnológica na Educação– UFPI.

3.2.6 Ensaio de absorção de água

Esse ensaio avaliou a quantidade de água absorvida pelas membranas por meio da imersão dessas em água destilada em intervalos de tempo distintos. As membranas Q/P e Q/E foram pesadas em balança analítica e em seguida imersas em 300 mL de água destilada (FIGURA 7) a 37°C por 72h, conforme ISO: 62:2008. O acompanhamento do ganho de massa foi monitorizado, realizando-se a pesagem das amostras nos diferentes intervalos por 8h. Antes de cada pesagem as membranas foram secas com papel toalha para retirada do excesso de água.

Após oito pesagens consecutivas com intervalo de 1h, as membranas foram pesadas com 24h, 48h e 72h. Depois de conferido o último peso úmido as membranas foram colocadas em placas petri e levadas a estufa por 24h a 50°C para obtenção do peso seco final. O ganho percentual de massa foi calculado através da equação (2):

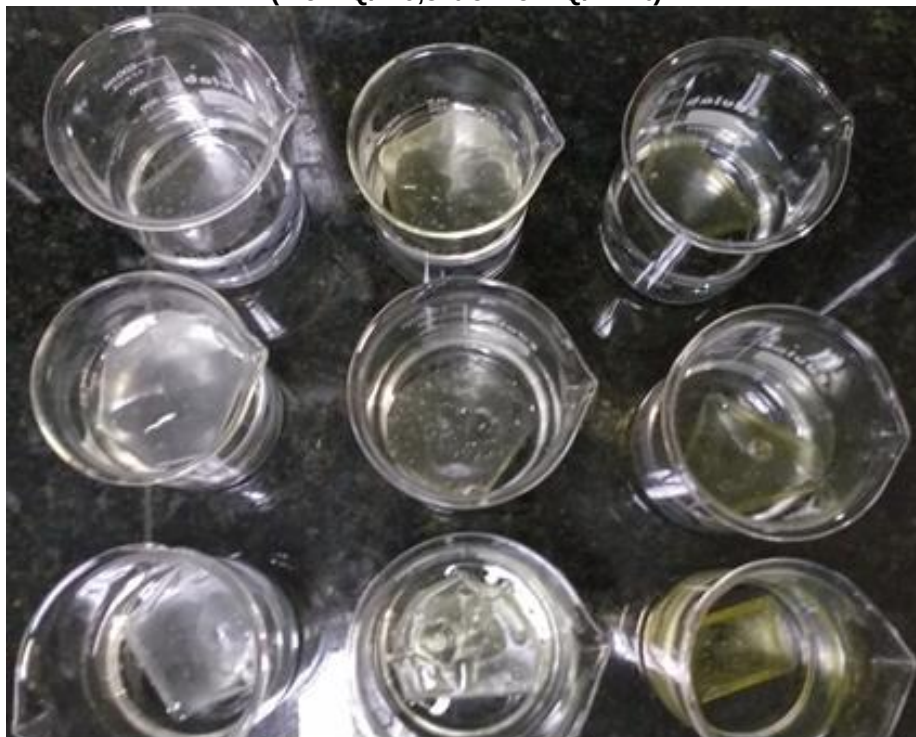
$$\% = \frac{m_u - m_s}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

m_u : massa úmida

m_s : massa seca.

Figura 7 - Membranas de quitosana (mem Q/P), membranas com extrato (mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%)



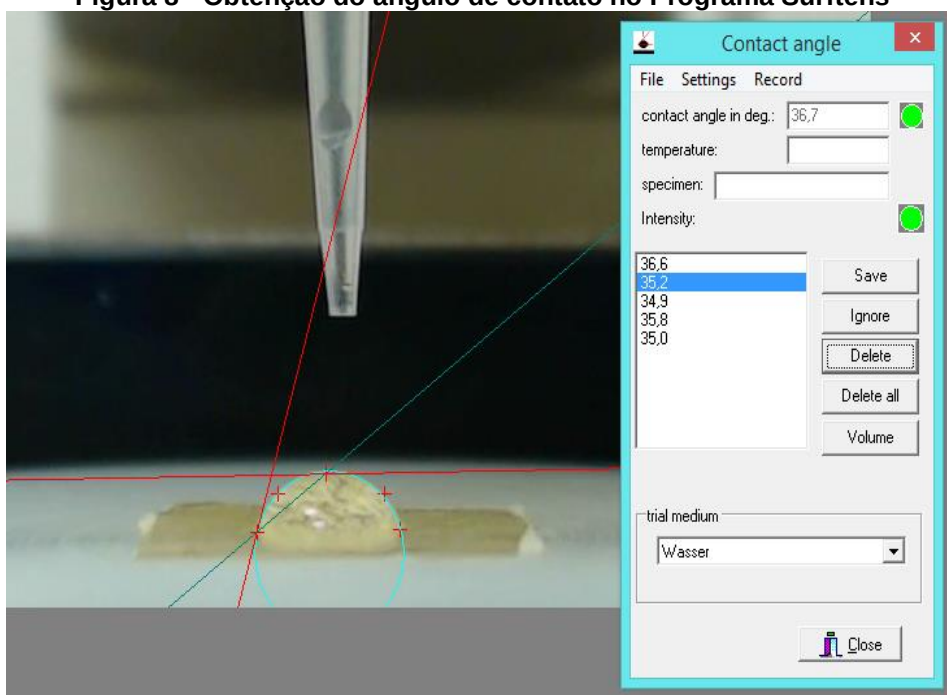
Fonte: Autora (2017).

3.2.7 Molhabilidade das membranas

Para análise da molhabilidade foi utilizado o método da gota séssil. Nessa técnica os líquidos utilizados foram água, formamida e glicerina. As amostras foram postas sobre uma base plana e em seguida foi gotejado 10 μL dos líquidos, primeiro foi realizada a análise com água em todas as amostras seguida da formamida e glicerina. Esse procedimento foi acompanhado e registrado em computador pelo programa Windows Movie Maker software.

Foram captadas e selecionadas imagens em sete tempos (00, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 segundos) para posteriormente análise no programa Surftens versão 4.5, onde foram realizadas cinco marcações em cada imagem, nos diferentes tempos e amostras para obtenção do ângulo de contato (FIGURA 8). O ângulo de contato depende do comportamento da água na superfície do material, sendo considerada para $\theta > 65^\circ$ superfície hidrofóbica e para $\theta < 65^\circ$ superfície hidrofílica (VOGLE, 1998).

Figura 8 - Obtenção do ângulo de contato no Programa Surftens



Fonte: Autora (2017).

Para análise da tensão superficial utilizou-se os valores dos ângulos de contato encontrados e valores da componente polar e dispersiva dos líquidos estão apresentados na Tabela 1. A energia de superfície foi calculada utilizando a equação (3) de Fowkes (1963).

$$\left[\frac{1 + \cos \theta}{2} \right] \times \left[\frac{\gamma_l}{\sqrt{\gamma_l^d}} \right] = \sqrt{\gamma_s^p} \times \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (3)$$

Onde:

γ : Energia Superficial

γ^p : Componente polar da energia de superfície

γ^d : Componente dispersiva da energia de superfície

l : Líquido;

s : Sólido

Tabela 1 - Valores energia de superfície, da componente polar e componente dispersiva da água, formamida e glicerina.

Líquidos	$\gamma_l(m_j/m^2)$	$\gamma_l^p(m_j/m^2)$	$\gamma_l^d(m_j/m^2)$
Água	72,8	51	21,8
Formamida	58,2	18,7	39,5
Glicerol	63,4	26,2	37,2

Fonte: Deshmukh; Bhat (2003)

3.2.8 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para o teste citotoxicidade *in vitro* foram coletados macrófagos murinos das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c machos (4 a 5 semanas de idade), provenientes do biotério setorial do NPPM/UFPI. Foi coletado também sangue de carneiro (9 meses de idade) do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI). Todos os protocolos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal– UFPI (CEEAA/UFPI nº 262/16).

3.2.8.1 Obtenção de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c. Para tal, após eutanásia, foi feita a antisepsia da pele utilizando álcool a 70% e levados para a capela de fluxo laminar. Para retirada dos macrófagos os animais fixados em placa de cortiça na posição de decúbito dorsal, administraram-se 6 mL de salina tamponada com fosfato (PBS– NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4°C, na cavidade abdominal.

Em seguida foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL, centrifugado a 1000 rpm, durante 10 min e lavado três vezes com PBS estéril na temperatura de 4°C. Para análise da viabilidade celular a quantidade de macrófagos foi estimada por contagem das células em câmara de Neubauer coradas com azul de Trypan (Sigma, EUA).

3.2.8.2 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Avaliou-se a citotoxicidade das membranas utilizando o teste do MTT, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio. Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de 2×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado para retirada das células que não aderiram.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 suplementado juntamente com as membranas. Em seguida foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, adicionou-se 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em meio RPMI a 5 mg/mL. Foram incubados por mais 4 h em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de DMSO em todos os poços.

Em seguida, colocou-se a placa sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por fim, fez-se a leitura a 550 nm em leitora de placa. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC₅₀) sendo o grupo controle considerado como 100%, protocolo adaptado de Nogueira et al., (2007).

3.2.9 Citotoxicidade em eritrócitos de carneiro

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro, coletado com anticoagulante (EDTA), no volume de 4 mL de sangue total. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias.

Em seguida foram adicionadas as membranas nos poços com volume de 20 µL de PBS. Logo após, incubados durante 1h a 37°C e a reação será interrompida pela adição de 200µL de PBS. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 1000G, por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica.

A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foi determinada, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH_{50}) considerando o controle positivo como 100% de hemólise, metodologia adaptada de Löfgren et al. (2008).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para observar a normalidade foi utilizado o teste Shapiro-Wilk W e para a comparação intergrupos utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Esses testes foram utilizados para análise dos dados de absorção, molhabilidade, MTT e citotoxicidade em eritrócitos de carneiros. Todos esses ensaios foram realizados em triplicata. A concentração inibitória média (CI_{50}) e concentração citotóxica média (CC_{50}) foram calculadas utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. Essas análises estatísticas foram feitas no programa GraphPadPrism© versão 5.0. Para as análises dos dados estruturais (FTIR), térmicas (TG e DSC) utilizou-se o programa Origin versão 4.5.

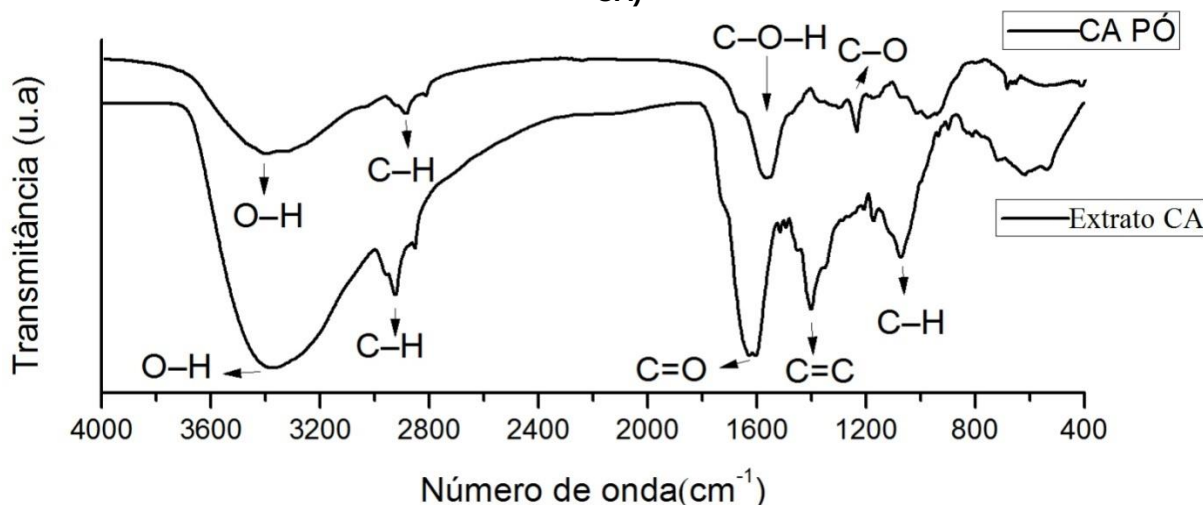
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Chenopodium ambrosioides*

O extrato obtido nesse estudo apresentou cor amarelo-esverdeado e odor característico do mastruz. Esse extrato hidroalcoólico após a liofilização (33 g) obteve rendimento satisfatório de 14,5%. Enquanto que no estudo de Valério (2014) após maceração foliar de *C. ambrosioides* obteve 33,78 g de extrato hidroalcoólico bruto de rendimento de 6,43%. Já para o extrato etanólico de 200 g do mesmo material botânico Pereira (2009) obteve um valor do rendimento de 10,4 %. Entretanto para o óleo essencial extraído a partir de 30 g de folhas frescas o rendimento foi de 0,7% (SÁ, 2014). Em outro estudo (JARDIM et al., 2010) utilizando 200g da mesma parte dessa espécie o rendimento resultou em apenas 0,3%.

Os espectros de infravermelho do pó da folha e do extrato de *Chenopodium ambrosioides* são apresentados na Figura 9. Em ambos os espectros é observada uma banda larga e intensa de 3600 a 3000 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação O–H e bandas referentes aos estiramentos de ligações C–H entre 3000 e 2811 cm^{-1} .

Figura 9 - FTIR do pó das folhas de *C. ambrosioides* (CAPÓ) e extrato de *C.ambrosioides* (extrato CA)



Fonte: Autora (2017).

No espectro do pó a banda em 1563 cm^{-1} é atribuída ao dobramento do grupo C–O–H e a banda em 1240 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C–O. Já no espectro do extrato a banda observada em 1628 cm^{-1} corresponde ao estiramento

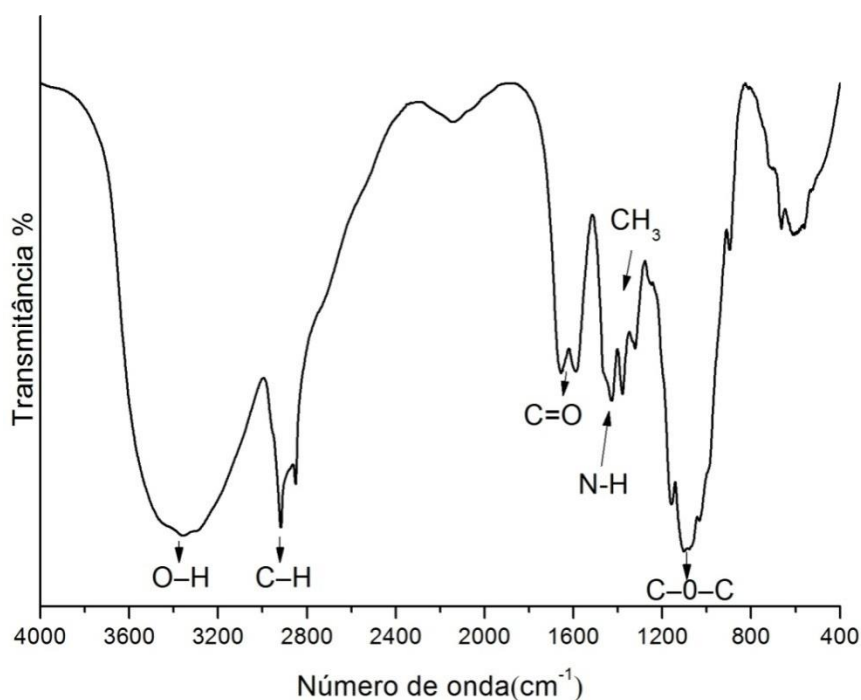
da ligação C=O. Os picos que aparecem entre 1460 e 1300 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações C=C presentes em anéis aromáticos. Entre 1150-1000 cm^{-1} são observadas bandas referentes ao estiramento da ligação C–O. E as bandas de 700 a 470 cm^{-1} correspondem, principalmente, a deformações angulares fora do plano da ligação C–H em anéis aromáticos. A análise do espectro na região de infravermelho do extrato mostrou-se semelhante ao de Carrillo-López et al. (2014, 2016) e de Rodriguez-Clemente et al. (2011).

Um estudo químico sobre o extrato de *Chenopodium ambrosioides* revelou que essa espécie possui uma grande quantidade de biomoléculas com grupos funcionais OH, tais como terpenóides (α -terpineol, hidroperóxidos de monoterpene) e grupos fenólicos (isoramnetina) (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009).

4.2 QUITOSANA EM PÓ

O espectro de infravermelho do pó da quitosana (FIGURA 10) mostrou uma banda de 3575 a 3100 cm^{-1} corresponde ao estiramento axial de O–H, a qual aparece sobrepondo a banda de estiramento N–H. Entre 2924 e 2841 cm^{-1} são observadas bandas referentes ao estiramento de ligações C–H. O estiramento de C=O de amida pode ser observada na região 1651 cm^{-1} . A banda em 1592 cm^{-1} é atribuída à deformação angular de N–H e as bandas que aparecem entre 1490 a 1300 cm^{-1} correspondem à deformação angular simétrica de CH_3 . São observadas também bandas de estruturas polissacarídicas na região de 1200-950 cm^{-1} . Bandas semelhantes foram encontradas nos estudos de Santos et al. (2003), Souza; Zamora; Zawadzki (2010), Fraguás et al. (2015), Kamel et al. (2016) e Branca et al. (2016).

Figura 10 – FTIR do pó da quitosana- QUI PÓ

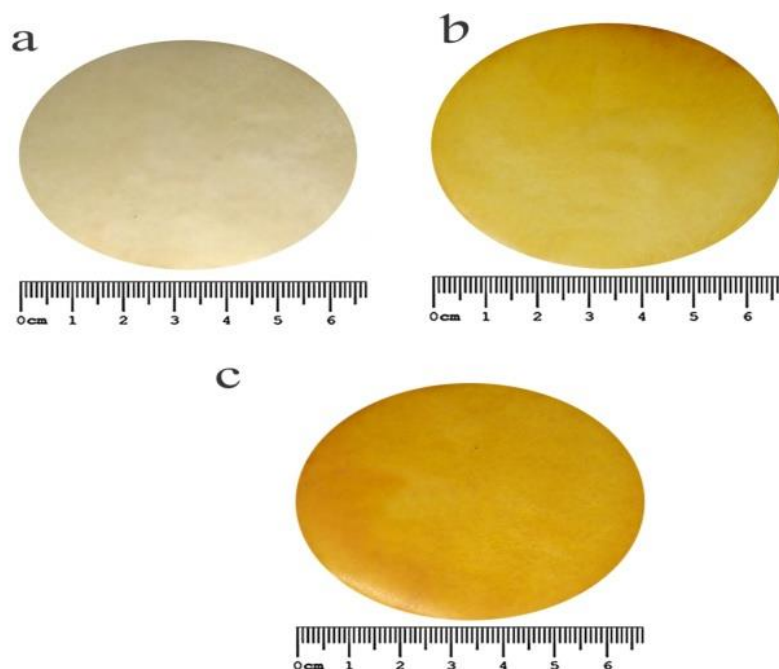


Fonte: Autora (2017).

4.3 PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS DAS MEMBRANAS

As membranas produzidas neste trabalho apresentaram as seguintes características (FIGURA 11): contínuas (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogêneas (ausência de partículas insolúveis ou visíveis ao olho nu) e flexíveis semelhantes às descritas por Rezende Neto (2011). Apresentaram ainda coloração variável. As (a) mem Q/P com aspecto mais transparente, as (b) mem Q/E 0,5% e (c) mem Q/E 1% com a tonalidade amarelo-esverdeado, coloração específica do extrato incorporado. Notou-se que quanto maior a incorporação mais intensa é a coloração da membrana.

Figura 11 – Aspecto macroscópico das (a) mem Q/P, (b) Q/E 0,5% e (c) mem Q/E 1%



Fonte: Autora (2017).

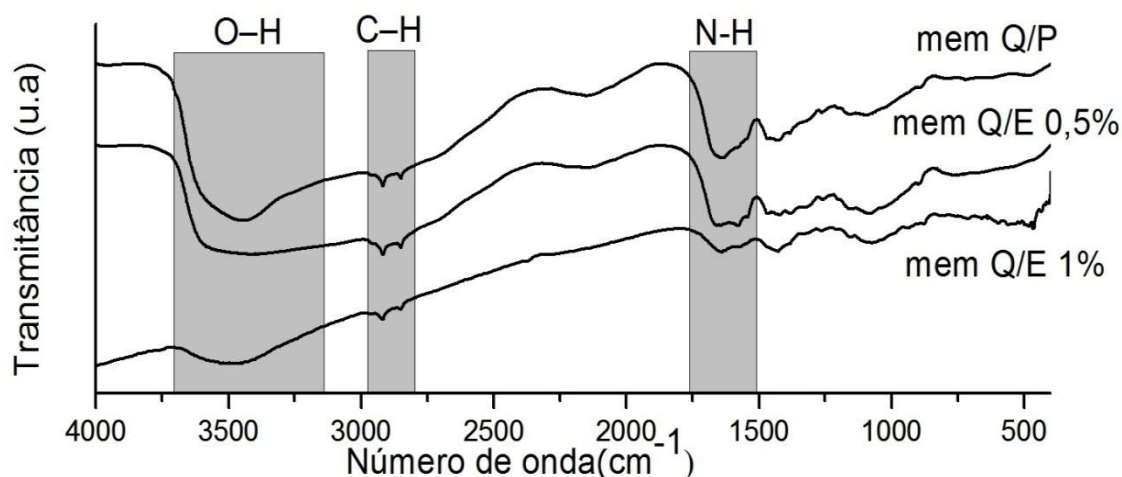
4.4 pH

Verificou-se que o pH alterou para $7,3 \pm 0,12$; $6,7 \pm 0,03$ e $6,9 \pm 0,15$, respectivamente nas mem Q/P, mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%. O conhecimento do pH é importante tanto para estabilidade de formulação quanto para a compatibilidade do biomaterial com o manto da pele (RODRIGUES,1997).

4.5 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO DAS MEMBRANAS

Conforme a Figura 12 observa-se nas membranas (mem Q/P e mem Q/E) que a banda de 3600 a 3100 cm^{-1} corresponde ao estiramento axial de O–H. E entre 2923 e 2842 cm^{-1} bandas referentes ao estiramento de ligações C–H. A deformação angular de N–H foi vista entre 1577 a 1500 cm^{-1} . As bandas características encontradas na mem Q/P corroboraram com Santos et al. (2003), Fraguás et al. (2015) e Branca et al. (2016).

Figura 12 – Espectroscopia de infravermelho das membranas



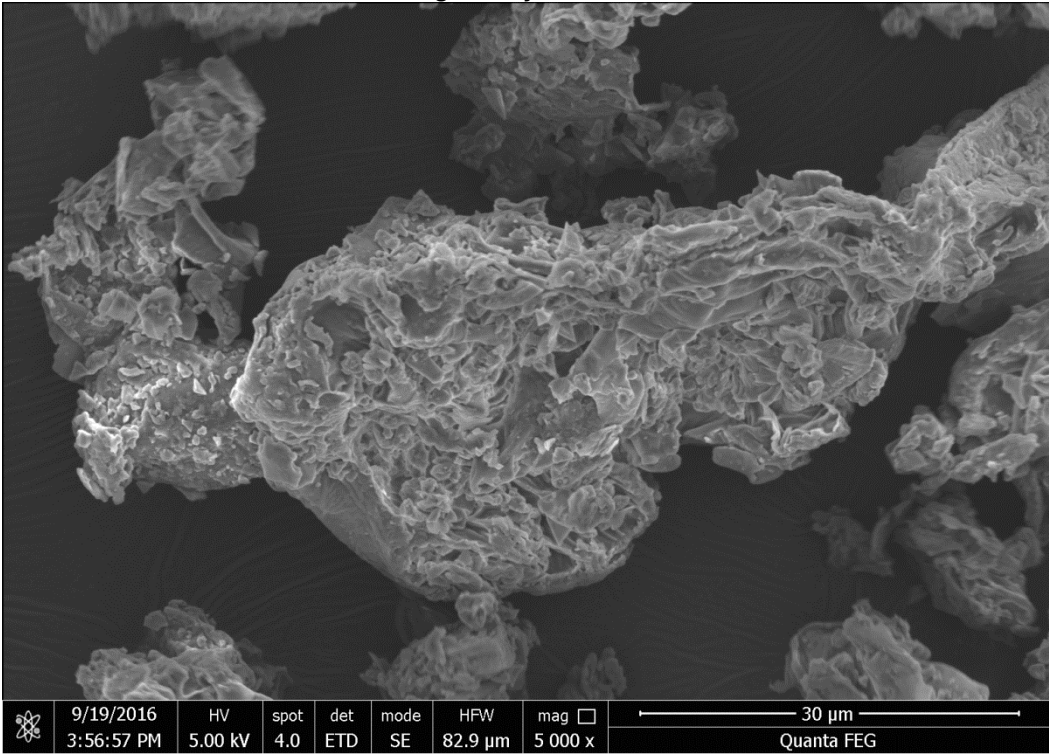
Fonte: Autora (2017).

Para membranas com incorporação do extrato de *C. ambrosioides* (mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%) foi possível verificar que a banda de ligação O–H sofreu um alargamento quando comparado com a membrana pura (mem Q/P), possivelmente pela interação dos grupos fenólicos do extrato com a matriz polimérica. Kokanova-Nedialkova et al. (2009) elucidaram em estudo químico do extrato de *C. ambrosioides* que essa espécie apresenta grandes quantidades de biomoléculas com grupos funcionais O–H. Para Carrillo-López e colaboradores (2014) ao analisarem o FTIR de nanopartículas com *Chenopodium ambrosioides* observaram que interação desse extrato foi maior na banda O–H.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

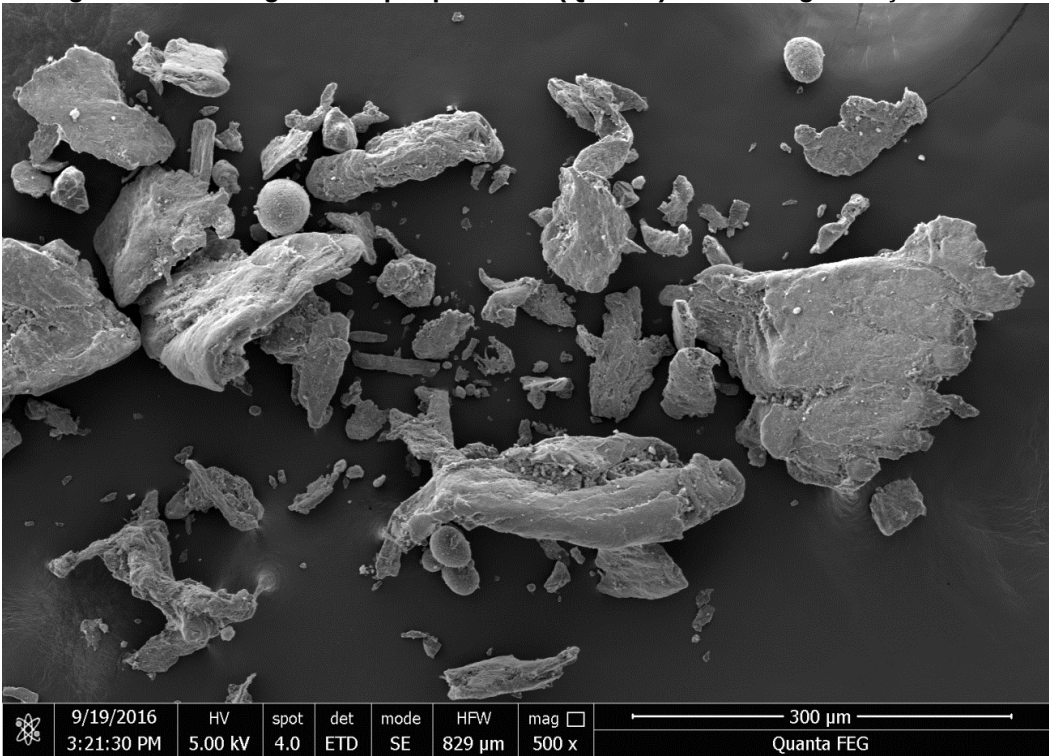
A micrografia do pó de *C.ambrosioides* (FIGURA 13) revela uma superfície polimorfa e polidispersa. E a micrografia do pó da quitosana (FIGURA 14) mostra a formação de pequenos grânulos com tamanhos e formatos irregulares corroborando com a micrografia de Andrade et al. (2012). Há também a presença de microesferas característica semelhante à encontrada por Gonçalves; Laranjeira; Fávere (2005).

Figura 13 – Micrografia do pó das folhas de *Chenopodium ambrosioides*, com a magnificação 5000 x



Fonte: Autora (2017).

Figura 14 – Micrografia do pó quitosana (QUI PÓ) com a magnificação 500 x



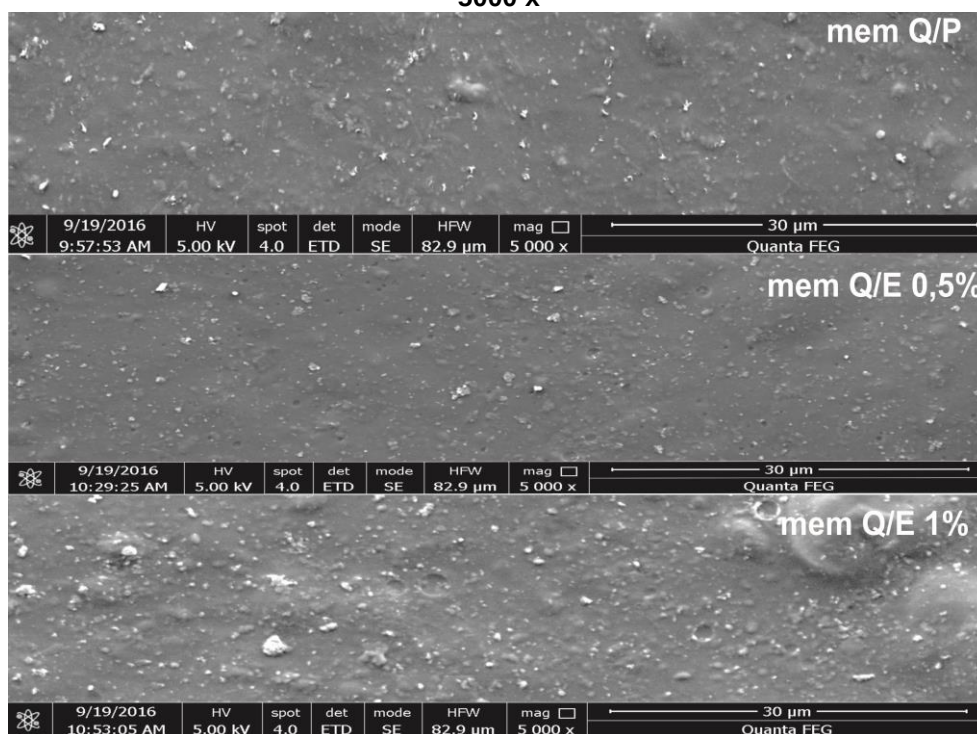
Fonte: Autora (2017).

Na micrografia (FIGURA 15) da mem Q/P revelou uma superfície densa, sem vales, sem fissuras ou poros. Mâcedo (2013), Shahbazi; Rajabzadeh; Ahmadi (2016), Kamel; Abd El-Messieh; Saleh (2016) e Kimura et al. (2016) obtiveram características semelhantes ao avaliar por MEV superfície de membranas de quitosana.

Já a micrografia da mem Q/E 0,5% mostrou a presença microporos disperso ao longo de toda a membrana. Enquanto que na mem Q/E 1% não houve a presença de poros que se mostraram mais densas que as demais membranas e com formação de bolhas, possivelmente isso aconteceu durante a evaporação dos solventes. A presença do *C. ambrosioides* alterou a superfície das membranas causando descontinuidades o mesmo ocorreu na incorporação do extrato de *M. Tenuiflora* em membranas de quitosana (KAMEL et al., 2016). Kimura et al. (2016) descreveram membranas de quitosana com incorporação de óleo de andiroba como descontínuas e com formação de duas fases (lipídios e polímero) na matriz.

Os poros encontrados na superfície da mem Q/E 0,5%, numa aplicação como biomaterial cicatrizante dérmico pode permitir: trocas gasosas entre a membrana e meio externo, adesão, proliferação e diferenciação celular facilitando o processo de cicatrização (WAN; WANG; LIU, 2006, YAN et al, 2011).

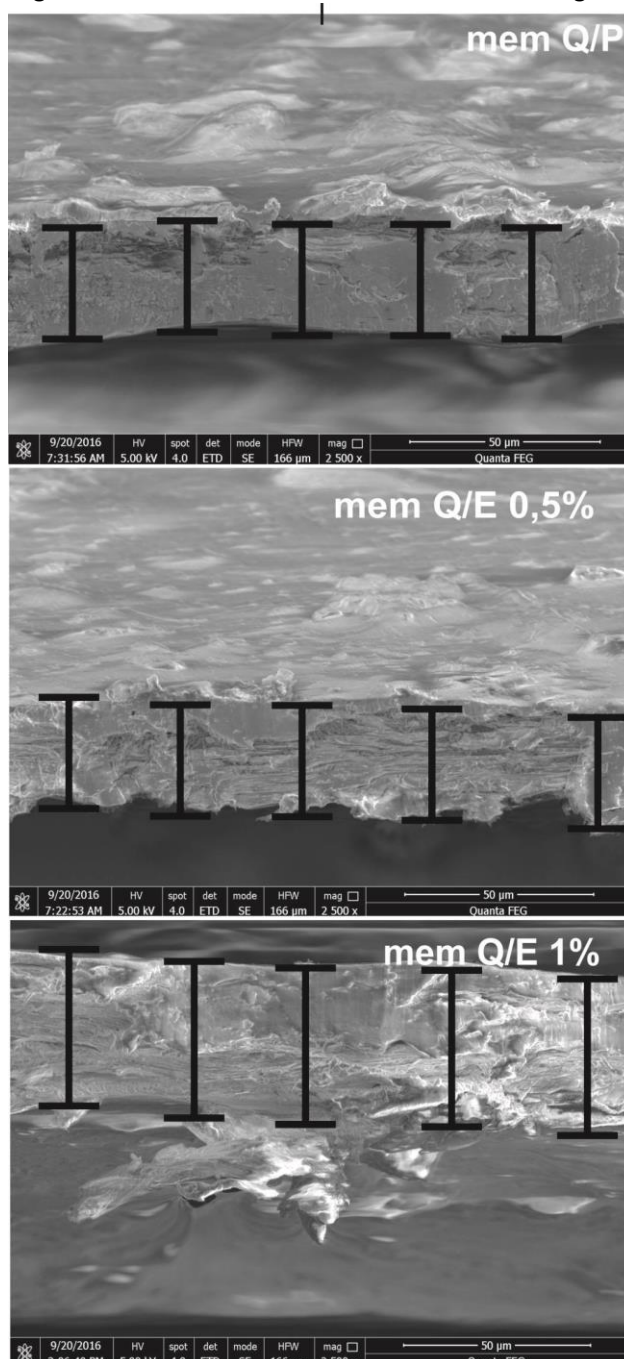
Figura 15 – Micrografia das membranas Q/P; Q/E 0,5% e mem Q/E 1%, magnificação 5000 x



Fonte: Autora (2017).

A vista transversal (FIGURA 16) das membranas norteou a mensuração das espessuras dessas. A mem Q/P apresentou espessura de $28,8 \mu\text{m} \pm 1,95$, as mem Q/E 0,5%, $27,8 \mu\text{m} \pm 0,73$ e para Q/E 1% $39,6 \mu\text{m} \pm 0,91$. A espessura de um curativo dérmico ideal deve ser embasada nas espessuras da pele humana (0,5 a 2mm) (MA et al., 2008). Sendo assim, as membranas produzidas possuem espessuras adequadas para aplicação com biomaterial cicatrizante dérmico.

Figura 16 – Micrografia transversal das membranas com magnificação de 2.500x



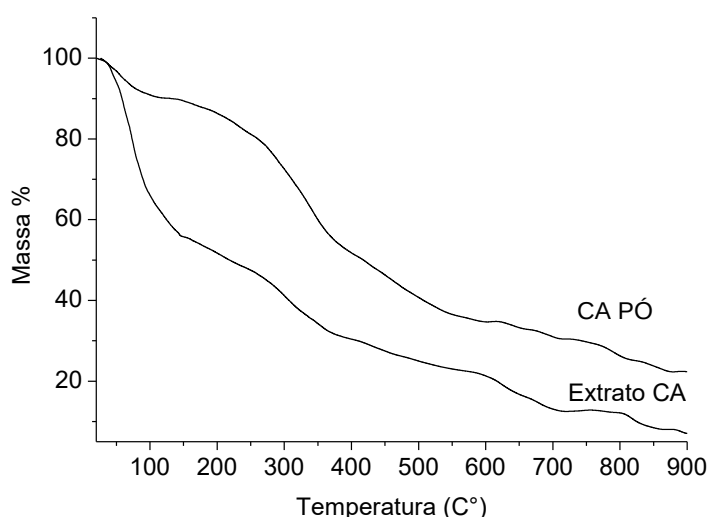
Fonte: Autora (2017).

4.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

As curvas termogravimétricas das amostras analisadas apresentam diferentes etapas de degradação térmica. A curva termogravimétrica e a DTG (FIGURA 17 e 18) correspondente ao pó das folhas de *C. ambrosioides* apresenta dois estágios de degradação. O primeiro estágio ocorre entre 24°C e 127,4°C, com perda de massa de 9,8%, referente à perda de água desse material. O segundo estágio vai de 248°C até 407°C, com perda de massa de 30,4%, certamente relacionado ao início da degradação do CA PÓ.

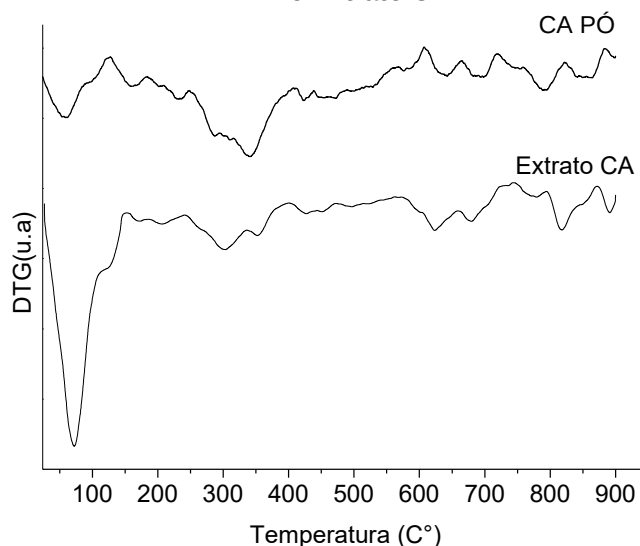
Já para o extrato de CA as curvas TG e DTG (FIGURA 17 e 18) apresentam o primeiro estágio de perda de massa entre 24°C e 147°C, registrando perda de 44,4%. Essa etapa pode estar relacionada à volatilização de água e etanol do extrato de *C. ambrosioides*. A segunda etapa aconteceu de 237,9°C a 400,8°C, com perda de massa de 18,94%. Essa etapa pode estar relacionada ao início da degradação do extrato, possivelmente associada a uma grande variedade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, presentes em extratos de plantas medicinais conforme descrito por Fernandes et al. (2013) em seu estudo.

Figura 17 – Curva termogravimétrica do CA PÓ e Extrato CA



Fonte: Autora (2017).

Figura 18 – Derivada Termogravimétrica (DTG) do CA PÓ e Extrato CA

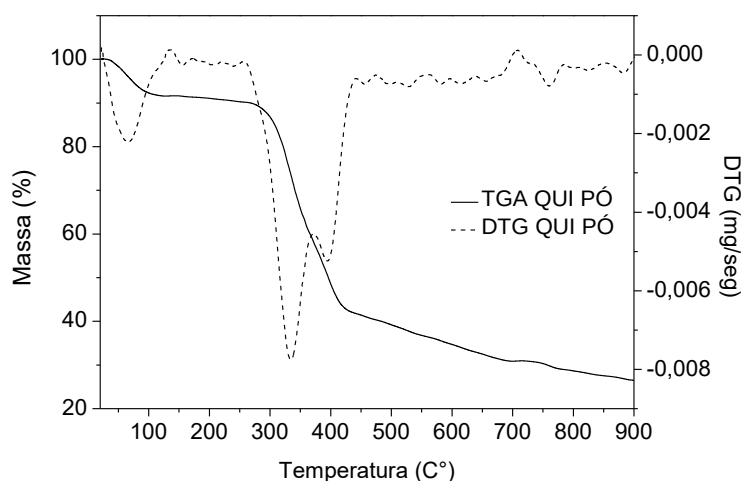


Fonte: Autora (2017).

Nas curvas TG e a DTG do pó da quitosana (FIGURA 19) observa-se três etapas de perda de massa. A primeira de 26,2°C a 133,6°C com degradação de 8,4%, corresponde à perda de água. A segunda ocorreu no intervalo de temperatura de 259,9°C a 372,5°C, com perda de massa de 32%, referente à degradação da cadeia polimérica da quitosana. Esses são os dois principais estágios de degradação da quitosana semelhantes aos dos estudos de Tonhi; Plepis (2002); Santos; Soares e Dockal (2003); Fraguás et al. (2015) e Ma; Xin; Tan (2015).

Na terceira etapa pode ser referente à perda de material inorgânico, numa temperatura de 372,5°C a 439,9°C, com perda de massa de 16,1% concordando com o estudo de Antonino (2007).

Figura 19 - Curva termogravimétrica e DTG do QUI PÓ



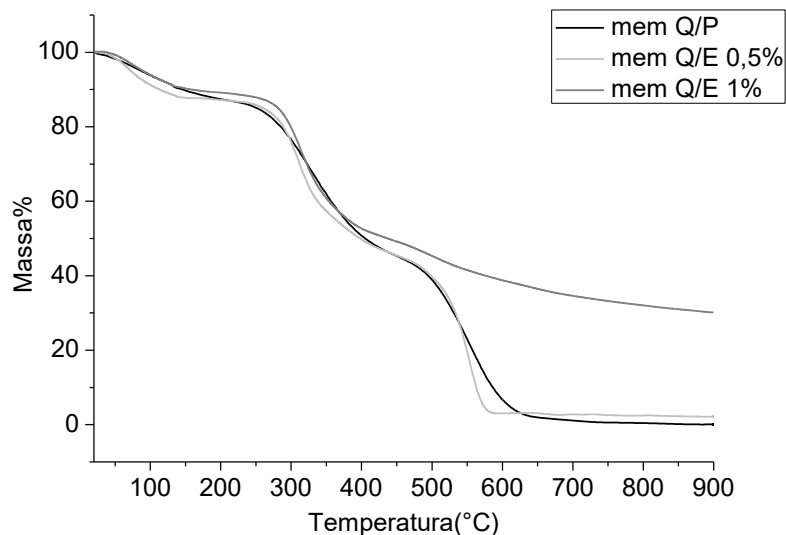
Fonte: Autora (2017).

As curvas termogravimétricas (FIGURA 20) e DTG (FIGURA 21) das membranas analisadas apresentam diferentes estágios de degradação térmica. O primeiro estágio é referente à volatilização de constituintes das amostras como água para as membranas puras e água e etanol para membranas com extrato. Esse estágio iniciou na temperatura 24°C até 165,2°C com perda de massa de 10,9% para mem Q/P, 12,1% para mem Q/E 0,5% e 10,4% para mem Q/E 1%.

O segundo estágio pode ser atribuído ao início da degradação da cadeia polimérica da quitosana para mem Q/P. E para membranas com extrato além do início da degradação da matriz polimérica há possivelmente a degradação de metabólitos secundários como os compostos fenólicos do extrato. Esse estágio ocorreu na faixa de temperatura de 241,3°C até 453,8°C, com perdas de massas 41,8%, 44,8% e 39,2% para as mem Q/P, mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%, respectivamente.

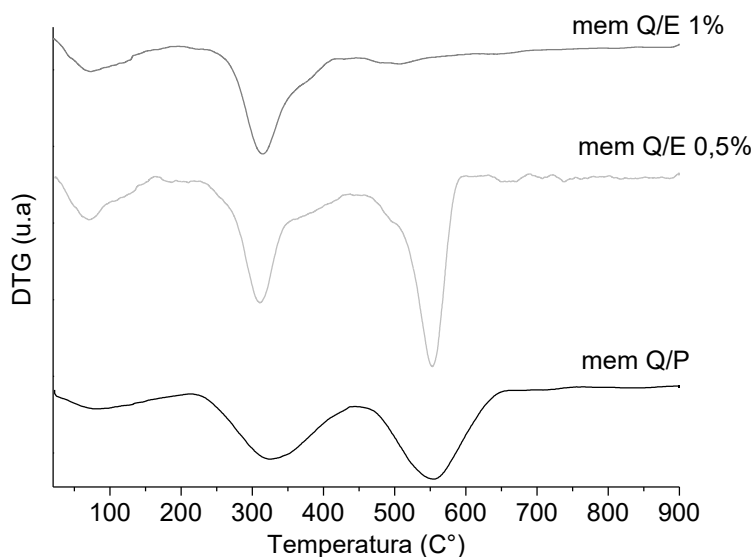
O terceiro estágio está presente nas mem Q/P e mem Q/E 0,5% certamente relacionado a despolimerização e a decomposição da matriz polimérica. A perda de massa foi de 42,4% para mem Q/P na faixa de temperatura de 466,7 a 653°C. E de 43,1% para a mem Q/E 0,5% entre as temperaturas de 466,7 a 653°C. As mem Q/P e mem Q/E 0,5% apresentaram 2,19% resíduos. Houve uma grande quantidade de resíduos nas mem Q/E 1% cerca de 30,1%, possivelmente correspondente presença de sais e outros resíduos do extrato CA. Esses por sua vez degradam-se em temperatura maiores que 900°C.

Figura 20 – Curva termogravimétrica das membranas de quitosana sem o extrato (mem Q/P) e membranas com a incorporação do extrato mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%



Fonte: Autora (2017).

Figura 21 – Derivada termogravimétrica (DTG) das membranas de quitosana sem o extrato (mem Q/P) e membranas com a incorporação do extrato mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%



Fonte: Autora (2017).

Abugoch et al.(2011) observaram dois estágios de degradação nas membranas de quitosana com a incorporação do extrato de proteína *quinoa* (*Chenopodium quinoa*) nas temperaturas 171°C e 271°C. Em contraste com este estudo, onde as mem Q/E 1% apresentaram duas perdas de massa no intervalo de temperatura 66,6°C e 312°C. Esses pesquisadores também relataram uma perda de

massa nas membranas de quitosanas sem incorporação de *C. quinoa* no intervalo de temperatura de 240°C a 380°C. Neste estudo as mem Q/P que apresentaram três perdas de massa.

Valência-Goméz et al. (2016) observaram que a incorporação do extrato de *M. tenuiflora* aumentou a estabilidade térmica das membranas de quitosana. As membranas com e sem incorporação do extrato apresentaram dois estágios de degradação. O primeiro a perda massa foi de 40%, 43%, 16% e 16% para relação Quitosana/ *Mimosa Tenuiflora* 100/0, 70/30, 90/10 e 80/20 atribuída a perda de água contida na membrana. Não houve uma relação proporcional a perda de massa conforme adição do extrato, o mesmo aconteceu nesse estudo. O segundo estágio de perda de massa entre 175 e 326 ° C foi devido a decomposição da cadeia polimérica da quitosana. Semelhante a esta pesquisa.

Kimura et al. (2016) verificaram que a incorporação do óleo de *Carapa guianensis* em membranas de quitosana colaborou para aumentar a estabilidade térmica dessas membranas. Concordando com esse estudo onde a incorporação de 1% extrato de *C. ambrosioides* nas membranas de quitosana promoveu aumento na estabilidade térmica das membranas obtidas.

O processo de degradação dos constituintes bioativos do extrato e da quitosana inicia-se em temperaturas superiores a 237,9°C, correspondente ao segundo estágio de perda massa. Deve-se respeitar esse intervalo térmico em todas as fases de manipulação desse extrato, para não haver degradação de seus fitoconstituintes, os quais podem alterar propriedades biológicas, a resposta fisiológica e terapêutica (SOUZA et al., 2014).

4.8 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

A curva DSC do pó de *C. ambrosioides* evidencia três picos endotérmicos e três picos exotérmicos (TABELA 2). O primeiro evento, endotérmico, em 96,27°C ($\Delta H=78,93$ J/g) está dentro da faixa de temperatura referente à perda de água desse material, demonstrada pela curva TGA/DTG (FIGURA 17 e 18). O 2° pico possivelmente relacionado à volatilização e a perda de componentes de baixo peso molecular do CA PÓ. O 3° e 4° pico está relacionado ao segundo estágio com maior perda de massa vista na TGA/DTG (FIGURA 17 e 18). E o último pico certamente está relacionado à degradação de constituintes do CA PÓ.

Tabela 2– Temperaturas e valores de ΔH envolvidos nos picos endotérmicos exotérmicos do pó de *C. ambrosioides*.

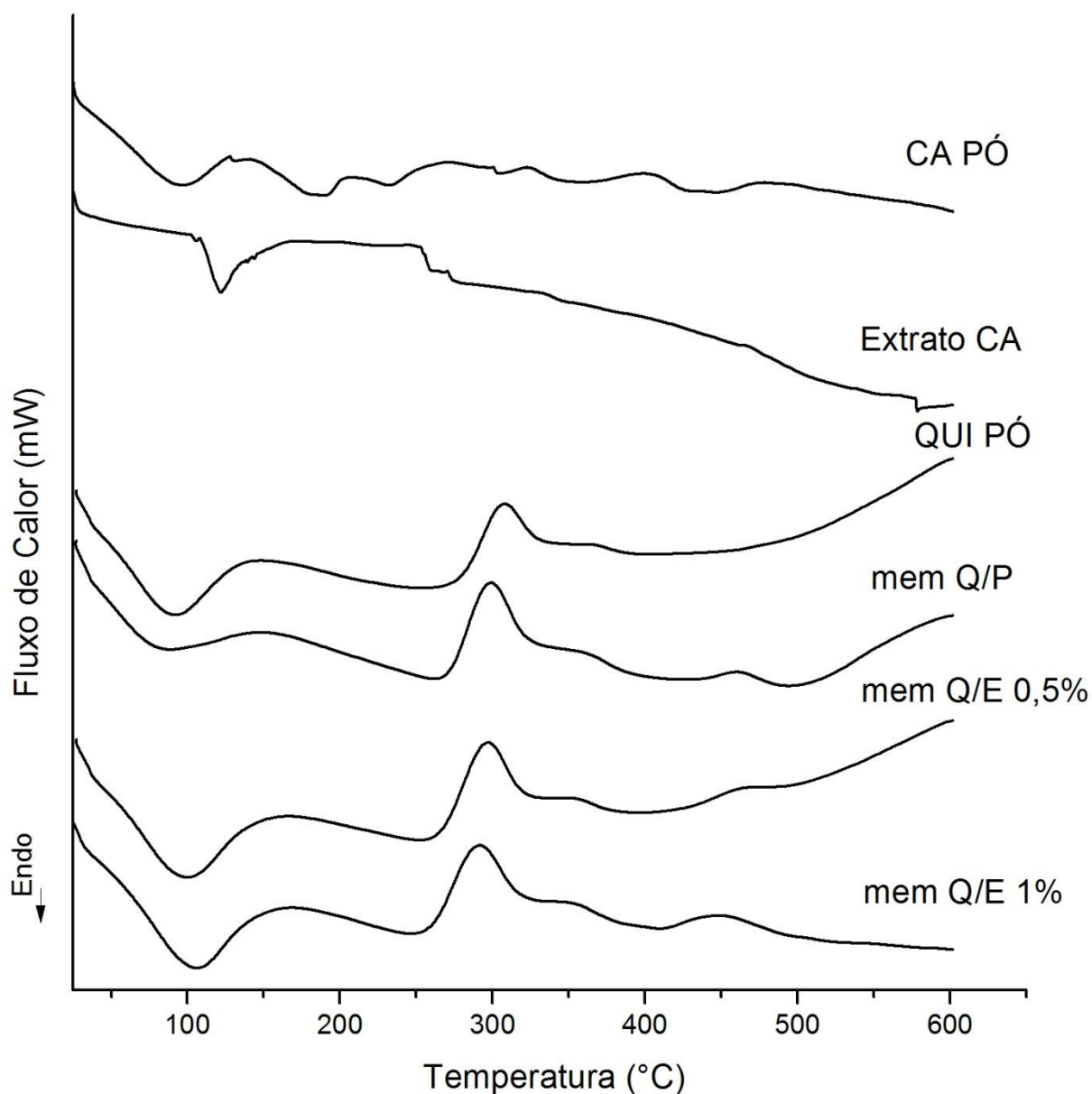
Eventos endotérmicos				
Picos	T onset (°C)	T endset (°C)	T peak (°C)	$\Delta H(J/g)$
1°	70,57	120,93	96,27	78,93
2°	163,91	199,38	198,65	29,50
3°	221,40	294,94	231,70	13,34
Eventos exotérmicos				
Picos	T onset (°C)	T endset (°C)	T peak (°C)	$\Delta H(J/g)$
4°	307,00	339,33	322,16	9,15
5°	347,37	421,63	398,28	20,33
6°	457,95	494,90	477,94	7,45

Fonte: Autora (2017).

Para o extrato CA a curva DSC mostra presença de dois eventos térmicos. O primeiro, endotérmico, a 121,58°C ($\Delta H=130,0$ J/g) está relacionado à perda de componentes voláteis, como etanol e água. Sendo esse pico referente ao primeiro estágio de perda de massa visto na curva TGA/DTG (FIGURA 17 e 18). O segundo, exotérmico, a 277,37°C ($\Delta H=51,28$ J/g) e corresponde ao início da degradação dos constituintes bioativos do extrato CA. Esse evento está dentro da faixa de temperatura vista no segundo estágio de perda de massa na curva TGA/DTG (FIGURA 16 e 17).

A análise da curva DSC do QUI PÓ (FIGURA 22) evidenciaram dois eventos térmicos. O primeiro, endotérmico, a 92,32 °C ($\Delta H = 207,71$ J/ g), correspondente ao processo de desidratação da amostra. Esse evento está dentro da faixa de temperatura referente ao primeiro estágio de perda massa evidenciado na TGA/DTG (FIGURA 19). O segundo, exotérmico, a 307,42 °C ($\Delta H = 116,25$ J/g) corresponde à decomposição desse polímero. Sendo esse pico referente ao segundo estágio de perda de massa presente na curva TGA/DTG (FIGURA 19). Corroborando, assim, com Santos; Soares; Dockal (2003) e Kimura et al. (2016).

Figura 22 – Curva DSC do CA pó, extrato CA, QUI PÓ, mem Q/P, mem Q/E 0,5% e 1%



Fonte: Autora (2017).

Nas curvas DSC das membranas produzidas foram observados três eventos térmicos. A mem Q/P apresentou um pico endotérmico, a 89,06 °C ($\Delta H = 105,71$ J/g) e dois picos exotérmicos, a 300 °C ($\Delta H = 201,81$ J/g) e 457,18°C ($\Delta H = 15,32$ J/g) (TABELA 3). Há um consenso na literatura que esse primeiro evento endotérmico e o primeiro evento exotérmico estão relacionados com a perda de água e degradação da quitosana, respectivamente (YUAN et al., 2011; KIMURA et al., 2016; MARQUES; CHAGAS; PEREIRA, 2016). O último pico exotérmico corresponde a despolimerização e decomposição da matriz polimérica. Sendo que todos os picos

possuem faixas de temperatura compatíveis com primeiro, segundo e terceiro estágio de perda de massa visto na curva TGA/DTG (FIGURA 20 e 21).

Tabela 3 – Temperaturas e valores de ΔH envolvidos nos picos endotérmicos e exotérmicos das membranas.

Membrana	Pico	Endotérmico	Exotérmico	Tonset (C°)	Tendset (C°)	T peak (C°)	$\Delta H(J/g)$
Q/P	1°	X		65,85	126,70	89,06	105,71
Q/E 0,5%	1°	X		60	135	100,22	305,27
Q/E 1%	1°	X		58,62	139,40	107,25	224,77
Q/P	2°		X	275,4	317,68	300	201,81
Q/E 0,5%	2°		X	268,42	315,86	297,97	182,49
Q/E 1%	2°		X	262,71	314,47	292,16	117,17
Q/P	3°		X	450,55	481,48	457,18	15,32
Q/E 0,5%	3°		X	444,11	474,31	468,99	9,06
Q/E 1%	3°		X	416,94	482,02	452,29	35,91

Fonte: Autora (2017).

Para as mem Q/E 0, 5% e mem Q/ E 1%, suas curvas DSC apresentaram um pico endotérmico e dois picos exotérmicos. O primeiro, endotérmico, a 100,22°C ($\Delta H = 201,81$ J/g) nas mem Q/E 0,5% e a 107,25°C ($\Delta H = 224,77$ J/g) nas mem Q/E 1%, associado à perda de componentes voláteis tanto da quitosana quanto do extrato, água e etanol. O segundo, exotérmico, a 297,97°C ($\Delta H = 182,49$ J/g) para mem Q/E 0,5% e a 292,16°C ($\Delta H = 117,17$ J/g) para mem Q/ E 1%, início da degradação da matriz polimérica e possivelmente a degradação de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos do extrato. O terceiro evento, exotérmico, a 452,29°C ($\Delta H = 35,91$ J/g) nas mem Q/E 1% também estão relacionados a essa degradação. Sendo que esses picos estão no intervalo de temperatura vistos na curva TGA/DTG para primeiro e segundo estágio de perda (FIGURA 20 e 21).

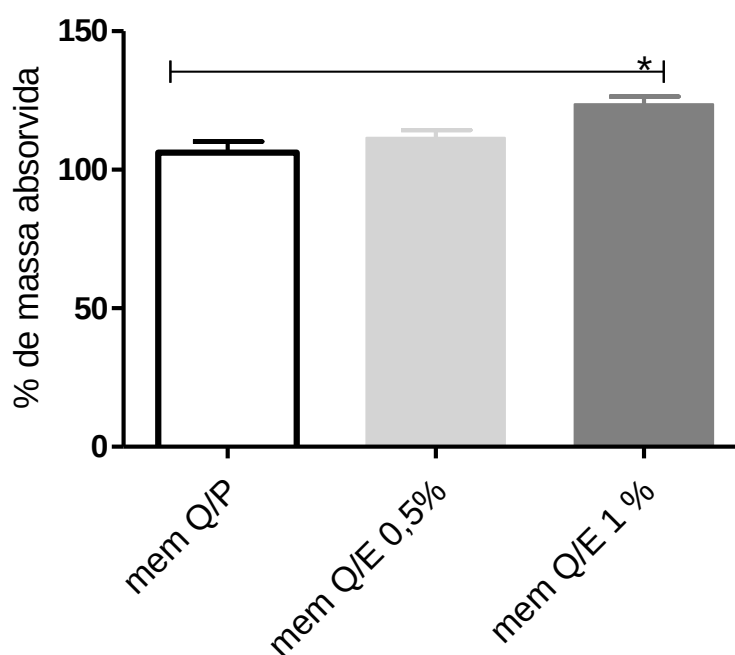
O terceiro evento, exotérmico, a 468,99°C com variação de entalpia de 9,06 J/g visto na curva DSC das mem Q/E 0,5% pode estar relacionada a decomposição da matriz polimérica. Já que nessa membrana houve a menor incorporação do extrato CA. Essa temperatura está presente no intervalo de temperaturas visto no

terceiro estágio de perda de massa expresso pela curva TGA/DTG (FIGURA 20 e 21).

4.9 ABSORÇÃO DE ÁGUA

O ganho de massa decorrente da absorção de água nas membranas puras e incorporadas foi analisado através da imersão destas em água destilada durante 72 h. As membranas com incorporação do extrato apresentaram maior capacidade de absorção de água que as membranas puras (FIGURA 23).

Figura 23 – Análise do percentual do ganho massa nas membranas puras (mem Q/P), mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%. O experimento foi realizado em triplicata com diferença significativa $p < 0,05$ (ANOVA) e * $p < 0,05$ (Bonferroni) entre a mem Q/E 1% e mem Q/P



Fonte: Autora (2017).

As membranas produzidas possuem com matriz o polímero quitosana. Os mecanismos de intumescimento em polímeros são dependentes da contribuição relativa da difusão do penetrante e da estabilidade polimérica (ANGELIS; SEGRE; CRESCENZI, 2001). Em membranas esse intumescimento começa quando as moléculas do solvente entram na matriz polimérica hidratando os grupos hidrofílicos mais polares, conseqüentemente há um intumescimento da rede polimérica que expõe seus grupos hidrofóbicos que irão reorganizar as moléculas de água nas proximidades. Posteriormente as moléculas adicionais entram nos interstícios da

rede polimérica ocupando os espaços seja nas cadeias dessa rede, nos poros, macroporos e nos vazios, denominada de água de preenchimento. Então a membrana começa a se dissolver dependendo da sua composição, temperatura e pH (HOFFMAN, 2002).

O aumento na absorção de água das mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1% sugere que a incorporação do extrato foi eficaz na formação de uma superfície mais hidrofílica. Sabe-se que a hidrofilicidade da quitosana se dá em função de seus grupos desacetilados associados aos grupos hidroxilas e amino que caracteriza essa forte afinidade por moléculas polares (ASSIS; SILVA, 2003). Kamel e colaboradores (2016) relataram que há interação intermolecular dos grupos OH, NH₂ da quitosana e dos grupos OH de compostos fenólicos. Corroborando com este estudo que mostrou anteriormente pelo FTIR das mem Q/E, que essa interação pode ter colaborado para o aumento do intumescimento da mem Q/E 1% e mem Q/E 0,5%.

A mem Q/E 1% apresentou aumento significativo no percentual de ganho de massa em relação a mem Q/P. Dessa maneira, observou-se que a água absorvida aumentou em razão do aumento da incorporação do extrato vegetal, corroborando com o estudo de Kamel; Abd El-Messieh, Saleh. (2016).

4.10 MOLHABILIDADE

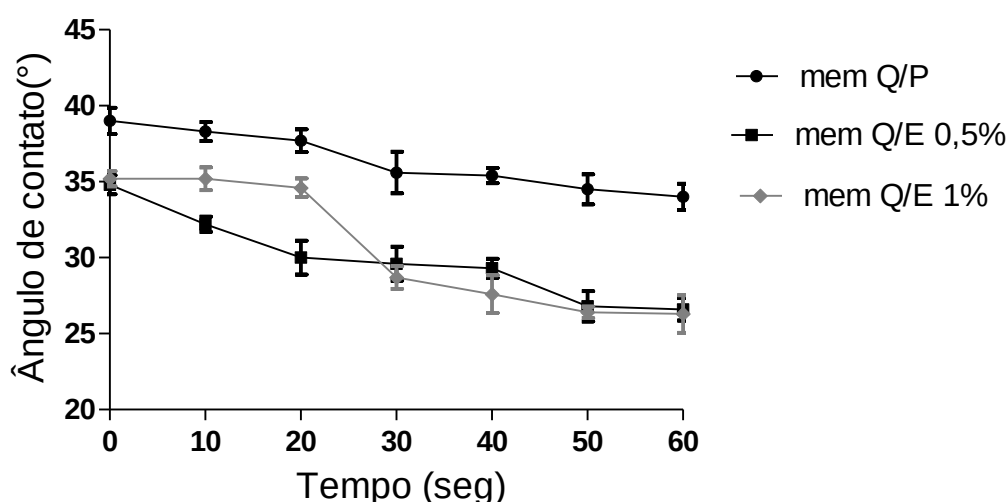
A hidrofilicidade uma característica importante na engenharia de biomateriais. Ela é diretamente dependente da energia de superfície e exerce influência no nível de contato de um biomaterial com as células presentes no tecido onde ele é inserido. Dessa forma o aumento da hidrofilicidade promove uma maior interação entre o biomaterial e o ambiente biológico ao seu redor (KIPALDI et al., 1998). Ademais a adesão e o crescimento celular nas superfícies são considerados fortemente influenciados pelo balanço hidrofilicidade/hidrofobicidade, descritos com frequência com o termo molhabilidade (ESPÓSITO et al., 2007).

As mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1% (FIGURA 25) que apresentaram ângulo de contato inferior a mem Q/P, ou seja, tiveram um aumento na molhabilidade em relação a mem Q/P. O ângulo de contato foi mensurado no tempo estabelecido de 60 segundos. A mem Q/E 1% apresentou menor ângulo de contato (26,3°), seguido da mem Q/E 0,5% (26,6°) e mem Q/P (34°). A redução do ângulo de contato está

relacionada a uma maior molhabilidade da superfície, assim os compostos polares do extrato incorporado podem ter interagido com a matriz polimérica.

A Figura 24 mostra a dinâmica de molhabilidade das membranas para a água, durante o intervalo de tempo de 0 a 60 segundos. Foi observado um maior espalhamento da gota para a mem Q/E 1% seguido da mem Q/E 0,5%. O menor espalhamento da gota foi observado para a superfície da mem Q/P. Certamente, na superfície de membranas com extrato há maior quantidade de grupos polares (tanto do extrato quanto da quitosana) disponíveis para interagir com a água.

Figura 24 - Dinâmica da molhabilidade em água nas membranas (mem Q/P/ mem Q/E 0,5%, mem Q/E 1%)



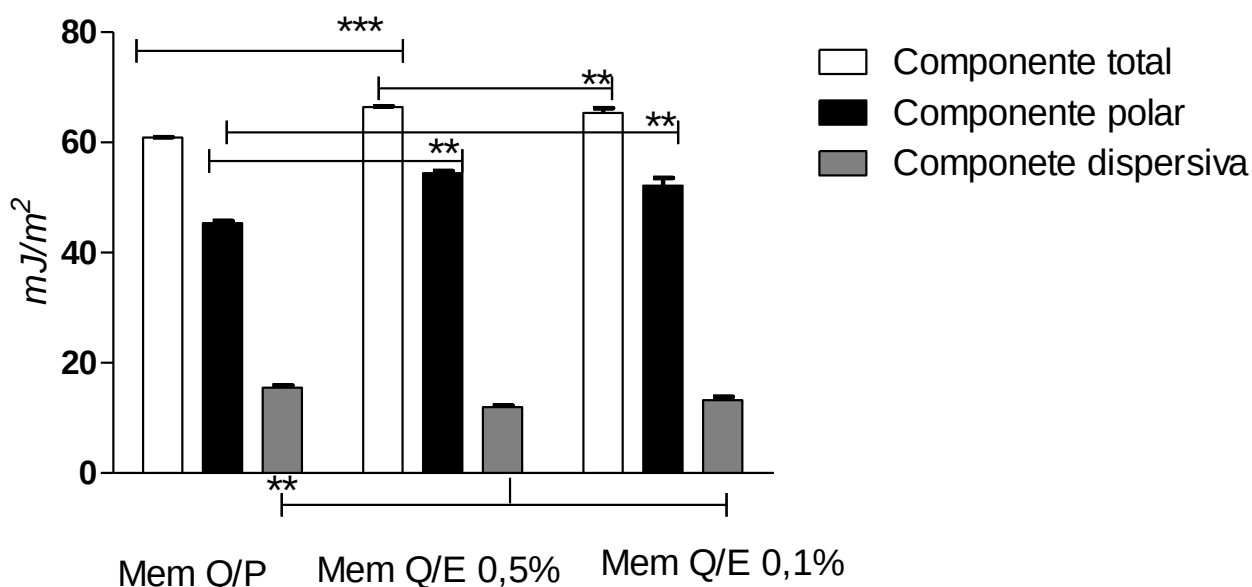
Fonte: Autora (2017).

Todas as amostras dessa pesquisa mostraram-se hidrofílicas, pois essas apresentam $\theta < 65^\circ$, conforme classificação de Vogle (1998). A hidrofiliidade natural da quitosana está relacionada com grupos NH_2 e OH presentes na estrutura química deste polímero (MÂCEDO et al., 2010). Isto pode evidenciar que nas membranas com extrato há maior quantidade de grupos OH livres oriundos tanto da quitosana quanto do extrato, o que propicia uma maior hidrofiliidade. Valência- Gómez et al. (2016) produziram membranas de quitosana com extrato hidroalcoólico de *Mimosa tenuiflora* e através da análise da molhabilidade observaram que essas membranas possuíam característica hidrofílica como as membranas com extrato produzidas neste estudo.

Em contraste com este estudo Lieder et al. (2012) que produziram membranas de quitosana com diferentes graus de desacetilação (47, 68, 87 e 94%) associada a fibronectina, essas possuíam características hidrofóbicas. Bispo (2009) também produziu membranas com caráter hidrofóbico, membranas de quitosana com genipin.

A energia de superfície afeta interações biológicas como: a adesão, a proliferação e a morfologia celular (PONSONNET, 2003; ZHAO et al., 2005; MÂCEDO, 2013). Assim, buscou-se avaliar a tensão superficial das membranas desenvolvidas. Na Figura 23 é mostrado as componentes de tensão (total, polar e dispersiva) dessas membranas com base nos valores dos ângulos de contato para os três líquidos testados (água, glicerol e formamida).

Figura 25 – Componente total, componente polar e dispersiva. O experimento foi realizado em triplicata com diferença significativa $p < 0,05$ (ANOVA) e $* p < 0,01$ (Bonferroni) entre a mem Q/P e mem Q/E (componente dispersiva). Para componente polar o $ p < 0,01$ (Bonferroni) entre mem Q/ E 0,5% e mem Q/P e $** p < 0,01$ (Bonferroni) entre mem Q/ E 0,5% e mem Q/1%. Para componente total o $** p < 0,01$ (Bonferroni) entre mem Q/ E 1% e me Q/P e $*** p < 0,001$ (Bonferroni) entre a mem Q/E 0,5%**



Fonte: Autora (2017).

Ao comparar membranas puras com membranas que possuem extrato observou-se que valores da componente dispersiva aumentaram significativamente na mem Q/P em relação as mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1%. Já para componente polar as mem Q/E 0,5% e mem Q/E 1% tiveram um aumento significativo comparado

a mem Q/P. A componente total das membranas com extrato apresentaram aumento significativo em relação a membranas puras.

Houve, portanto, nas amostras com extrato (mem Q/E 0,5 e mem Q/E1%) a predominância da componente polar em relação a componente dispersiva. Essa característica é importante na confecção de biomateriais cicatrizantes, pois a alta polaridade e energia de superfície tem efeito positivo na adesão e proliferação celular (PONSONNET, 2003).

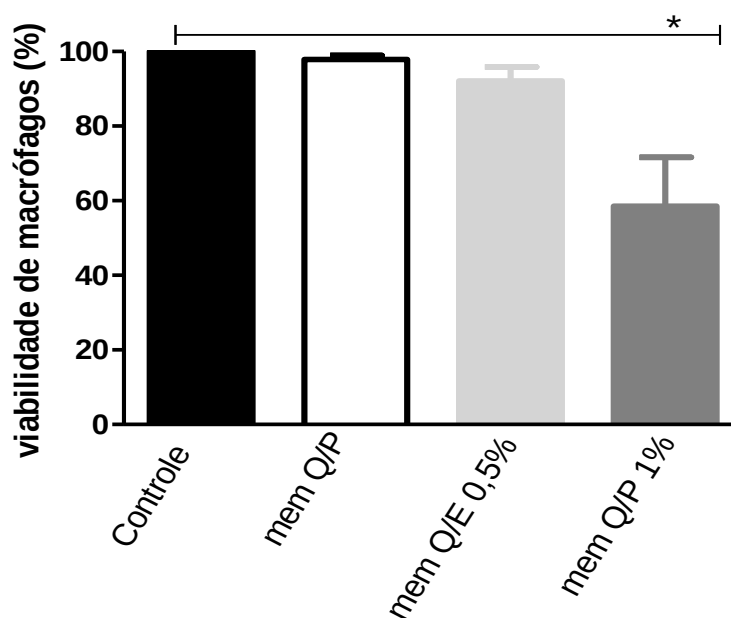
Macêdo (2013) tratou membranas de quitosana com plasma de argônio, oxigênio e hidrogênio e observou o aumento da componente polar. Em outro estudo Macêdo et al. (2010) prepararam membranas de quitosana puras e tratadas com plasma de hidrogênio, ambas se apresentaram hidrofílicas, sendo que essa última o seu ângulo de contato foi menor que a primeira devido ao aumento da componente polar. Nesta pesquisa as membranas com incorporação do extrato apresentaram maior componente polar que as membranas puras e também houve um aumento no aspecto da hidrofília dessas, corroborando assim com os estudos supracitados.

4.11 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS PELO TESTE DO MTT

Para análise da atividade citotóxica foi utilizado o teste do MTT. Onde o composto conhecido como MTT entra nas células pela membrana plasmática e, em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial, é oxidado a MTT-formazan. Dessa maneira, a oxidação de MTT é proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, o número de células viáveis é mensurável conforme o MTT (LOOSDRECHT et al., 1991). A viabilidade celular é um aspecto importante para utilização de qualquer molécula com finalidade terapêutica (THAYA et al., 2016).

Neste estudo a avaliação da citotoxicidade através do teste MTT mostrou que os valores de concentração inibitória 50 (CI₅₀) em µg/mL ficaram fora da curva de regressão linear por probitos, ou seja, as membranas obtidas não apresentaram citotoxicidade significativa (FIGURA 26). A mem Q/E 1% apresentou menor viabilidade de macrófagos (*p <0,05) quando comparada ao grupo controle. Os percentuais de viabilidade celular da mem Q/E 0,5% (92%) e mem Q/P (97,8%) foram semelhantes.

Figura 26 – Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos murinos das membranas de quitosana pura (mem Q/P); membranas de quitosana com incorporação de 0,5% do extrato *C. ambrosioides* (mem Q/E 0,5%) e membranas de quitosana com incorporação de 1% de extrato *C. ambrosioides* (mem Q/E 1%). O grupo controle foi composto por macrófagos. Os dados representam a média da triplicata das amostras com diferença significativa $p < 0,05$ (ANOVA). E com * $p < 0,05$ (Bonferroni) entre mem Q/E 1% e controle



Fonte: Autora (2017).

Estudos anteriores reportaram que quitosana, derivados de quitosana e biomateriais a base desse polímero possuem boa compatibilidade celular e baixa citotoxicidade (VAVRIKOVÁ et al., 2011; THAYA et al., 2016). Cruz e colaboradores (2007) mostraram que uma baixa concentração (5 mg/kg) de extrato hidroacóico de folhas de *C. ambrosioides* induziu o aumento de ativação de macrófagos e recrutamento/proliferação celular em órgãos linfóides secundários. Neste estudo as membranas obtidas com incorporação de 0,5% (mem Q/E 0,5%) do extrato de *C. ambrosioides* apresentaram maior viabilidade de macrófagos que a membranas com incorporação de 1% desse extrato (mem Q/E 1%).

A atividade melhorada em macrófagos por *C. ambrosioides* relatada por de Cruz et al. (2007) está associada ativação de macrófagos consequentemente a atividade fagocítica. A capacidade de ativação do macrófago é importante para o processo de fagocitose e também para o processo migratório de macrófagos para o sítio inflamatório. As mem Q/E 0,5% tiveram boa viabilidade de macrófagos. Isto

indicou que essa concentração extrato incorporado é interessante para a viabilidade celular.

A literatura mostra que membranas de quitosana não se apresentaram citotóxica quando testadas em fibroblastos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; MACEDO, 2013; VALÊNCIA-GÓMEZ et al., 2016) e queratinócitos (CHATELET et al., 2001; VEDAKUMARI et al., 2017). As membranas de quitosanas dessa pesquisa não se apresentaram citotóxicas em macrófagos.

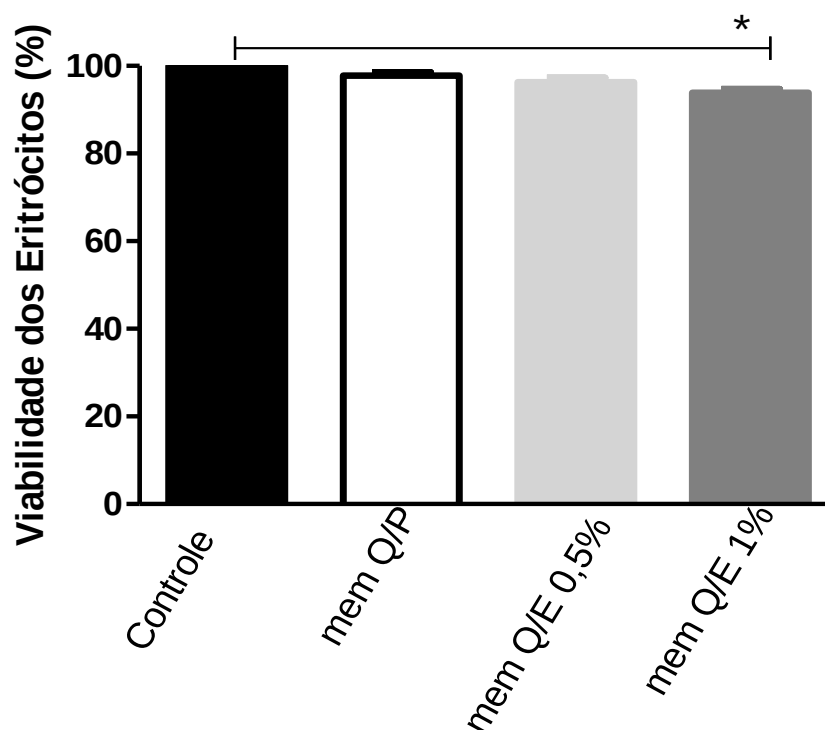
Outros estudos como o de Valência-Gómez et al. (2016) que obtiveram membranas de quitosana com extrato vegetal e o de Ding et al. (2017) que produziram nano partículas a partir de quitosana e extrato de planta, mostraram que esses materiais têm baixa citotoxicidade. Corroborando assim, com os resultados desta pesquisa.

4.12 CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS DE CARNEIROS

Os resultados obtidos no ensaio de atividade hemolítica demonstraram que as membranas produzidas não apresentaram citotoxicidade sobre os eritrócitos de carneiro. A viabilidade dos eritrócitos foi comparada a uma amostra de sangue total incubada apenas com PBS, utilizada como controle negativo, já que o PBS não induz a lise das células por garantir isotonicidade do meio.

A análise dos resultados do ensaio de atividade hemolítica mostrou que os valores de concentração hemolítica 50 (CH_{50}) em $\mu g/ml$ ficaram fora da curva de regressão linear por probitos. A mem Q/E 1% apresentou menor viabilidade dos eritrócitos (93,8%) com $*p < 0,05$ quando comparada ao grupo controle (FIGURA 27). Os percentuais de viabilidade celular da mem Q/E 0,5% (96,2%) e mem Q/P (97,8%) foram semelhantes.

Figura 27 – Porcentagem de viabilidade celular de eritrócitos de carneiros das membranas de quitosana pura (mem Q/P); membranas de quitosana com incorporação de 0,5% do extrato *C.ambrosioides* (mem Q/E 0,5%) e membranas de quitosana com incorporação de 1% de extrato *C. ambrosioides* (mem Q/E 1%). O grupo controle foi composto por eritrócitos em PBS. Os dados representam a média da triplicata das amostras, com diferença significativa $p < 0,05$ (ANOVA) entre as amostras. E * $p < 0,05$ (Bonferroni) entre a mem Q/E 1% e grupo controle.



Fonte: Autora (2007).

Os eritrócitos contêm altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos. Essas células sanguíneas são altamente vulneráveis à ação de agentes citotóxicos (SANTOS, 2009). Sendo assim, a utilização de ensaios relacionados a hemólise são de suma importância para a confecção de novos biomateriais. E para utilizar membranas biopoliméricas no contexto de aplicações biomédicas, é necessário analisar as propriedades hemolíticas desses materiais (UNGUREANU et al., 2015).

O extrato bruto de *C. ambrosioides* foi incorporado em membranas quitosana neste estudo. Sabe-se que a ação tóxica de alguns metabólitos secundários, como as saponinas triterpênicas podem apresentar a capacidade de produzir hemólise (DEWICK, 2002). Esse efeito resulta da interação desses metabólitos com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com consequente

extravasamento do conteúdo intracelular (DEWICK, 2002; CARVALHO; OLIVEIRA; VALERIO, 2012).

Embora estudos químicos de *C. ambrosioides* mostraram a presença de compostos tóxicos como: terpenos, saponinas e ascaridol (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009; JARDIM et al., 2010; JARDIM et al., 2008). Segundo Pequeno e Soto-Blanco (2006) a *C. ambrosioides* não evidenciou atividade hemolítica. Nesta pesquisa as membranas com incorporação desse extrato CA apesar de apresentarem uma pequena redução da viabilidade dos eritrócitos não apresentaram citotoxicidade.

Estudos anteriores reportaram que derivados de quitosana possuem boa viabilidade de eritrócitos, consequente hemocompatibilidade (NATRANJA et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Esses resultados foram compatíveis com este estudo, sugerindo que as membranas desenvolvidas apresentam condições satisfatórias para aplicação com biomaterial.

5 CONCLUSÕES

Foi possível obter membranas de quitosana com a incorporação do extrato de *Chenopodium ambrosioides*. Pode-se perceber que a incorporação do extrato hidroalcólico liofilizado de *C. ambrosioides* tornou as membranas de quitosana mais vantajosas, principalmente no aspecto de absorção de água e aumento da hidrofiliabilidade. Bem como não apresentaram citotoxicidade. Características essas essenciais para uso como biomaterial.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Determinar a caracterização estrutural do extrato a partir de LC/MS;
- Verificar a morfologia das membranas a partir do MFA;
- Realizar ensaios não-clínicos utilizando camundongos com modelos de feridas e analisar do seu mecanismo de ação nesses.

REFERÊNCIAS

- ABUGOCH, E.L.; TAPIA, C.; VILLAMÁN, M.C. et al. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. **Food hydrocoll**, v.25, p.879-886, 2011.
- ANDRADE, S.M.B.; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; ROCHA, B.G.; BELERMINO, D.B.; Galvão, A.O. Preparação e caracterização de membranas de quitosana de camarões (*Litopenaeus vannamei*) E CARANGUEJOS (*Ucides cordatus*). **Revista de Biologia e Farmácia**. v.7, n.2, p.102-111, 2012.
- ANGELIS, C. D.; SEGRE, A.; CRESCENZI, V.; Water in Hydrogels. An NMR Study of Water/Polymer Interactions in Weakly Cross-Linked Chitosan Networks. **Macromolecules**, v.34, n.12, p. 4136-4144, 2001.
- ANTONINO, N.A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. 2007. 89p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica). Universidade Federal do Paraíba. João Pessoa-PB.
- APG IV Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 181, p. 1-20, 2016.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v.13, n.4, p. 223-228., 2003.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v.15, n.1, p. 9-132, 2011.
- BARRAL, S.M. **O uso do extrato hidroalcoólico de barbatimão associado ao filme de quitosana para a cicatrização de feridas cutâneas complexas em ratas**. 101f. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia), Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.
- BARROS, L.; PEREIRA, E.; CALHELHA, R.C. ; B, DUEÑAS, M. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**. v.5, p.1731-1740, 2013.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BISPO, V.M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 189f. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

BLANCKAERT, I; PAREDES-FLORES, M; ESPINOSA-GARCÍA, F.J; PIÑERO, D; LIRA R. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.59, n.4, p. 557-573, 2012.

BRANCA, C. et al. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. **Polymer**, v. 99, p. 614–622, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CARRILLO-LÓPEZ, L. M; ZAVALA-MANCERA, H.A; VILCHIS-NESTO, A. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Nanomaterials**. p.1-9, 2014.

CARRILLO-LÓPEZ, L. M; SOTO-HERNÁNDEZ, R. M. ZAVALA-MANCERA, H. A. AND A. R. VILCHIS-NÉSTOR. Study of the performance of the organic extracts of *Chenopodium ambrosioides* for Ag nanoparticle synthesis, **Journal of Nanomaterials**, p1-13, 2016.

COMITE EUROPEEN DE NORMALISATION. ISO 62: 2008: Plastics: Determination of water absorption, 2008.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 4, 1984.

CHEN, X.; ZHENG, L.; WANG, Z.; LEE, C.; PARK, H et al. Protonation constants of Chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.30, p.5915-5918, 2002.

CHEVALLER, A. **The encyclopedia of medicinal plants**. New York: A D K Publishing Book, 1996.

CHU, S.S.; HU, J.F.; LIU, Z.L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, v.67, n.6, p.714-718, 2011.

CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V.; PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 148-154, 2007.

CYSNE,D.N; FORTE,T.S; REIS, A.R et al. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Parasitology Research**, v.115, n11, p.4327-4334, 2016.

DESHMUKH, R.R; BHAT, N.V. The mechanism of adhesion and printability of plasma processed PET films. **Materials Research Innovations**, v.7, p.283-290, 2003.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. John Wiley & Sons LTD, 2° ed., p.291-300, 2002.

DING, L., SHANA, X, ZHAO, X. et al. Spongy bilayer dressing composed of chitosan–Ag nanoparticles and chitosan–*Bletilla striata* polysaccharide for wound healing applications. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p. 1538–1547, 2017.

ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA,B. M.P.; DUEK, E. A. R.. Estudo da interação células vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. **Matéria**, v. 12, n.1, p.164-167, 2007.

FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 443–447, 2013.

FOWKES, F.M. Rate of absorption of calcium dinonylnaphthalene sulfone in n decane. **Journal Physical Chemical**, p.67-2538, 1963.

FRÁGUAS, R.M. et al. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**, v.25, n.2, p. 205-211, 2015.

FRANCO, K.L. et al. Pure synthetic hydroxyapatite, collagen associated synthetic hydroxyapatite and liposome associated synthetic hydroxyapatite as abone substitute for defects in bone healing of dogs: transmitted light microscopy osteointegration aspects. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 1-7, 2001.

GE, Z. et al. Hydroxyapatitechitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. **Biomaterials**, v.25, p.1049-1058, 2004.

GOMES, R. V. Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2007.**

GONÇALVES, V.L.; LARANJEIRA, M.C. M; FÁVERE, V.T. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac Sodium. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n° 1, p. 6-12, 2005.

HOFFMAN, A.S. Hydrogel for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.3-12, 2002.

JARDIM, C. M.; JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; FREIRE, M. M.; Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal Chemical Ecology**, v.34, p. 1213-1218, 2008.

JARDIM, C. M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Hexane Extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, n. 10, p.1814-1818, 2010.

KAMEL, N.A.; ABD EL-MESSIEH, S.L.; SALEH, N. M. Chitosan/banana peel powder nanocomposites for wound dressing application: Preparation and characterization, **Materials Science & Engineering**, v. 72, p. 543-550, 2016.

KANDPAL, VINEET; JOSHI, PRASOON K. ; JOSHI, NEETA. GC-MS Analysis of Seed Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. Collected from Himalayan Region. **TEOP**.v, 19. n,1, p. 258-261, 2016.

KIMURA, V.T.; MIYASATO, C. S.; GENESI, B. P., et al. The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film. **Polímeros**, v.26, n.2, p 168-175, 2016.

KISMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira; 1991.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z. ; NEDIALKOV, P. T.; NIKOLOV, S. D. The genus *Chenopodium*: phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology, **Pharmacognosy Reviews**, vol. 3, n. 6, p. 280–306, 2009.

LIEDER, R.; DARAI, M.; THOR, M.B. In vitro bioactivity of different degree of deacetylation chitosan, a potential coating material for titanium implants, **Society for biomaterials**, p. 1-8, 2012.

LISBOA NETO, J. A. et al. Avaliação do efeito cicatrizante da aroeira e do mastruço em feridas de extração dental em ratos: estudo histológico. **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**, v.6, p. 173-176, 1998.

LIU, B.S., HUANG, T.B. A novel wound dressing composed of nonwoven fabric coated with chitosan and herbal extract membrane for wound healing. **Polymer Composites**, v. 31, p. 1037–1046, 2010.

LOFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2008.

LOOSDRECHT, A.V., NENNIE, E., OSSENKOPPELE, G.J., BEELEN, ROBERT, H.J., LANGENHUIJSEN, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay, **Journal of Immunological Methods**, v.141, p.15-22, 1991.

MA, J; XIN, C; TAN, C. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p.547–556, 2015.

MACÊDO, M. O. C. **Efeito do Tratamento por Plasma na Proliferação de Fibroblastos e Esterilização de Membranas de Quitosana**, 97f. 2013. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

MACÊDO, M. O.C.; MACEDO, H. R. A.; BARBOSA, J. C. P.; PEREIRA, M.R.; ALVES JÚNIOR, C. Perfil da molhabilidade em membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.5, n.3, p.12-16, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, p. 429-438, 2002.

MARQUES, J.S.; CHAGAS, J.A.O.D.; FONSECA, J.L.C. ; PEREIRA, M.R. Comparing homogeneous and heterogeneous routes for ionic crosslinking of chitosan membranes. **Reactive and Functional Polymers**, v.103, p.156–161, 2016.

MARTINS, C. S.; MORGADO, D. L.; ASSIS, O. B. G. Cashew gum-chitosan blended films: spectral, mechanical and surface wetting evaluations. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 8, p. 691-697, 2016.

MATOS, F.J.A. **Banco de dados de plantas medicinais do Ceará**. Editora da UFC, 1993.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, n.2, p.131-140, 1997.

NASCIMENTO, F.R.F., CRUZ, G.V.B., PEREIRA, P.V.S., MACIEL, M.C.G., SILVA, L.A., AZEVEDO, A.P.S., BARROQUEIRO, E.S.B., GUERRA, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650–2653, 2006.

NATRAJAN, D., SRINIVASAN, S., SUNDAR, K. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p.560-568, 2015.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 50-53, 2007.

OKAMOTO, Y. et. al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2002.

OKAMOTO, A. Y.; YANO, R. ; MIYATAKE, K. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation; **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p.337–342, 2003.

ORZELANNY, C. et al. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. **Biomaterials**, v.31, p.8556-8563, 2010.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n.1, p. 45-48, 2006.

PEREIRA, W. S. ***Chenopodium ambrosioides* L.: Avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória.** 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Maranhão. São Luís- MA.

PEREIRA, W.S; RIBEIRO, B.P; SOUSA, A.I; SERRA, I.C et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal Ethnopharmacol**, v.127, p.602-605, 2010.

PINHEIRO NETO, V.F., ARAÚJO, B.M.A., CANDANEDO, P., et al. Efeito do cataplasma das folhas de mastroz (*Chenopodium ambrosioides*) na reparação de tecidos moles e ósseo em rádio de coelho. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.3, p. 62-66, 2013.

PIRIZ, M.A. ; LIMA, C.A.B.; JARDIM, V.M.R et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.3, p.628-636, 2014.

PONSONNET, L. et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and Engineering**, v. 23, n. 4, p. 551-560, 2003.

QI, L; XU, Z; JIANG,X et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v.339, p. 2693- 2700, 2004.

REZENDE NETO,J.M. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana* L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** 2011.75p. Tese: Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju-SE.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Revista de cosmiatria & medicina estética**, v.5, n.2, p.26-35, 1997.

RODRIGUEZ-CLEMENTE, E. et al. Corrosion Inhibition of Carbon Steel in H₂SO₄ by *Chenopodium ambrosioides*. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 6360 – 6372, 2011.

SÁ, R. D. *et al.* Chemical composition of the essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. grown in Recife-PE, Brazil. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.95, n.3, p. 855 - 866, 2014.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SÉRVIO, E.M. L.; ARAÚJO, K.S.; NASCIMENTO, L. R. S. *et al.* Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **Conscientiae Saúde**, v.10, n.3, p.441-448, 2011.

SHAHBAZI, M; RAJABZADEH, G; AHMADI, S.J. Characterization of nanocomposite film based on chitosan intercalated in clay platelets by electron beam irradiation. **Carbohydrate Polymers**.v.9, p.1-37, 2016.

SHIDHAYE, S. S.; SAINDANE, N. S.; SUTAR, S.; KADAM, V. Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 909-916, 2008.

SILVA, D.L. F.; BRAGA FILHO, J. A. F.; SOUSA, A. K. S. Potencial anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. no modelo de cistite hemorrágica em camundongos. **Revista Ciências da Saúde**. v.17, n. 1, p. 25-32, 2015.

SILVA, H.S. R.C; SANTOS, K.S. C. R; FERREIRA, E. Quitosana: derivados hidrossolúveis. Aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 776-785, 2006.

SILVA, S.S. ; POPA, E.G. ; GOMES, M.E. *et al.* An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p.6790–6797, 2013.

SOARES, C, D., CARVALHO, M.G.F. CARVALHO, R.A. *et al.* *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n.12, p. 812-818, 2015.

SONG, K.; ZHANG, J; ZHANG, P. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.17, n.5, p 1-20, 2015.

SOUZA, A. P. O.; OLIVEIRA, R. M.; OLIVEIRA, S. F. *et al.* Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* . **Scientia Plena**. v.11, n.7, p.1-9, 2015.

SOUZA, M. P. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Edições UFC, 416p, 1991.

SOUZA, E.A. et al. **Caracterização térmica de extrato de *Croton blanchetianus* Baill.** In: IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, Serra Negra, SP, Brasil, 2014.

SOUZA, K.V; ZAMORA, P.G. P.; ZAWADZKI, S.F. Esferas de quitosana/Fe na degradação do corante azul QR-19 por processos foto-fenton utilizando luz artificial ou solar. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2010.

TANG,F; LV, L; LUA,F, et al. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.93, p 1192-1205, 2016.

THAYA, R.; MALAIKOZHUNDAN, B.; VIJAYAKUMAR, S.et al. Microbial Pathogenesis Chitosan coated Ag / ZnO nanocomposite and their antibio fi lm , antifungal and cytotoxic effects on murine macrophages. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 124–132, 2016.

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

TORLAKA, E.; SERTB, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules** .v. 60, p 52– 55, 2013.

TRINDADE, C.G.N. **Obtenção de membranas de quitosana modificadas e estudo das suas propriedades térmicas e permeabilidade.** Dissertação de Mestrado. UFRN, Natal, 2006.

TRINDADE, R. C. P.; FERREIRA, E. S.; GOMES, I. B.; SILVA, L, et al. Extratos aquosos de inhame (*Dioscorea rotundata* Poirr.) e de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 2, p. 291-296, 2015.

TRIVELLATO-GRASSI, L; MALHEIROS, A; MEYRE-SILVA,C, et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, n.1, p. 127–138, 2013.

UGALDE, M.L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**,168f. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, Erechim.

UNGUREANU,C, IONIȚĂ,D, BERTEANU,E. et al Improving Natural Biopolymeric Membranes Based on Chitosan and Collagen for Biomedical Applications Introducing Silver, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n.3, 2015.

VALÊNCIA-GÓMEZ, L.E. MARTEL-ESTRADA, S. A., VARGAS-REQUENA, C., et al. Chitosan/Mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration . **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p.1217–1225, 2016.

VALÉRIO, E. S. **Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólicos de *Chenopodium ambrosioides* L. e *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. in vitro**, 2014. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

VASCONCELOS, C.L. et. al. Electrolyte diffusion in a chitosan membranes. **Polymer International**, v.50, p. 309-312, 2001.

VAVRIKOVÁ,E, MANDIKOVAB,J, TREJTNARB, F. ET AL. Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculotic drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1901–1907, 2011.

VEDAKUMARI , W.S, AYAZ ,N., KARTHICK, A.S. et al. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials — Fabrication, characterization and in vivo analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 106–112, 2017.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial Surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.74 , p.69-117, 1998.

WAN, Y.; WANG, Y.; LIU, Z. Adhesion and proliferation of OCT – 1 osteoblast-like cells on micro and nonoscale topography structured poly (L-lactide). **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4453-4456, 2006.

WANG, Q. Z.; CHEN, X.G.; LIU, N., et al. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p.194- 201, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO SITES. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014- 2023. (WHO, 2014) Disponível em: <http://www.who.int/about/licensing/copyrightform/en/index.html/> Acesso em: 22 agosto, 2015.

YUAN ,Y; CHESNUTT, B.M; HAGGARD, W.O; BUMGARDNER,J.D.Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and *in vitro* Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. **Materials**, v.4, p.1399-1416, 2011.

ZHAO, G. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.74, n.1, p. 49–58, 2005.

ZHOU,Y., LI, J., LU, F. et al. A study on the hemocompatibility of dendronized chitosan derivatives in red blood cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2635–2645, 2015.

ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFPI



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Preparo e caracterização de membranas de quitosana com incorporação do extrato hidroalcoólico liofilizado de *Chenopodium ambrosioides*”, registrada nº 262/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. FERNANDO AÉCIO DE AMORIM CARVALHO– Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica (ou Ensino)- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **20/01/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Fevereiro/ 2017 à Maio/ 2017
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ Balb/c 2. Ovino/ carneiro
Nº de Animais	1. 05 2. 01
Peso/ Idade	1. 20 à 22g/ Meses 2. ---/---
Sexo	Machos
Origem	1. Biotério Setorial da UFPI 2. Biotério do CCA/UFPI

Teresina, 20 de Janeiro de 2017.

Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora