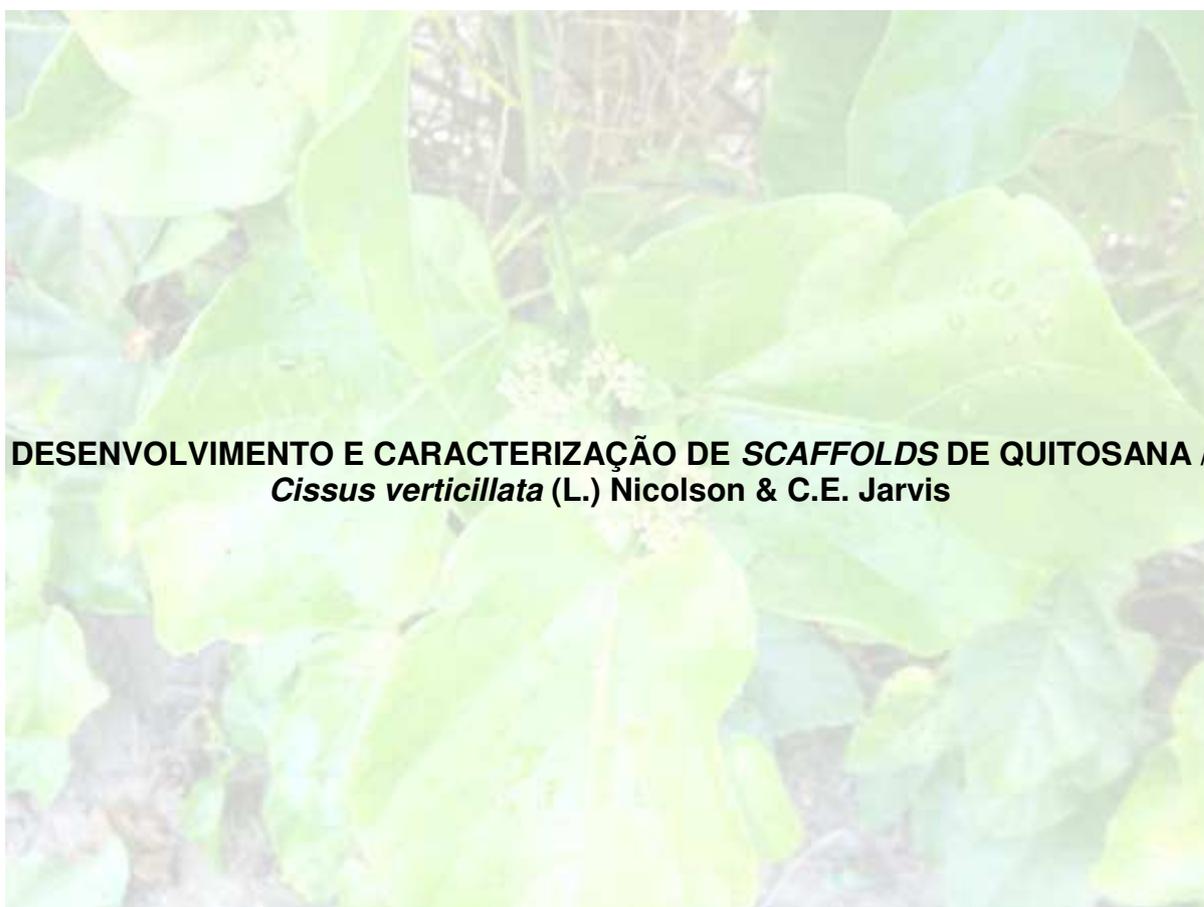


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

ROSANA ARAÚJO ROSENDO



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA /
Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis**

Campina Grande - PB
2016

ROSANA ARAÚJO ROSENDO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA/
Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande - PB
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

R813d Rosendo, Rosana Araújo.

Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis / Rosana Araújo Rosendo. – Campina Grande, 2016.

181 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro Ciências e Tecnologia, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Marcos Vinícius Lia Fook".

Referências.

1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Fitoterapia. 4. Diabetes Melito. I. Lia Fook, Marcos Vinícius. II. Título.

CDU 62:61(043)

VITAE DO CANDIDATO

- Cirurgiã-dentista pela UFPB (2000).
- Especialização em Saúde da Família pela UEPB (2007).
- Mestre em Odontologia pela UFPB (2011).

ROSANA ARAÚJO ROSENDO

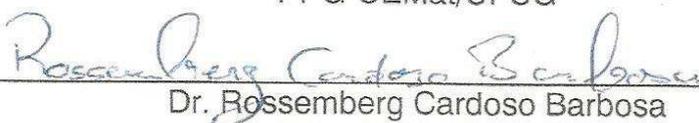
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA/ *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 29/02/2016



Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
Examinador Externo
UAEMA/UFCG



Dr.ª Carmem Dolores de Sá Catão
Examinadora Externa
CCBS/UFCG



Dr. Fabio Correia Sampaio
Examinador Externo
CCS- UFPB



Dr.ª Renate Maria Ramos Wellen
Examinadora Externa
DEMAT-UFPB

Dedico este trabalho ao meu filho Lucas Araújo dos Santos para que meu esforço, minha determinação e força de vontade, meu estudo, minhas pesquisas e meu trabalho sejam exemplos para tí, minha razão maior de viver e existir!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Pelo acolhimento no CERTBIO, pela dedicação ao ensino e à pesquisa, pela compreensão e apoio. Por me ensinar, me questionar, me instigar e fazer com que eu buscasse as respostas científicas que eu precisava. Meu eterno agradecimento!

Ao Professor Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa

Pela atenção, dedicação ao trabalho e à pesquisa, nunca se opondo a esclarecer meus questionamentos, incentivando-me e encorajando-me na arte de desenvolver filmes e *scaffolds* de quitosana, registro aqui meu eterno agradecimento e amizade, além de meu profundo respeito à sua pessoa, um ser humano incrível!

Ao Professor Dr. Fábio Correia Sampaio

Professor e amigo, por todas as contribuições dadas para meu crescimento como pesquisadora e profissional.

Ao professor Dr. José Maria Barbosa Filho

Que me acolheu no IPeFarM (UFPB), viabilizando a obtenção do extrato e a realização do screening fitoquímico de *Cissus verticillata* (L.).

Ao Professor Dr. Josean Fechine Tavares

Por ter sido tão receptivo e por ter concedido a realização de ensaios preliminares de CLAE no IPeFarM (UFPB).

À professora MSc. Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros

Minha grande amiga, que compartilhou e vivenciou comigo todas as etapas deste e de tantos outros momentos da minha vida. Com você tudo foi mais tranquilo, as viagens tornaram-se menos exaustivas, e tudo foi mais viável. A partir de agora continuaremos nossas vidas em Patos, dividindo nossa sala, nossas disciplinas e nossa experiência. Obrigada por tudo amiga!

Ao Professor Dr. Jackson Borba da Cruz

Grande exemplo de mestre, professor, cientista e amigo, meu muito obrigada por tudo! Sempre me fortalecendo e me fazendo acreditar que chegaríamos, com êxito, ao final do doutorado.

À professora Dr^a. Carmem Dolores de Sá Catão

Amiga que me incentivou a fazer parte deste grupo de pesquisa, meu eterno agradecimento!

Ao professor MSc. José Edmilson Mazza Batista

Pelo seu excelente trabalho estatístico desenvolvido nesse trabalho, e por todas as vezes que precisei de suas orientações e esclarecimentos, nunca se opondo em me ajudar, meus mais sinceros agradecimentos!

A Deus, pela dádiva da vida!

Aos meus pais **João Rosendo Filho e Celiana Araújo Rosendo**, pelo amor, apoio e exemplo de vida, ensinando-me os caminhos que devo seguir com a proteção Divina. Obrigada por terem feito de mim um ser humano!

Às minhas irmãs **Hannah Araújo Rosendo e Kaliana Araújo Rosendo** que sempre se fizeram presentes e me deram apoio e amor incondicional. Que nossa amizade só se fortaleça a cada dia. Amo vocês!

Ao meu esposo e companheiro **Beethoven dos Santos da Silva** pela força e pela compreensão diante de minha ausência, e pelo apoio e amor imensuráveis no decorrer desse trabalho.

A Lucas Araújo dos Santos

Minha pérola maior, meu filho. A quem ensino e com quem aprendo diariamente a arte de amar.

Aos meus sobrinhos Sophie Rosendo Grisi e Khalil Araújo Rosendo Salgado

Pela alegria transmitida, tornando mais leves e tranquilos muitos momentos dessa etapa. Amo vocês e espero contribuir de alguma forma para o crescimento pessoal e profissional de cada um.

Aos demais familiares e amigos

Pela torcida, apoio e compreensão.

A Judivan Lopes Araújo

Pela amizade e colaboração ao longo do desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!!

À Lucineide Alves da Silva

Neidinha, minha funcionária e amiga, que cuidou com tanto amor e carinho de meu filho Lucas, todos os dias e horas que precisei me ausentar para a realização desse sonho, meus mais sinceros agradecimentos!

Ao meu Diretor Espiritual Padre José Ronaldo Marques Costa

Pelas palavras de conforto e apoio e, sobretudo, pelas orações voltadas à minha pessoa em meus momentos de angústia, cansaço e aflição nessa etapa do doutorado. Obrigada!!

Às colegas e amigas Prof^a. Dr^a. Luciana Ferraz Gominho, e Prof^a. Dr^a. Tássia Cristina de Almeida Pinto Sarmiento (UFCG/Campus Patos)

Por me incentivarem e não medirem esforços para que eu pudesse conciliar minhas atividades docentes em Patos com minhas atividades discentes em Campina Grande, muitas vezes ficando responsáveis por minhas atribuições na Clínica.

Aos meus colegas de profissão do Curso de Bacharelado em Odontologia (UFCG)

Pelo apoio e incentivo ao longo desses anos, em especial: Abrahão Alves de Oliveira Filho, Ana Carolina Lyra de Albuquerque, João Nilton Lopes de Sousa, Julierme Ferreira Rocha e Maria Angélica Satyro Gomes.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e ao corpo docente do Curso de Engenharia de Materiais

Em especial aos professores Crislene Rodrigues S. Moraes, Gelmires de Araújo Neves, Heber Carlos Ferreira, Laura Hecker de Carvalho, Marcus Vinícius Lia Fook, Romualdo Rodrigues de Menezes, Tomas Jeferson Alves de Melo e Walman Benício de Castro.

Aos amigos

Com quem partilhamos conhecimentos durante as disciplinas e etapas laboratoriais, dentre estes: Dayanna Kelly Marques de Oliveira, Elieber Barros Bezerra, Eunice Paloma Nascimento Lima, Imarally Vitor de Souza Ribeiro Nascimento, Isabel Portela Rabello, Ítalo Macedo Freire Pinheiro, Rafaella Lima Meneses, Rita de Cássia Alves Leal Cruz, Ruth Barreto, Tiago Tibério e Waldênia Freire.

Aos integrantes e pesquisadores do CERTBIO

Destacando-se Daniel Bezerra de Lima, Francisca Pereira da Silva (Paulinha), Francisco Antônio Santos Fonseca (Toninho), Josilene Rodrigues da Silva (Josi), Lívia Neves Marques, Márcio José Batista Cardoso, Maria Dailma de Assis Sousa, Pedro Queiroz Guimarães, Rosa Maria Cruz Medeiros (Rosita), Sérgio Pereira Neto, Silvia Maria Pinto Borges, Suyana Gonçalves Vieira, Tânia Cristina de Moraes Lia Fook, Valdenise Marques Rodrigues (Dona Val), Willams Teles Barbosa e Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa, por toda colaboração ao longo do trabalho.

Aos operadores dos equipamentos do CERTBIO (UFCEG) e do IpeFarM (UFPB)

Por viabilizarem a realização dos diversos ensaios.

Aos professores e pesquisadores

Prof. Dr. Bartolomeu Jorge da Silva, Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, Prof. Dr. Raúl Garcia Carrodegua, Prof^ª. Dr^ª. Renata de Souza Coelho Soares, Prof^ª. Dr^ª. Renate Maria Ramos Wellen e Dr. Thiago Bizerra Fidéles, por todas as considerações e contribuições dadas ao longo do desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!!

Ao Agrônomo da UFPB Prof. Fernando Antônio Cavalcanti Viana

Por ter sido tão solícito e disponível, abrindo as portas do IpeFarM (UFPB) para que eu pudesse realizar a coleta de *Cissus verticillata* (L.).

Ao técnico de laboratório da UFPB Sr. Raimundo Nonato da Silva Filho

Por ter feito o extrato e o screening fitoquímico de *Cissus verticillata* (L.) com tanta presteza e disponibilidade.

A Elisana Afonso de Moura Pires e aos alunos do PIBIC do curso de bacharelado em farmácia da UFPB: **Jociano da Silva Lins** e **Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva**, que me auxiliaram nos ensaios preliminares de CLAE (UFPB), o meu muito obrigada!

Aos funcionários da UAEMA

José André da Costa e, de maneira especial, Lúcia Márcia Donato Quirino pelo atendimento cordial sempre que foi necessário.

A todos os motoristas que me guiaram pelo caminho, conduzindo-me com segurança aos meus destinos meu muito obrigada! De maneira muito particular a **Bruno Souto Montenegro** que se tornou mais que um motorista, um amigo que se colocou à disposição em todos os dias e horas que precisei. Que Deus continue lhe protegendo em suas viagens!

“Deixe nas mãos do Senhor tudo o quanto você faz, e todos os seus planos serão bem sucedidos.”

Provérbios 16. 3

RESUMO

ROSENDO, ROSANA ARAÚJO. Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* de Quitosana/*Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. (Tese). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. CCT/UFCG, 2016.

Os sistemas de liberação controlada de fármaco apresentam inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional e, dentre os polissacarídeos mais empregados no desenvolvimento desses sistemas destaca-se a quitosana que, por ser biocompatível e biodegradável, tem despertado o interesse na comunidade científica para sua utilização no desenvolvimento de estruturas onde possam ser incorporados fármacos. A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é conhecida popularmente como insulina e, diversos estudos farmacológicos têm indicado a sua ação hipoglicemiante, justificando-se assim sua aplicabilidade na terapia de pacientes com diabetes. Sendo assim, este trabalho objetivou desenvolver e caracterizar *scaffolds* de quitosana com diferentes concentrações de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, a fim de avaliar sua possível utilização em pacientes portadores de diabetes melito tipo 2. O método consistiu na solubilização da quitosana em ácido acético, adição da droga vegetal, e obtenção dos *scaffolds* através da técnica de *freeze drying*. As amostras foram caracterizadas através das técnicas de Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Microscopia Ótica (MO), Teste de Molhabilidade, Teste de Compressão, Análise Termogravimétrica (TG) e de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Grau de Intumescimento com PBS e saliva artificial e Ensaio de Biodegradação Enzimática. O estudo químico realizado através do FTIR identificou todas as bandas características dos materiais estudados e o estudo morfológico revelou, nos *scaffolds*, a formação de uma estrutura tridimensional com poros interconectados. A técnica de EDS indicou a presença dos elementos químicos Carbono, Oxigênio e Nitrogênio, além de Magnésio, Silício e Cálcio presentes na droga vegetal. O grau de intumescimento demonstrou que as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas na forma intumescida do que na condição seca, sendo esse intumescimento maior quando as amostras foram imersas na saliva artificial, quando comparado com a solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS). O teste de molhabilidade demonstrou que os *scaffolds* tiveram sua hidrofiliabilidade aumentada com a incorporação da droga vegetal e, o teste de compressão, confirmou uma maior resistência à deformação dos mesmos. As análises de TG/DTG demonstraram que a droga vegetal diminuiu a estabilidade térmica dos *scaffolds*. A partir do ensaio de biodegradação, constatou-se que os *scaffolds* sofreram uma maior degradação em contato com a solução de PBS do que em PBS/Lisozima; e que, nos períodos de avaliação, a saliva artificial não promoveu biodegradação às estruturas. A incorporação da droga vegetal aos *scaffolds* foi confirmada por meio dos resultados obtidos nos ensaios de FTIR, DRX, MEV, MO, Grau de intumescimento, testes de molhabilidade e de compressão, TG/DTG e DSC. Desta forma, pode-se concluir que houve a formação de *scaffolds* com propriedades morfológicas e físico-químicas favoráveis para a obtenção de um sistema para liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: Biomateriais. Quitosana. Fitoterapia. Diabetes Melito.

ABSTRACT

ROSENDO, ROSANA ARAÚJO. Development and characterization of chitosan *scaffolds/Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. (**Thesis**). Postgraduation Program in Materials Science and Engineering. CCT/UFCG, 2016.

The systems of controlled clearance of pharmaco present several advantages when compared to others of conventional dosages and, among the most used polysaccharides in the development of these systems can be highlighted the chitosan which, due to being biocompatible and biodegradable, has aroused the interest of the scientific community for its use in the development of structures where pharmaco may be incorporated. The plant species *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis is popularly known as insulin and, several pharmacological studies have indicated its hypoglycemic action, thereby justifying its applicability in the care of patients with diabetes. Thus, this work aimed to develop and characterize chitosan *scaffolds* with different concentrations of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, in order to access its possible use in patients with type 2 diabetes mellitus. The method consisted in the solubilization of the chitosan in acetic acid, addition of the vegetal drug, and obtaining of the *scaffolds* by means of the *freeze drying* technique. The samples were characterized by the analysis of Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), X-ray Diffractometry (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS), Optical Microscopy (OM), Wettability Test, Compression Test, Thermogravimetric Analysis (TGA) and the Differential Scanning Calorimetry (DSC), Degree of swelling with PBS and artificial saliva and Enzymatic Biodegradation Test. The chemical study was carried out by the FTIR identified all the bands characteristic of the studied materials and the morphological study revealed, in the *scaffolds*, the formation of a tridimensional structure with interconnected pores. The EDS technique revealed the presence of the chemical elements Carbon, Oxygen and Nitrogen, in addition to Magnesium, Silicon and Calcium present in the vegetable drug. The degree of swelling demonstrated that the averages of the masses were correspondingly higher in the swollen form than in the dry condition, being this swelling greater when the samples were immersed in artificial saliva, when compared to the PBS solution. The wettability test demonstrated that the *scaffolds* had their hydrophilicity increased with the incorporation of the vegetal drug and, the compression test, confirmed their greater resistance to deformation. The TG/DTG analysis demonstrated that the vegetal drug reduced the thermal stability of the *scaffolds*. From the biodegradation test, was found that the *scaffolds* suffered a greater degradation in contact with the PBS solution than in PBS/Lysozyme; and that, in the assessment periods, the artificial saliva did not promote biodegradation to the structures. The incorporation of the vegetal drug to the *scaffolds* was confirmed by means of the results obtained in the de FTIR, DRX, MEV, OM, Degree of swelling, wettability and compression tests, TG/DTG and DSC tests. Therefore, it can be concluded that there was the formation of scaffolds with favorable morphological and physicochemical properties for obtaining a system of controlled clearance of pharmaco.

Keywords: Biomaterials. Chitosan. Phytotherapy. Diabetes Mellitus.

PUBLICAÇÕES

Trabalho publicado em Anais de Congresso

- Apresentação do trabalho intitulado “**Sistema de liberação controlada: desenvolvimento e caracterização de estruturas de quitosana/ *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis**”, no Congresso Internacional 4º OBI – 4ª Edição de Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, realizado de 19 a 22 de Agosto de 2015, em Campina Grande-PB.

Artigo

- Artigo intitulado “***Scaffolds* de Quitosana / *Cissus verticillata* (L.) para aplicação odontológica em diabéticos**”, submetido à Revista de Odontologia da UNESP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de alguns compostos presentes nas partes aéreas de <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Beltrame <i>et al.</i> , 2002; Barbosa <i>et al.</i> , 2002).....	45
Figura 2 – Estrutura química da quitina (a) e da celulose (b) (Santos, 2004).....	49
Figura 3 – Estrutura química da quitosana (Santos, 2004).....	50
Figura 4 – Fluxograma das etapas de coleta, identificação da planta e obtenção do EAB (Autor, 2016).....	58
Figura 5 – Apresentação das folhas e frutos de <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).....	59
Figura 6 – Prensa utilizada (a) e imagem da espécie vegetal antes do processo de secagem na estufa artesanal (b) (Autor, 2016).....	59
Figura 7 – Rendimento médio de 17% das folhas da planta <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).....	60
Figura 8 – Pó das folhas de <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis com álcool a 95%, em interpolador de aço inox (Autor, 2016).....	60
Figura 9 – Rota evaporador rotatório R-210 BUCHI (Autor, 2016).....	61
Figura 10 – Extrato alcoólico bruto de <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).....	61
Figura 11 – Fluxograma da produção dos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal (Autor, 2016).....	63
Figura 12 – Solução de quitosana com ácido acético glacial sob agitação mecânica (Autor, 2016).....	64
Figura 13 – Solução de quitosana em placas de Petri, acondicionadas em estufa a 37°C (Autor, 2016).....	65
Figura 14 – Liofilizador L 108 fabricado pela LIOTOP (Autor, 2016).....	66
Figura 15 – Processo de neutralização dos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, na solução de hidróxido de amônio (Autor, 2016).....	67
Figura 16 – Espessura (a) e diâmetro (b) das amostras verificados com o auxílio de paquímetro digital DIGIMESS 100-174BL (Autor, 2016).....	68
Figura 17 – Processo de neutralização dos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, na solução de hidróxido de sódio	

(Autor, 2016).....	68
Figura 18 – Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície (Autor, 2016).....	73
Figura 19 – Goniômetro, CERTBIO / UFCG (Autor, 2016).....	74
Figura 20 – Análise de molhabilidade dos <i>scaffolds</i> de quitosana: amostra no suporte (a), gotejamento da água destilada (b), obtenção da fotografia da gota (c) (Autor, 2016).....	74
Figura 21 – Medição das amostras (a), Equipamento INSTRON 3366 (b), Teste de compressão (c) (Autor, 2016).....	75
Figura 22 – Aspecto macroscópico do FQ (a), FQ20 (b) (Autor, 2016).....	81
Figura 23 – Aspecto macroscópico do SQ - superfície em contato com o ar (a), em contato com a placa (b) e de corte transversal (c) (Autor, 2016).....	82
Figura 24 – Aspecto macroscópico do SQ20 - superfície em contato com o ar (a), em contato com a placa (b) e de corte transversal (c) (Autor, 2016).....	82
Figura 25 – Aspecto das soluções de hidróxido de amônio após o processo de neutralização (Autor, 2016).....	83
Figura 26 – Aspectos macroscópicos dos SQ20 antes (a) e após (b) o processo de neutralização com NH_4OH (Autor, 2016).....	84
Figura 27 – Médias da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).....	85
Figura 28 – Médias da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos <i>scaffolds</i> (Autor, 2016).....	86
Figura 29 – Médias do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).....	87
Figura 30 – Médias do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos <i>scaffolds</i> (Autor, 2016).....	87
Figura 31 – Médias da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).....	88
Figura 32 – Médias da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos <i>scaffolds</i> (Autor, 2016).....	89
Figura 33 – Amostras de filmes de quitosana/droga vegetal em contato com o TPP na concentração de 0,5% e 1% (a) e nas concentrações de 0,25% por 15 e 30 minutos (b). Após processo de reticulação, evidencia-se o aspecto das	

amostras com 1% (c), 0,5% (d) e 0,25% (e) (Autor, 2016).....	90
Figura 34 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da quitosana (Autor, 2016).....	92
Figura 35 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da droga vegetal (a) e do EAB (b) (Autor, 2016).....	93
Figura 36 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do FQ (a) e FQ20 (b), neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).....	94
Figura 37 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do SQ20, neutralizado com NH_4OH (Autor, 2016).....	95
Figura 38 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do FQ (a) e FQ20 (b), neutralizados com NaOH (Autor, 2016).....	96
Figura 39 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do SQ20, neutralizado com NaOH (Autor, 2016).....	96
Figura 40 – Difrátogramas do pó da quitosana e dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).....	97
Figura 41 – Difrátogramas do Pó da Quitosana e dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH (Autor, 2016).....	98
Figura 42 – Difrátogramas dos SQ (a) e SQ20 (b), neutralizados com NaOH (Autor, 2016).....	99
Figura 43 – Micrografia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana neutralizados com NaOH (a) e com NH_4OH (b). Aumento 500x (Autor, 2016)...	100
Figura 44 – Micrografia eletrônica de varredura do FQ5 (a), FQ10 (b), FQ15 (c) e FQ20 (d), neutralizados com NaOH . Aumento 500x (Autor, 2016).....	101
Figura 45 – Micrografia eletrônica de varredura do FQ5 (a), FQ10 (b), FQ15 (c) e FQ20 (d), neutralizados com NH_4OH . Aumento 1000x (Autor, 2016).....	102
Figura 46 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com NH_4OH , superfície em contato com o ar. SQ (a), SQ5 (b) SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).....	103
Figura 47 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com NH_4OH , superfície em contato com a placa. SQ (a), SQ5 (b) SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).....	104
Figura 48 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com	

NH ₄ OH, superfície da seção transversal. SQ (a), SQ5 (b) SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).....	105
Figura 49 – Aspecto macroscópico das amostras no porta amostra do MEV (Autor, 2016).....	106
Figura 50 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ5 neutralizado com NH ₄ OH. Superfície de corte em contato com o ar (a), e superfície de corte em contato com a placa (b). Aumento 150x (Autor, 2016).....	106
Figura 51 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ20 neutralizado com NH ₄ OH. Superfície de corte em contato com o ar (a), e superfície de corte em contato com a placa (b). Aumento 150x (Autor, 2016).....	107
Figura 52 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ5 neutralizado com NH ₄ OH. Ponto 1 (em vermelho) e ponto 2 evidenciados nas superfícies em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 1000x (Autor, 2016).....	107
Figura 53 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ20 neutralizado com NH ₄ OH. Ponto 1 (em vermelho) e ponto 2 evidenciados nas superfícies em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 1000x (Autor, 2016).....	109
Figura 54 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos filmes neutralizados com NH ₄ OH (Autor, 2016).....	110
Figura 55 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos <i>scaffolds</i> neutralizados com NH ₄ OH (Autor, 2016).....	111
Figura 56 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos filmes neutralizados com NaOH (Autor, 2016).....	112
Figura 57 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos <i>scaffolds</i> neutralizados com NaOH (Autor, 2016).....	113
Figura 58 – Médias da massa segundo a concentração, solução, concentração e a forma na concentração nos filmes (Autor, 2016).....	115
Figura 59 – Médias da massa segundo a concentração, solução, concentração e a forma na concentração nos <i>scaffolds</i> (Autor, 2016).....	116
Figura 60 – Micrografia ótica do SQ (superfície de corte transversal). Aumento 40x (Autor, 2016).....	117
Figura 61 – Micrografia ótica do SQ. Superfície em contato com o ar (a), e	

superfície em contato com a placa (b). Aumento 80x (Autor, 2016).....	118
Figura 62 – Micrografia ótica dos SQ5 e SQ20. Superfície em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 40x (Autor, 2016).....	119
Figura 63 – Análise do ângulo de contato das superfícies das amostras (Autor, 2016).....	119
Figura 64 – Curvas tensão-deformação dos <i>scaffolds</i> de quitosana, sem e com a incorporação da droga vegetal em diferentes concentrações (Autor, 2016).....	121
Figura 65 – Curvas TG (a) e DTG (b) dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20 obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min e sob atmosfera de nitrogênio (20mL/min) (Autor, 2016).....	123
Figura 66 – Médias da massa segundo a concentração e a forma, na solução de PBS (Autor, 2016).....	126
Figura 67 – Médias da massa segundo a concentração e a forma, na solução de saliva artificial (Autor, 2016).....	126
Figura 68 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de PBS (Autor, 2016).....	129
Figura 69 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de PBS/Lisozima (Autor, 2016).....	130
Figura 70 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de saliva artificial (Autor, 2016).....	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais plantas utilizadas para o Diabetes Melito no Brasil e em João Pessoa – PB.....	43
Quadro 2 - Classificação da espécie <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico do Diabetes	37
Tabela 2 - Nomenclatura dos filmes confeccionados	65
Tabela 3 - Nomenclaturas dos <i>scaffolds</i> confeccionados	66
Tabela 4 - Grupos de amostras para degradação enzimática <i>in vitro</i>	77
Tabela 5 - Principais valores de absorvância detectados nos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana e quitosana/insulina	91
Tabela 6 - Percentual atômico dos filmes de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio e com hidróxido de amônio, de acordo com os resultados do EDS	100
Tabela 7 - Percentual atômico dos filmes de quitosana – FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH, de acordo com os resultados do EDS	101
Tabela 8 - Percentual atômico do SQ5 neutralizado com NH ₄ OH	108
Tabela 9 - Percentual atômico do SQ20, neutralizado com NH ₄ OH	109
Tabela 10 - Propriedades mecânicas de compressão	122
Tabela 11 - Decomposições térmicas dos <i>scaffolds</i>	124
Tabela 12 - Dados dos eventos calorimétricos dos <i>scaffolds</i>	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AB	Aglutinogênio A e B
DSC	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial
TG	Análise Termogravimétrica
DTG	Derivada primeira da curva termogravimétrica
D	Dextrógeno
DM	Diabetes Melito
DRX	Difração de Raios X
et al.	E outros
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FTIR	Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier
EA	Extrato alcoólico
EAB	Extrato alcoólico bruto
FID	Federação Internacional de Diabetes
FN	Fibronectina
FAF	Fração aquosa das folhas
NHCOCH ₃	Grupo acetamido
NH ₂	Grupo amino
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Ótica
NSTF	Novos Sistemas Transportadores de Fármacos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paraíba
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PHB	Poliéster microbiano poli (3-hidroxibutirato)
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PODV	Pó da Droga Vegetal
POQ	Pó de Quitosana
SUS	Sistema Único de Saúde
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TTOG	Teste de Tolerância Oral à Glicose
TPP	Tripolifosfato de Sódio
UV/VIS	Ultravioleta e Visível
U.I	Unidade internacional
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

B	Beta
C	Carbono
Ca	Cálcio
cm	Centímetro
US\$	Dólar dos Estados Unidos
dL	Decilitro
G	Gramma
°C	Grau Celsius
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
H	Hora
K α	Linha k-alfa
M	Massa Molar
Mg	Magnésio
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual a
®	Marca registrada
<	Menor que
Mpa	Mega Pascal
μL	Microlitro
μmols	Micromol
mA	Miliampère
Mg	Miligrama
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
Min	Minuto
Mol/L	Mol por litro
m/v	Massa por volume
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
%	Porcentagem
Qs	Quantidade suficiente

Qsp	Quantidade suficiente para
Kg	Quilograma
KN	Quilonewton
Kv	Quilovolt
$C_{12}H_{24}N_2O_9$	Quitosana
R	Raio
R\$	Real
p/p	Relação entre soluto e solvente de uma solução dada em percentual
rpm	Rotação por minuto
Si	Silício
θ	Teta
Bar	Unidade de pressão
ΔH	Variação de entalpia
X	Vezes
V	Volume
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1	Diabetes Melito	33
2.1.1	Conceito e epidemiologia.....	33
2.1.2	Classificação e etiologia	33
2.1.3	Manifestações sistêmicas e bucais.....	34
2.1.3.1	Saliva.....	35
2.1.4	Diagnóstico	37
2.1.5	Complicações e tratamento	38
2.1.6	Custos globais com o diabetes	39
2.2	Fitoterapia	40
2.2.1	Plantas utilizadas no tratamento do diabetes melito	42
2.2.2	<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis	44
2.3	Sistemas de liberação controlada de fármaco	47
2.4	Biomateriais como carreadores.....	49
2.4.1	Quitina	49
2.4.2	Quitosana	50
2.4.2.1	Propriedades biológicas da quitosana.....	52
2.4.2.2	Emprego da quitosana em sistemas de liberação controlada de fármacos.....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	Materiais.....	57
3.2	Metodologia.....	57
3.2.1	Tipo e local da pesquisa	57
3.3	Material vegetal.....	57
3.3.1	Coleta e identificação da planta	58
3.3.2	Obtenção do extrato vegetal.....	60
3.3.3	Screening fitoquímico	62
3.4	Fase Exploratória	62

3.4.1	Metodologia da preparação dos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal.....	63
3.4.1.1	Técnica de preparação dos filmes.....	63
3.4.1.2	Técnica de preparação dos <i>scaffolds</i>	65
3.4.2	Processo de neutralização.....	67
3.4.3	Processo de reticulação.....	69
3.5	Caracterização.....	69
3.5.1	Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	70
3.5.2	Difração de Raios X (DRX)	71
3.5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
3.5.4	Grau de Intumescimento.....	71
3.5.5	Microscopia Ótica (MO)	73
3.5.6	Teste de Molhabilidade.....	73
3.5.7	Teste de Compressão.....	75
3.5.8	Análise Térmica.....	76
3.5.8.1	Análise Termogravimétrica (TG)	76
3.5.8.2	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	76
3.5.9	Ensaio de Biodegradação Enzimática	77
3.6	Análise estatística	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1	Resultados da Fase Exploratória	81
4.1.1	Aspecto macroscópico dos filmes e <i>scaffolds</i> de quitosana sem e com a droga vegetal incorporada	81
4.1.2	Neutralização das amostras com Hidróxido de Amônio.....	83
4.1.3	Reticulação com TPP	89
4.1.4	Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	90
4.1.5	Difração de Raios X (DRX)	97
4.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	99
4.1.7	Grau de Intumescimento com PBS.....	110

4.2	Resultados da Fase Investigativa	117
4.2.1	Microscopia Ótica (MO)	117
4.2.2	Teste de Molhabilidade	119
4.2.3	Teste de Compressão.....	121
4.2.4	Análise Termogravimétrica (TG)	122
4.2.5	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	124
4.2.6	Grau de Intumescimento com PBS e Saliva Artificial.....	125
4.2.7	Ensaio de Biodegradação Enzimática	128
5	CONCLUSÕES	137
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	140
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
	APÊNDICE A – Análise de Massa: Estatísticas da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e <i>scaffolds</i>	158
	APÊNDICE B – Análise de volume: Estatísticas do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e <i>scaffolds</i>	159
	APÊNDICE C – Análise de densidade: Estatísticas da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e <i>scaffolds</i>	160
	APÊNDICE D – Espectros de infravermelho dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NH ₄ OH.....	161
	APÊNDICE E – Espectros de infravermelho dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, neutralizados com NH ₄ OH.	162
	APÊNDICE F – Espectros de infravermelho dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH.	163
	APÊNDICE G – Espectros de infravermelho dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, neutralizados com NaOH.	164
	APÊNDICE H – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa por tipo, concentração e a forma na concentração, segundo a neutralização com NH ₄ OH..	165
	APÊNDICE I – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa por tipo, concentração e a forma na concentração, segundo a neutralização com NaOH....	166
	APÊNDICE J – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa seca, intumescida e diferença entre as soluções utilizadas no processo de neutralização e concentração da droga vegetal.	167
	APÊNDICE K – Análise de intumescimento em PBS e saliva artificial: Estatísticas da massa por tipo de solução, concentração e a forma da massa.....	169

APÊNDICE L – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi empregada a solução de PBS.....	170
APÊNDICE M – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação, medida da massa quando foi empregada a solução de PBS/Lisozima.....	171
APÊNDICE N – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi empregada a solução de saliva artificial.....	172
APÊNDICE O – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 7 dias.....	173
APÊNDICE P – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 14 dias.....	174
APÊNDICE Q – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 21 dias.....	175
APÊNDICE R – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de PBS. ...	176
APÊNDICE S – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de PBS/Lisozima.....	177
APÊNDICE T – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de saliva artificial.....	178
ANEXO A – Identificação Botânica da Planta	180
ANEXO B – Screening Fitoquímico.....	181

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Historicamente, mesmo sem conhecimento científico, o homem fez uso da natureza como fonte de materiais para resolver demandas e problemas associados ao seu estilo de vida. Com o decorrer do tempo, a partir do desenvolvimento de processos e dos biomateriais, foi então possível estabelecer relações entre as propriedades dos materiais e a aplicação dos mesmos em meio biológico.

Dentre os biomateriais encontra-se a quitosana que é um polímero natural, renovável, de grande importância ambiental e econômica, apresentando como uma de suas características o baixo custo quando obtido da quitina (Kumar *et al.*, 2004).

Devido às suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão entre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas. Modificando as propriedades do polímero, um sistema de matriz pode ser elaborado para uma liberação controlada do fármaco. Materiais poliméricos farmacêuticos com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser utilizados como matrizes, nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido (Rios, 2005). Assim sendo, a quitosana pode ser empregada como meio de liberação de medicamentos no sistema gastrointestinal, na mucosa bucal, canais radiculares, dentinas cariadas ou bolsas periodontais (Ravi Kumar, 2000; Takeuchi *et al.*, 2003).

A terapia através da liberação controlada de fármacos se constitui em uma opção terapêutica para diversos tipos de enfermidades, como o diabetes melito; sobretudo por que a maioria dos tratamentos à base de insulina envolvem a múltipla administração de injeções subcutâneas diárias, promovendo um desconforto no paciente portador de diabetes, especialmente quando se trata de crianças (Khafagy *et al.*, 2007).

A partir de uma perspectiva histórica, as plantas sempre foram usadas como fontes de medicamentos para a doença. A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, pertencente à família Vitaceae é conhecida popularmente como anil trepador, cipó-jucá, cortina japonesa, uva brava e insulina. As folhas são empregadas externamente contra o reumatismo e na cura de abscessos, e o infuso das folhas e do caule utilizadas por via oral, na inflamação muscular, epilepsia, derrame cerebral, hipertensão e ativadora da circulação sanguínea. Esta espécie vem sendo muito empregada pela população para o tratamento de diabetes, sendo

por isso conhecida como “insulina” e motivo para estudos botânicos, químicos e farmacológicos no Brasil e no exterior (Beltrame *et al.*, 2001; Pepato *et al.*, 2003).

O estímulo ao uso dos fitoterápicos tem como objetivo prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química que são, em geral, mais caros devido às patentes tecnológicas envolvidas (Toledo *et al.*, 2003).

Dessa forma, busca-se encontrar uma alternativa de administração da insulina de forma menos traumática, contribuindo para minimizar ou mesmo eliminar o incômodo sofrido por inúmeros indivíduos portadores de diabetes que já se encontram naturalmente sensibilizados em virtude das limitações impostas pela doença. Além das condições clínicas, outro relevante aspecto nesta pesquisa é a possibilidade de obtenção de um novo biomaterial com tecnologia e materiais nacionais.

Mediante a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, prevendo o tratamento com plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde – SUS, conforme disposto na Portaria 971 de 3 de Maio de 2006 do Ministério da Saúde; e da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813, de 22 de Junho de 2006, este trabalho propôs desenvolver e caracterizar *scaffolds* de quitosana com diferentes concentrações de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, a fim de avaliar sua possível utilização em pacientes portadores de diabetes melito tipo 2.

Neste sentido, esta proposta de trabalho encontra efetivo e importante reconhecimento social junto às agências de fomento, regulação e fiscalização do país.

REVISÃO DA LITERATURA



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Melito

2.1.1 Conceito e epidemiologia

O diabetes melito (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina suficiente ou quando esta não é utilizada devidamente pelo organismo. A insulina é o hormônio que regula a glicemia, ou seja, a concentração de glicose na corrente sanguínea. Desta forma, se esse hormônio não é produzido ou não é utilizado devidamente, registra-se um aumento da glicose sanguínea designada por hiperglicemia (Moore *et al.*, 2004; Rang *et al.*, 2008).

Estima-se que o DM alcançará o montante de 366 milhões de pessoas em todo o mundo e, de acordo com as estimativas realizadas, este número chegará aos 552 milhões de diabéticos em 2030, devido ao envelhecimento da população, uma maior prevalência da obesidade, mudança de hábitos alimentares com dieta hipercalórica e rica em açúcares, sedentarismo, entre outras (Whiting *et al.*, 2011).

O Brasil está em 4º lugar no ranking mundial de ocorrência da doença, atrás apenas dos Estados Unidos, China e Índia. A Federação Internacional de Diabetes (FID), estima que o número de pessoas com diabetes no Brasil pode alcançar 19,2 milhões de pessoas em 2035 (FID, 2016). Estudos revelam que a prevalência de diabetes aumentou com o avanço da idade, atingindo aproximadamente 20% da população das faixas etárias de 65 a 74 anos e de 75 anos ou mais, um contingente superior a 3,5 milhões de pessoas (Iser *et al.*, 2015).

2.1.2 Classificação e etiologia

A classificação do diabetes melito inclui quatro classes clínicas: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, outros tipos específicos de diabetes e diabetes gestacional. A classificação é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto, os termos diabetes melito insulino-dependente e não insulino-dependente, amplamente utilizados no passado, devem ser eliminados, usando-se em substituição, a terminologia diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2, respectivamente (Borg e Sherwin, 2000; Chacra e Moises, 2001; Ada, 2003a; Who, 2012).

O diabetes tipo 1 representa 10% dos diabéticos (Hossain, Katar e El Nahas, 2007). Embora menos comum, esse tipo de diabetes é o mais agressivo. A etiologia do diabetes tipo 1 está diretamente relacionada à destruição das células beta do pâncreas. Por uma falha nas defesas do organismo, as células do sistema imunológico destroem as células produtoras de insulina, as ilhotas de Langerhans, encontradas no pâncreas, de forma que a falta das injeções diárias do hormônio artificial podem levar à morte (Imagawa *et al.*, 2000; Neiva, 2005).

O diabetes tipo 2 é o tipo adulto, isto é, o início geralmente ocorre após os 45 anos, representando 80% dos casos; embora já se tenha descrito que o diabetes tipo 2 está se manifestando mais precocemente, até mesmo na adolescência (Ada, 2000). A etiologia do tipo 2 de diabetes não está claramente estabelecida, mas a destruição auto-imune do pâncreas não está envolvida. A obesidade, sobretudo aquela cuja distribuição da gordura é predominantemente abdominal, é o fator de risco mais relevante para o desenvolvimento dessa forma de DM. A hereditariedade, o tabagismo, a idade acima de 40 anos, a síndrome dos ovários policísticos, por vezes o stress, e prévio diabetes gestacional também estão associados ao maior risco de desenvolvimento da doença (Davidson, 2001; Erberly *et al.*, 2003).

A categoria outros tipos de diabetes melito contém várias formas de DM decorrentes de defeitos genéticos associados com outras doenças ou com o uso de fármacos diabetogênicos (Oliveira e Milech, 2004).

O diabetes gestacional é a intolerância à glicose, em variados graus de intensidade, diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, podendo não persistir após o parto (Teixeira e Machado, 2001). Pacientes com diabetes que engravidam não são classificadas como pertencentes a esse grupo. O diabetes gestacional ocorre em 2% a 4% das gestações e é associado com aumento de morbidade e mortalidade perinatal (Chacra e Moises, 2001).

2.1.3 Manifestações sistêmicas e bucais

Os sinais e sintomas do DM incluem fome e sede, perda de peso, infecções urinárias frequentes, grandes volumes urinários, cetoacidose, náuseas, vômitos, aterosclerose de grandes e pequenos vasos sangüíneos, insuficiência renal, diminuição brusca da acuidade visual, neuropatia generalizada, impotência sexual e úlceras em membros inferiores (Lomba e Lomba, 2005).

Várias alterações bucais têm sido observadas em pacientes diabéticos. Nos diabéticos não-controlados, as manifestações bucais são graves e são as seguintes: xerostomia e redução do fluxo salivar, acentuada destruição do osso de suporte dos dentes, mobilidade e perda dos dentes, ardência e dor na mucosa bucal, atrofia das papilas linguais, aumento da incidência de lesões de cáries, alterações na microbiota da cavidade bucal com predomínio de *Cândida albicans*, estreptococos hemolíticos e estafilococos, hálito cetônico associado à degradação de gordura para a produção de energia e pulpíte, podendo o dente afetado estar livre de cárie (Carvalho *et al.*, 2003; Lindhe, Karring e Lang, 2005; Carranza *et al.*, 2007).

A xerostomia (sensação subjetiva de boca seca que, geralmente, mas não necessariamente, está associada com a diminuição da quantidade de saliva) é relatada por 10 a 30% dos diabéticos (Neville *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2004; Tófoli *et al.*, 2005).

Nos pacientes com xerostomia, o tratamento pode consistir no uso de estimulantes da saliva, mas quando as glândulas salivares não produzem saliva, mesmo estimuladas, o melhor tratamento é o uso/recurso de salivas artificiais (Chambers *et al.*, 2007; Bartels, 2009).

Diversas salivas artificiais têm sido desenvolvidas com várias formulações que são comercializadas (Feio e Sapeta, 2005; Momm *et al.*, 2005), entretanto, ainda são escassos os estudos envolvendo saliva artificial. Em seus estudos, Roger *et al.* (2011) cultivaram *Streptococcus salivarius* K12 em saliva artificial sob condições de pH e temperatura bucal, demonstrando que esses microrganismos foram capazes de crescer rapidamente em saliva artificial.

2.1.3.1 Saliva

A saliva é uma secreção exócrina mucoserosa, levemente ácida, composta por 99% de água e uma grande variedade de substâncias orgânicas (proteínas, lipídeos e carboidratos) e inorgânicas (eletrólitos como o sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos). Estão presentes ainda, imunoglobulinas, mucinas, produtos nitrogenados como uréia e amônia e enzimas (Sonesson, Eliasson e Matsson, 2003; Preetha e Banerjee, 2005; Chambers *et al.*, 2007; Bongaerts, Rosseti e Stokes, 2007).

Estes componentes reagem tendo sua função relacionada nas seguintes áreas: (1) bicarbonatos, fosfatos e uréia modulam o pH e a capacidade tampão da saliva; (2) macromoléculas de proteínas e mucinas servem para limpar, agregar, e/ou unir os microrganismos orais e contribuir para o metabolismo da placa dental; (3) cálcio, fosfato e proteínas trabalham juntos como um fator de antisolubilidade e modulam a desmineralização e remineralização dos tecidos dentais; e (4) as imunoglobulinas, proteínas e enzimas como a lisozima, a lactoperoxidase e a amilase favorecem a ação bactericida (Humphrey e Williamson, 2001; Almeida *et al.*, 2008).

O pH da saliva oscila entre os 6,5 e 7,4 (aproximadamente neutro) e possui sistemas tampão (bicarbonato, fosfatos e algumas proteínas), que contribuem para a manutenção do pH fisiológico (Feio e Sapeta, 2005; Cruz *et al.*, 2013).

Várias funções são atribuídas à saliva, dentre elas: função digestiva, lubrificante, solvente para substâncias com propriedade de sabor, defesa contra microrganismos virulentos que invadem a cavidade bucal, limpeza bucal (diluindo substâncias introduzidas na cavidade bucal), além de proteção da cavidade bucal contra danos causados por alterações do pH devido à sua capacidade tampão (Thylstrup e Fejerskov, 2001).

O fluxo salivar adequado é reconhecidamente um componente essencial para a mastigação normal, paladar e deglutição. A saliva é fundamental para a lubrificação e proteção da mucosa bucal, neutralização de ácidos nocivos que podem provocar o desenvolvimento de lesões cáries e destruição de microrganismos. A diminuição do fluxo salivar pode aumentar a suscetibilidade às úlceras bucais, infecções bacterianas, virais, fúngicas e lesão de cárie dentária (Silverman, Eversole e Truelove, 2004).

Diariamente, um indivíduo produz, em média, cerca de 0,5 a 1,0 litro de saliva (Porter, Scully e Hegarty, 2004; Fejerskov e Kidd, 2007). As menores taxas de fluxo salivar são encontradas no início da manhã quando comparadas àquelas do final da tarde. Estudos mostram que esse aumento se dá nas primeiras horas do dia, em torno de 25 a 50% ou cerca de 0,1 mL/minuto (Flink, Tegelberg e Lagerlof, 2005).

A saliva desempenha um papel vital na absorção e dissolução de fármacos por via oral. Contudo, as propriedades reológicas e químicas desse fluido podem afetar fortemente a aderência das formulações bioadesivas (Madsen *et al.*, 2013).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico correto e precoce do diabetes melito e das alterações da tolerância à glicose é extremamente importante porque permite que sejam adotadas medidas terapêuticas que podem evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída e retardar o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diagnosticados com diabetes (Gross *et al.*, 2002).

Uma anamnese bem conduzida, além de exames laboratoriais complementares, podem levar ao diagnóstico do diabetes melito (Ress e Hallmon, 2001).

Em indivíduos normais, a concentração plasmática de glicose situa-se entre 70 e 99 mg/dL. Níveis superiores indicam graus variados de tolerância à glicose (pré-diabetes) ou diabetes (Tabela 1), cujos critérios diagnósticos foram atualizados pela American Diabetes Association (ADA) (Alves *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico do Diabetes.

Categoria		Glicemia (mg/dl)		
		Jejum	Ao acaso	2h (TTOG)
Glicemia normal		< 99	–	< 140
Pré-diabetes	Glicemia de jejum alterada	100-125	–	–
	Intolerância à glicose	–	–	≥140 e < 200
Diabetes tipo 1 ou 2		≥ 126	≥ 200	≥ 200
Diabetes gestacional		≥ 110	≥ 200	≥ 140

Fonte: American Diabetes Association (2004).

Notas:- Glicemia de jejum: ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas.

- Glicemia ao acaso: glicemia realizada em qualquer hora do dia sem levar em consideração o tempo desde a última refeição. O diagnóstico deve ser confirmado medindo a glicemia em jejum ou 2 h após o TTOG (Teste de Tolerância Oral à Glicose).

- TTOG: é a medida da glicemia basal e 2 horas após a ingestão de 1,75 g/kg de glicose (máx. 75 g).

- Um resultado positivo em qualquer dos testes acima deverá ser confirmado nos dias subseqüentes medindo a glicemia em jejum ou 2 h após o TTOG.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) manteve a recomendação do emprego do teste de tolerância oral à glicose (TTOG) como método ideal para o

diagnóstico do diabetes, tanto em bases individuais como em estudos epidemiológicos. A ADA também considera o TTOG como o teste de referência para o diagnóstico de diabetes, pois é mais sensível para identificar indivíduos com diabetes e alterações da tolerância à glicose (Gerstein, 2001).

2.1.5 Complicações e tratamento

Há relatos indicando que os pacientes diabéticos são suscetíveis a complicações que causam morbidade e mortalidade prematura. O paciente pode experimentar diversos problemas simultaneamente ou um único pode predominar no quadro clínico. São complicações: retinopatia, nefropatia, doença macrovascular, doença periodontal e dificuldade na cicatrização de feridas (Silverman, Eversole e Truelove, 2004; Patel *et al.*, 2012).

Sensação de desmaio, fraqueza, irritabilidade, palidez, nervosismo, tontura, ansiedade, perda de concentração, sonolência, dor de cabeça, palpitações, falta de coordenação motora, convulsões e coma são outras complicações que podem ser destacadas (Lauda, Silveira e Guimarães, 1998; Gregori, Costa e Campos, 1999).

A insulinoterapia constitui o item principal no tratamento do diabetes melito tipo 1, sendo essencial para a vida desses pacientes, mas pode vir a ser necessária, também, para o tratamento do diabetes melito tipo 2 (Dib e Calliari, 2001; Matheus, Ahmed e Villar, 2001).

No entanto, a administração de insulina além de promover desconforto aos pacientes em decorrência das injeções diárias, também pode provocar complicações e reações cutâneas, como lipodistrofia insulínica (lesões lipoatróficas, que evidenciam uma reação antígeno - anticorpo, sugerindo um mecanismo imunológico na patologia destas lesões), lipohipertrofia, nódulos endurecidos, equimose, ardência, prurido e também alergia à insulina, a qual pode incidir no local da aplicação ou se caracterizar por uma reação sistêmica (Davidson, 2001).

Os sinais e sintomas de alergia localizada podem surgir de uma reação imediata com urticária, endureção e prurido; de uma reação intermediária, com lesões pruriginosas, endurecidas e dolorosas ou de uma reação tardia, apresentando lesões pruriginosas, endurecidas, eritematosas, com queimação local, justificando-se assim o emprego de outros métodos de administração de fármacos (Silva, 2001).

Quanto ao tratamento do diabetes melito tipo 2, a prevenção primária, no que se refere aos fatores de risco, se faz com um regime alimentar saudável e atividade física regular. Essas ações preventivas reduzem ou adiam as necessidades de atenção à doença. A prevenção secundária inclui diagnóstico precoce e tratamento apropriado. O controle da hipertensão, do colesterol e dos níveis de glicemia, assim como o uso de hipoglicemiantes orais pode reduzir substancialmente o risco de complicações e desacelerar sua progressão (Opas, 2003).

2.1.6 Custos globais com o diabetes

O diabetes traz um grande impacto econômico para as nações. A FID estimou que em 2010 os custos globais com a doença foram de US\$ 376,0 bilhões (FID, 2015). Só nos Estados Unidos e na América Latina, por exemplo, os custos diretos e indiretos com a doença totalizaram 132 bilhões de dólares e 94,3 bilhões, respectivamente (ADA, 2003b). Análises de custo do tratamento para o diabetes em países latino-americanos demonstraram a significativa carga econômica da doença para os sistemas de saúde e sociedade (Arredondo, Zuñiga e Parada, 2005; Caporale, Calvo e Gagliardino, 2006).

Os custos do DM afetam o indivíduo, a família e a sociedade, porém não são apenas econômicos. Os custos intangíveis (p. ex., dor, ansiedade, inconveniência, e perda de qualidade de vida) também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e seus familiares, o que é difícil de quantificar (SBD, 2015).

Os custos diretos com DM variam entre 2,5 e 15% do orçamento anual da saúde de um país, dependendo de sua prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível. Estimativas do custo direto para o Brasil oscilam em torno de 3,9 bilhões de dólares americanos, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o México (ADA, 2013).

Estimativas recentes dos custos do tratamento ambulatorial dos pacientes com diabetes pelo Sistema Único de Saúde brasileiro são da ordem de US\$ 2.108,00 por paciente, dos quais US\$ 1.335,00 são relativos a custos diretos (Bahia *et al.*, 2011).

A OMS reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma opção terapêutica viável e importante também às populações dos países em

desenvolvimento, já que seu custo é diminuído quando comparado aos medicamentos obtidos por síntese química (Rezende e Cocco, 2002).

O uso de terapias menos onerosas para o tratamento de enfermidades crônico-degenerativas representa ganho importante nos investimentos humanos e financeiros empregados na área de saúde no Brasil. Assim, os fitoterápicos podem atuar como forma opcional de terapêutica levando em consideração o menor custo, e cujos benefícios adicionam-se aos da terapia convencional. Para tanto, são necessários maiores investimentos para estudos científicos nessa área de maneira a levar à comprovação da eficácia dessas espécies como hipoglicemiantes garantindo a segurança e eficácia na aplicação por parte dos profissionais de saúde (Borges, Bautista e Guilera, 2008).

2.2 Fitoterapia

As plantas são uma fonte de medicamentos para os seres humanos desde tempos imemoriais (Bhusan *et al.*, 2010; Rizvi e Mishra, 2013). Ao longo dos milênios, o homem, empiricamente, aprofundou seus conhecimentos para a melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita relação entre o uso de plantas e sua própria evolução (Devienne, Raddi e Pozetti, 2004).

De etimologia grega, a palavra Fitoterapia decompõe-se em *Phytón* e *Therapeía* que significam planta e tratamento, respectivamente (Newall, Anderson e Phillipson, 2002; Rosa, Barcelos e Bampi, 2012). Após um período de latência, devido à descoberta dos fármacos modernos e sintéticos, a fitoterapia tem registrado nas últimas décadas um aumento exponencial, principalmente nos países industrializados (Barata, 2008; Spiteri *et al.*, 2013).

A fitoterapia é uma área ampla, sendo necessário para a melhor compreensão conhecer algumas definições importantes que a envolvem. Primeiramente, é importante diferenciar planta medicinal de fitoterápico. Para Veiga Junior *et al.* (2005), a planta medicinal é "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos". O fitoterápico, por sua vez, é um medicamento tecnicamente obtido, com formulação específica, empregando-se apenas matéria prima de fonte vegetal, cujo efeito tenha sido comprovado

cientificamente (Kalluf, 2008), sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Brasil, 2004).

A garantia de qualidade do material vegetal a ser processado é fundamental na preparação de fitoterápicos, devendo considerar-se aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e de pureza. Por esse motivo, além do teor de substância ativa e intensidade das atividades farmacológica e toxicológica, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga microbiana, contaminação química por metais pesados, pesticidas e outros defensivos agrícolas, além da presença de matéria estranha como terra, areia, partes vegetais, insetos e pequenos vertebrados ou de produtos oriundos destes (Brasil, 2004).

Também é necessário, neste íterim, destacar a droga vegetal, que é a planta inteira, ou as partes, que após a coleta, secagem, estabilização e conservação, passam a ser utilizadas na preparação de medicamentos, considerando que o princípio ativo é o responsável pelos efeitos terapêuticos, tanto das plantas *in natura*, na forma de droga vegetal ou nas diferentes formas farmacêuticas (Kalluf, 2008; Brasil, 2010).

A natureza não fornece seus produtos com uma composição definida e padronizada. Os constituintes das plantas medicinais podem variar grandemente em razão de fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos. O material obtido das plantas medicinais cultivadas apresenta variações menores do que o material conseguido de plantas que crescem livremente. Outra vantagem do cultivo é que o aumento dos constituintes pode ser monitorado durante o crescimento da planta, tornando possível determinar o momento ideal para a colheita (Schulz, Hänsel e Tyler, 2002).

A transformação de uma planta em um medicamento deve visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (Miguel e Miguel, 1999).

A OMS estima que 80% da população mundial utiliza medicamentos à base de plantas. Como tal, o interesse nos sistemas terapêuticos indígenas que usam medicamentos à base de plantas, tem sido crescente. Esta preocupação foca-se num desenvolvimento e aperfeiçoamento destes sistemas que posteriormente se traduzem em melhores cuidados de saúde (Bhusan *et al.*, 2010).

O consumo de medicamentos de origem vegetal decorre, basicamente, do fato desses produtos representarem terapias de menor custo em relação às aquelas normalmente oferecidas pela indústria farmacêutica. Estudos demonstram que apenas 30% dos medicamentos comercializados são originados direta ou indiretamente de plantas (Devienne, Raddi e Pozetti, 2004).

Os médicos e a população em geral carecem de informações objetivas e seguras sobre os recursos fitoterápicos para o diabetes melito. Enquanto isso, inúmeros pacientes persistem no uso de chás de plantas para “tratar” a doença, baseando-se na chamada sabedoria popular, aguardando quem as queira, possa estudar, e conhecê-las cientificamente, separando em definitivo o mito da realidade quanto aos seus riscos e benefícios (Bragança, 1996).

2.2.1 Plantas utilizadas no tratamento do diabetes melito

Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar os sintomas do diabetes melito. O mecanismo de ação pelos quais as plantas reduzem a glicemia podem ser atribuídos aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células beta pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a glicemia; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação dos lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (Negri, 2005).

Ainda segundo o mesmo autor, as plantas medicinais usadas tradicionalmente no tratamento do diabetes melito demonstraram que, em sua maioria, estas possuem característica hipoglicemiante, confirmando a utilização das mesmas como antidiabéticas na medicina popular.

No Quadro 1, encontram-se as principais plantas utilizadas para o diabetes melito no Brasil (Bragança, 1996), e em João Pessoa - PB (Carvalho, Diniz e Mukherjee, 2005).

Quadro 1 – Principais plantas utilizadas para o Diabetes Melito no Brasil e em João Pessoa - PB.

Nome Científico	Nome Popular	Parte Usada	Estudos <i>in vivo</i>	Autores - Ano
<i>Chrysobalanus iaco</i> L	Abagiru	Folhas	Clínicos	Presta, 1986
<i>Allium sativum</i> L	Alho	Bulbo	Pré-clínicos; pré-clínicos e clínicos	Grover <i>et al.</i> , 2002; Bragança, 1996
<i>Aloe sp</i>	Babosa	Folhas	Pré-clínicos	Rajasekaran <i>et al.</i> , 2004; Grover e Vats, 2001
<i>Chataranthus roseus</i> L G Don	Boa noite	Folhas	Pré-clínicos	Nammi <i>et al.</i> , 2003
<i>Anacardium occidentale</i> L	Cajueiro	Cascas		Barbosa, 1988
<i>Baccharis genistelloides</i> P	Carqueja	Planta inteira	Clínicos	Bragança, 1996
<i>Allium cepa</i> L	Cebola	Bulbo	Pré-clínicos	Augusti, 1973; Kumari <i>et al.</i> , 1995; Grover <i>et al.</i> , 2002
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Eucalipto	Folhas	Pré-clínicos	Gray e Flatt, 1998
<i>Annona muricata</i> L	Graviola	Folhas, fruto	-	Bragança, 1996
<i>Cissus verticillata</i> L	Insulina vegetal	Folhas	Pré-clínicos; clínicos	Beltrame, 2001 Pepato <i>et al.</i> , 2003; Vasconcelos, 2004; Lima, 2007; Rosendo, 2009
<i>Mormodica charantia</i> L	Melão-de-são-caetano	Fruto	Pré-clínicos	Day <i>et al.</i> , 1990; Grover <i>et al.</i> , 2002
<i>Bauhinia forticata</i> L	Pata de vaca	Folhas	Pré-clínicos	Modesto-Filho, 1989; Lino <i>et al.</i> , 2004; Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>Phyllanthus sp</i>	Quebra-pedra		Pré-clínicos	Raphael <i>et al.</i> , 2002; Grover <i>et al.</i> , 2001
<i>Bumelia sartorum</i> Mart	Quixaba	Casca de raiz	Pré-clínicos	Almeida <i>et al.</i> , 1985; Naik <i>et al.</i> , 1991; Modesto-Filho, 1989
<i>Punica granatum</i> L	Romã	Raiz, caule e folhas	Pré-clínicos	Jafri <i>et al.</i> , 2000
<i>Bowdichia virgiloides</i> Kunth	Sucupira	Casca do caule	Pré-clínicos	Bragança, 1996

Fonte: Adaptado de Bragança, 1996; Carvalho, Diniz e Mukherjee, 2005.

Ao analisar a prevalência do uso de plantas medicinais consideradas hipoglicemiantes por pacientes diabéticos no município de Vitória de Santo Antão - PE e comparar este conhecimento etnofarmacológico com estudos descritos na literatura científica, Santos, Nunes e Martins (2012) observaram que 36% dos entrevistados relataram o uso de plantas medicinais consideradas hipoglicemiantes, e a *Cissus verticillata* (L.) estava entre as cinco mais empregadas com essa finalidade.

2.2.2 *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é uma planta originária da República Dominicana (Cano e Volpato, 2004). O gênero *Cissus* é o maior da família Vitaceae, sendo constituído de cerca de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (Beltrame *et al.*, 2001).

A classificação botânica da espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, encontra-se discriminada no Quadro 2.

Quadro 2 – Classificação da espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis.

Classificação da Espécie <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis	
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Rhamnales
Família	Vitaceae
Gênero	<i>Cissus</i>
Espécie	<i>Cissus verticillata</i> (L.)
Nome vernacular	“Insulina”

Fonte: Vasconcelos, 2004.

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis apresenta como sinônimo *Cissus sicyoides* (Mikich e Silva, 2001). De acordo com Lorenzi e Matos (2002), são sinônimos da espécie *Cissus verticillata* (L.): *Cissus canescens* Lam., *Cissus compressicaulis* Ruiz & Pav., *Cissus ovata* Lam., *Cissus smilacina* Kunth, *Cissus tamoides* Cambess., *Cissus umbrosa* Kunth, *Phoradendron verticillatum* (L.) Ducke, *Spondylantha aphylla* C. Presl, *Viscum verticillatum* (L.), *Vitis sicyoides* (L.) Baker.

Estudos químicos realizados com *Cissus verticillata* (L.) mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e sais de magnésio, manganês, silício, cálcio, fósforo e potássio (Silva, 1996).

Beltrame *et al.* (2002) isolaram das partes aéreas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis um novo glicosídeo cumarínico: 5,6,7,8-tetrahidroxycumarina-5beta-xilopiranosídeo, obtendo também a cumarina sabandin; dois flavonóides,

campferol 3-rhamnosídeo e quercetina 3-rhamnosídeo; dois esteróides, o sitosterol e o 3beta-O-beta-D-glicopiranosilsitosterol.

Na fração acetato de etila, do extrato aquoso das folhas, foram isolados os flavonóides kaempherol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona), luteolina (2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e sulfato de 3`luteolina (Barbosa *et al.*, 2002), estando as estruturas químicas de alguns destes compostos representadas na Figura 1.

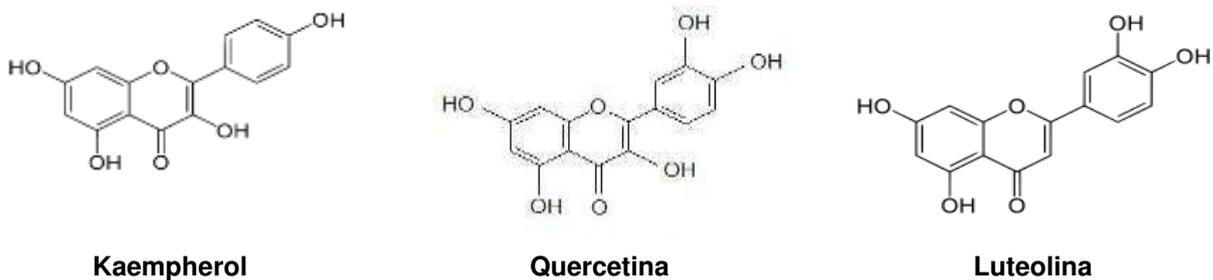


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns compostos presentes nas partes aéreas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Beltrame *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2002).

A presença de compostos fenólicos e de flavonóides na espécie de plantas *Cissus verticillata* (L.), também foi confirmada por Barbosa *et al.* (2013), demonstrando a atividade hipoglicemiante da mesma.

Na medicina popular, o chá das partes aéreas do *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é utilizado como antiinflamatório, antiepiléptico, antihipertensivo, antitérmico, antireumático e antidiabético (Silva, Akisue e Oga, 1996).

Vários estudos farmacológicos de ação hipoglicemiante e antilipêmico têm sido realizados com extratos fluidos, decocto, infuso e extrato aquoso de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, em ratos normais e diabéticos, tanto de forma aguda como crônica, verificando-se a diminuição da glicemia e dos triglicerídeos nos mesmos. Observou-se, nesses estudos, que a composição química das folhas e dos talos não se alterou, nem mesmo qualitativamente durante a secagem, de maneira que os autores concluíram que os resultados justificam o uso popular de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis e o potencial benefício dessa planta na medicina alternativa e no tratamento do diabetes melito tipo 2 (Bragança, 1996; Lizama, Martinez e Perez, 2000; Pepato *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2004).

Pepato *et al.* (1998) realizaram estudos com *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis para avaliar o pressuposto efeito “antidiabetogênico”. Os ensaios farmacológicos foram realizados para observar o efeito da administração oral prolongada do decocto das folhas (150 mL/L de água) de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis a ratos diabéticos (50 mg/kg de peso de estreptozotocina por via endovenosa), sobre o metabolismo dos carboidratos durante 30 dias. Também investigaram o efeito da administração prévia do decocto quando o grupo escolhido aleatoriamente como experimental recebeu, por cinco dias, o decocto como substituto da água e, em seguida, os animais foram tornados diabéticos. Nesses experimentos, semanalmente, durante 30 dias, determinou-se a glicemia e a glicosúria e, quando do sacrifício dos animais, o glicogênio hepático. O tratamento crônico com *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis melhorou a glicemia, o que se refletiu na redução da glicosúria, porém o mecanismo de ação não ocorre por uma redução da glicogenólise e/ou aumento na síntese de glicogênio.

No norte do Paraná, a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é conhecida como insulina e o chá das partes aéreas é utilizado no tratamento do diabetes melito tipo 2, cuja prevalência alcança 7% da população acima de 40 anos. O uso popular da *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis ocorre concomitantemente ou em substituição ao tratamento médico convencional (Beltrame *et al.*, 2001).

Vasconcelos *et al.* (2002) realizaram estudo etnofarmacológico de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis e constataram que as folhas são utilizadas, sob as formas de infusão e decocção, para o tratamento de diabetes melito. Nesse mesmo estudo, a ingestão do infuso, preparado com 1,0 grama de pó das folhas (3 folhas secas) em 150 mL de água, uma vez ao dia, corresponderia à posologia mais utilizada da planta. Sendo assim, os autores realizaram preparações semelhantes às utilizadas pelo grupo de estudo, determinaram o peso seco de várias amostras de 1,0 mL, e o material obtido pesou em média 1,8 mg de sólidos. Como o ser humano (peso médio dos voluntários do estudo era de 60 kg) ingere cerca de uma xícara (150 mL) do infuso/dia, concluíram que a dose de uso popular era de 4,5mg/kg/dia.

Ainda de acordo com os estudos de Santos (2007), em ensaios clínicos de fase II com as folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis em indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos tipo 2, constatou-se que a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis não causou alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas

gerais e eletrocardiográficas, confirmando a segurança da utilização da mesma, como alimento, pela população.

Em ensaios realizados para determinar o grau de toxicidade – investigação da dose letal 50% (DL₅₀), apresentado pela fração aquosa das folhas (FAF) de *Cissus verticillata* (L.), observou-se que não houve mortes dos camundongos Swiss em nenhuma das duas vias de administração utilizadas – oral e intraperitoneal, demonstrando assim que o produto avaliado possui toxicidade aguda relativamente baixa (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Almeida *et al.* (2007), realizaram estudos com as partes aéreas de *Cissus verticillata* (L.) avaliando o efeito do extrato hidroalcoólico em ratas grávidas e suas crias, utilizando os seguintes parâmetros: duração da gestação, número de crias para incubar, ganho de peso materno, reflexo postural, dia de abertura de olhos e dia de passagem para a fase adulta. Os resultados mostraram que *Cissus verticillata* (L.) não exerce nenhum efeito no índice de fertilidade. Porém, todas as doses (300, 600 e 1000 mg/kg) haviam promovido alteração no reflexo postural, mas não no parâmetro “abertura dos olhos”, nem na passagem à fase adulta, que é uma importante fase de desenvolvimento neurológico para a cria. A *Cissus verticillata* (L.) não modificou a temperatura corpórea, nem a deambulação do animal em todos os períodos.

Rosendo (2009), analisando a eficácia da planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, em pacientes com diagnóstico de diabetes melito tipo 2, através da concentração de glicose na saliva e no sangue, constatou que o infuso da *Cissus verticillata* (L.), foi capaz de produzir um efeito hipoglicemiante quando administrado por um período de oito semanas.

2.3 Sistemas de liberação controlada de fármaco

A utilização dos sistemas de liberação de fármacos (*Drug-delivery systems*) surgiu desde a década de 1980. Mas tem-se evidenciado uma significativa busca no mercado por novos sistemas farmacêuticos para o transporte de fármacos. Sistemas estes que atuem como alternativas terapêuticas mais eficientes e que possibilitem o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, com o conseqüente aumento da eficiência do efeito farmacológico e de uma possível diminuição dos efeitos

colaterais, sendo assim administrados com mais segurança (Baumgartner *et al.*, 2000).

Formas farmacêuticas não convencionais ou de liberação modificada, também conhecida como Novos Sistemas Transportadores de Fármacos (NSTF) diferenciam-se por apresentarem modificação da taxa de liberação ou do local onde a substância ativa é liberada, quando comparada às formas farmacêuticas convencionais (Manadas, Pina e Veiga, 2002).

A indústria farmoquímica tem-se destacado pelo uso e aproveitamento de matérias primas de baixo custo e fácil acesso, como por exemplo, os materiais poliméricos. Esses estão sendo utilizados na liberação controlada de fármacos (Trindade, 2006).

A escolha de um polímero para um sistema de liberação de fármacos depende de vários fatores que correlacionam as propriedades do princípio ativo dos polímeros e demais excipientes que irão fazer parte da formulação. Além disso, o mecanismo pretendido de liberação do fármaco também interfere nessa escolha. Para se chegar ao mecanismo desejado de liberação do fármaco, os polímeros (sintéticos) podem ter suas propriedades moldadas ou pode-se trabalhar com uma mistura de polímeros que apresentam propriedades diversas e, com a modificação da proporção destes na formulação, pode-se chegar ao sistema de liberação que satisfaça às necessidades do formulador (Oliveira e Lima, 2006).

Assim sendo, os sistemas de liberação controlada de fármacos utilizando polímeros têm sido uma alternativa eficiente na administração de fármacos, pois esses sistemas combinam um material polimérico, que pode ser chamado de carreador, ao fármaco que se deseja administrar (Rodrigues, 2006).

Dentre esses materiais encontram-se as membranas poliméricas. Polímeros biodegradáveis naturais e/ou sintéticos estão sendo utilizados na fabricação destas membranas, mas apenas alguns têm demonstrado biocompatibilidade. Entre os polímeros que se destacam pela excelente biocompatibilidade estão os polissacarídeos e, como exemplo, tem-se a quitina e a quitosana (Dodane e Vilivalam, 1998; Freire *et al.*, 2006).

2.4 Biomateriais como carreadores

2.4.1 Quitina

A quitina é um polímero constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose possuindo estrutura semelhante a das fibras de celulose (Figura 2). A diferença estrutural entre estas duas fibras se deve aos grupos hidroxila, localizados na posição dois, que na quitina foram substituídos por grupos acetamido (-NHCOCH₃), sendo a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose (Gil e Ferreira, 2006).

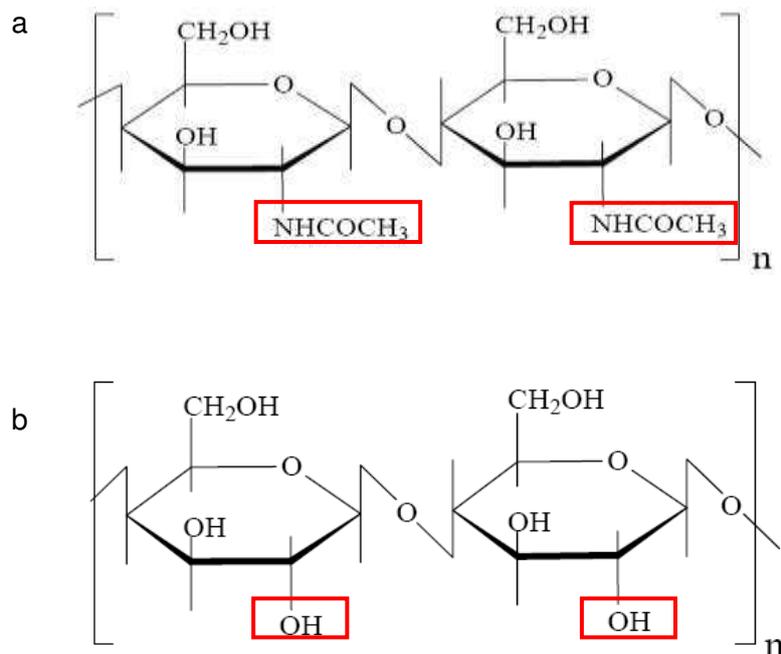


Figura 2 – Estrutura química da quitina (a) e da celulose (b) (Santos, 2004).

A quitina é encontrada em abundância na natureza e tem como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos (notadamente caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (Dallan, 2005).

Uma grande variedade de aplicações médicas para a quitina já foi proposta, constituindo-se como um material biocompatível e biodegradável pela ação da lisozima produzida no intestino dos animais. A quitina tem apresentado bons

resultados como material para suturas, sendo resistente ao ataque da bile, da urina e do suco pancreático; como material para curativos e em aplicações de liberação controlada de fármacos. A desacetilação da quitina resulta na produção da quitosana (Fernandes, 2009).

2.4.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (Spin-Neto *et al.*, 2008). Trata-se de um polissacarídeo natural, derivado do processo de desacetilação da quitina, composta de unidades β -(1 \rightarrow 4) D-glicosamina e β -(1 \rightarrow 4) N-acetil-D-glicosamina, conforme esquematizado na Figura 3. Onde β corresponde à estrutura cristalina, 1 e 4 são as posições enumeradas assim, devido aos grupos funcionais presentes nessas posições e D significa dextrógeno, termo da isometria óptica em que a luz polarizada é desviada para direita, em um carbono assimétrico (Bruce, 2006).

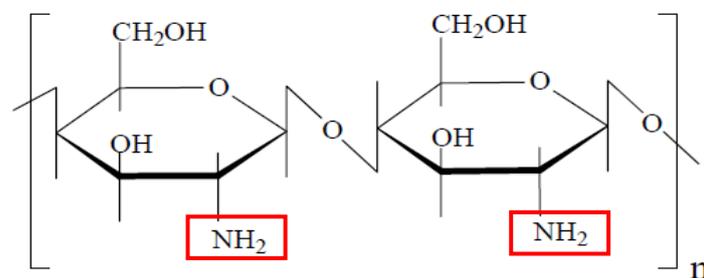


Figura 3 – Estrutura química da quitosana (Santos, 2004).

Na quitosana há a predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade tornando assim favorável o rearranjo de moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido, que também são polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água (Signini e Campana-Filho, 2001; Assis *et al.*, 2003). Essa habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis biodegradáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de nutrientes e metabólitos (Thein-Han e

Kitiyant, 2007).

A quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6 (Damian *et al.*, 2005).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Através de experimentos de difração de raios X, foram encontradas quatro polimorfos do polímero, sendo três formas hidratadas e uma anidra (Vinsova e Vavrikova, 2008). Essa polimorfa hidratada é a mais comumente encontrada e apresenta a mesma estrutura que a quitosana disponível no mercado (Okuyama *et al.*, 2000).

O perfil semicristalino da quitosana é devido às fortes interações intra e intermoleculares, caracterizadas pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (Uragami e Tokura, 2006).

A quitosana também apresenta como uma de suas características mais promissoras, a sua excelente habilidade para ser processada em estruturas com poros interconectados para formação de *scaffolds*, que podem ser moldadas em diversas formas tais como membranas, blocos, fibras e microesferas (Nwe, Furuike e Tamura, 2009). Dentre as técnicas utilizadas para a fabricação, matrizes de quitosana podem ser obtidas pelo processo de liofilização ou *freeze drying*, através do qual é possível obter *scaffolds* com diferentes densidades, formas e distribuição de tamanho dos poros, a depender das variáveis de processamento determinadas (Uragami e Tokura, 2006; Correlo *et al.*, 2007).

Os *scaffolds* são suportes biológicos ou sintéticos (matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), desenvolvidos com a finalidade de serem inseridos em organismos vivos (Griffith e Naughton, 2002); permitindo a penetração de nutrientes e fatores osteoindutivos, bem como a fixação, migração, diferenciação, proliferação e crescimento das células (Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

Além disso, os *scaffolds* apresentam como propriedades essenciais: biocompatibilidade para evitar resposta imune e infecção; interconectividade dos poros para permitir a difusão dos nutrientes e gases, a remoção dos metabólicos, bem como, a vascularização tecidual; resistência mecânica para suportar a pressão hidrostática; e biodegradabilidade adequada para que a taxa de degradação esteja

ajustada à taxa de crescimento do novo tecido (Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Barbanti e Zavaglia, 2005).

2.4.2.1 Propriedades biológicas da quitosana

A quitosana tem propriedades interessantes para aplicação em engenharia de tecido tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, acelera a recuperação de lesões, tem ação analgésica, reduz o nível do colesterol sanguíneo auxiliando na redução do peso, estimula os efeitos do sistema imunológico, além de ter se mostrado um composto bacteriostático e fungistático. Além disso, os resultados de sua degradação em organismos vivos que são as glicosaminas, são substâncias não tóxicas (Berger *et al.*, 2004).

Entretanto, as aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. O grau de desacetilação está usualmente na faixa de 60% a 100% e influencia não só as propriedades físico-químicas, incluindo a conformação da molécula de quitosana, a deformação e a tensão de ruptura, como também a sua biodegradabilidade e atividade imunológica (Hsu *et al.*, 2004).

Maiores proliferação celular e resistência mecânica são observadas para quitosana com maior grau de desacetilação (Thein-Ham, Kitiyanant e Misra, 2008). Por outro lado, a taxa de degradação *in vivo* é inversamente proporcional ao grau de desacetilação, podendo a quitosana permanecer inalterada por muitos meses depois de implantada (Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005).

A taxa de degradação da quitosana é um importante fator a ser considerado para sua aplicação biomédica e farmacêutica. É importante que polímeros como a quitosana possam ser eliminados do organismo após o cumprimento de sua função, e para isso, é necessário que o polímero seja reduzido a fragmentos menores passíveis de sofrer, por exemplo, *clearance* renal (Kean e Thanou, 2010; Villanova *et al.*, 2010).

Grande destaque tem-se dado à atividade antimicrobiana da quitosana, apresentando ainda grande potencial para aplicações na agricultura, medicina, odontologia e indústria farmacêutica (Khor e Lim, 2003).

A atividade antimicrobiana está relacionada à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são

protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Cleasen, Whilhelms e Kulicke, 2006).

Outros estudos revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo. Já foi comprovado que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas aumenta, quanto maior for a massa molar do polímero, enquanto que, para bactérias gram-negativas, quanto menor for a massa molar da quitosana, maior a atividade antimicrobiana. Deste modo, os efeitos da quitosana parecem ser distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das bactérias gram-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molar forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes. Por outro lado, a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (Silva, Santos e Ferreira, 2006).

Ainda de acordo com os mesmos autores, tanto a quitina como a quitosana reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana mais eficaz do que a quitina. Esse fato se deve à capacidade da quitosana em agregar tanto as plaquetas como os eritrócitos, pela interação entre as cargas positivas dos grupos amínicos livres com as cargas negativas dos receptores das hemácias. A ação da quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de transformação do crescimento β_1 , que desempenham papel importante na cicatrização.

Sendo assim, a quitina e a quitosana podem ser empregadas no tratamento de ferimentos ou queimaduras, sob a forma de filmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas (Craveiro e Craveiro, 2000).

Além disso, a quitosana possui propriedade imunomoduladora, o que se deve a sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos. Isto explica não só o papel da quitosana na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a degradação desse polímero no organismo (Fernades, 2009).

Sendo assim, vários estudos sobre a quitosana com aplicação em implantes, reconstituição de tecidos e liberação controlada de fármacos demonstraram o uso promissor desse material (Khor e Lim, 2003; Lima, 2010).

2.4.2.2 Emprego da quitosana em sistemas de liberação controlada de fármacos

O desenvolvimento de formulações que tenham como via de administração a pele se tornou uma estratégia interessante para fármacos cujo sítio de ação é a própria pele ou algum outro alvo no organismo, sendo uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica (Silva *et al.*, 2010).

A quitosana possui propriedades bioadesivas, o que estende sua utilização não só na pele, mas também em mucosas, que também faz parte da via de administração tópica. A bioadesão é a propriedade que um material natural ou sintético possui de aderir a um tecido biológico, sendo que, se este tecido for uma mucosa, se emprega o termo mucoadesão (Chiappetta *et al.*, 2006).

Sistemas mucoadesivos apresentam diversas vantagens. Entre elas podemos destacar: o aumento do tempo de permanência em uma determinada região, podem ser formulados como sistemas de liberação prolongada ou controlada, melhoria substancial do contato do fármaco dissolvido com a mucosa melhorando sua absorção, possibilidade de administração de substâncias facilmente degradáveis minimizando sua alteração pelo meio biológico ao entorno devido ao íntimo contato com a mucosa (Rodríguez *et al.*, 2000).

As membranas de quitosana possuem uma adequada resistência mecânica aliada a uma permeabilidade molecular seletiva. Por ser um material seletivamente permeável, a quitosana surgiu como bom candidato a meio de liberação controlada de medicamentos no meio gastrintestinal e na mucosa bucal, tendo sido proposto utilizá-la como material para a liberação de antibióticos para a redução bacteriana local em aplicações orais (Ravi Kumar, 2000; Ikinci *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003).

Vários estudos têm sido desenvolvidos associando-se a quitosana a fármacos, com finalidades diversas. Lima (2010) desenvolveu biofilmes de quitosana/insulina, verificando ao final que os mesmos apresentaram potencial para aplicação em sistema de liberação controlada de fármacos.

Holanda (2011) desenvolveu e avaliou membranas de quitosana reticuladas com TPP, concluindo que as mesmas apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial em sistema de liberação controlada de insulina.

Furtado (2014), desenvolveu e avaliou membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada da curcumina para o tratamento do melanoma, verificando ao final que o sistema desenvolvido apresentou potencial para aplicações em liberação controlada de fármaco, e as membranas de quitosana/curcumina mostraram-se eficazes para o tratamento do câncer.

Nascimento (2014), desenvolveu e avaliou comparativamente membranas de quitosana/piperina não reticuladas e reticuladas para aplicação como sistema transdérmico para liberação controlada de fármacos, chegando à conclusão que o sistema desenvolvido apresentou-se como promissor.

Cruz (2015) avaliando a liberação controlada de fármacos antineoplásicos em *scaffolds* tridimensionais de quitosana constatou que os *scaffolds* formados apresentaram propriedades morfológicas e físico-químicas que podem contribuir para carrear fármacos antineoplásicos, e cuja taxa de degradação pode ser controlada pela reticulação dos mesmos.

Baseado em todos esses estudos e devido às características apresentadas pela quitosana, membranas de quitosana além de serem empregadas em sistemas de liberação de fármacos, são amplamente utilizadas em outras aplicações, como: empacotamento de alimentos, pele artificial e cicatrização de ferimentos (Chen *et al.*, 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Quitosana de baixa massa molecular - Grau de desacetilação entre 75-85%, Sigma Aldrich® (Lote MKBD 3830).
- Ácido Acético Glacial P.A., Sigma Aldrich® (Lote SZBB1470V).
- Hidróxido de sódio em micro pérola P.A. - Massa molar 40,00 g/mol, número de referência 01564, Neon (CAS N° 1310-73-2).
- Hidróxido de amônio 28-30% P.A. - Massa molar 35,05 g/mol, número de referência 4108, Neon (CAS N° 1336-21-6).
- Tripolifosfato de sódio - Sigma Aldrich® (Lote 16529COV).
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich®, pH = 7,4, sob número de referência P4417 – 50TAB.
- Lisozima - Sigma Aldrich® (Lote BCBG4804V).
- Saliva artificial - Produzida segundo o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição Rev. 02 140, na Farmácia de Manipulação ROVAL.
- Extrato alcoólico de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis.

3.2 Metodologia

3.2.1 Tipo e local da pesquisa

Foi desenvolvida uma pesquisa laboratorial, *in vitro* e quantitativa no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/ UFCG.

3.3 Material vegetal

Na Figura 4 evidencia-se um fluxograma das etapas de coleta e identificação da planta, bem como de obtenção do Extrato Alcoólico Bruto (EAB).

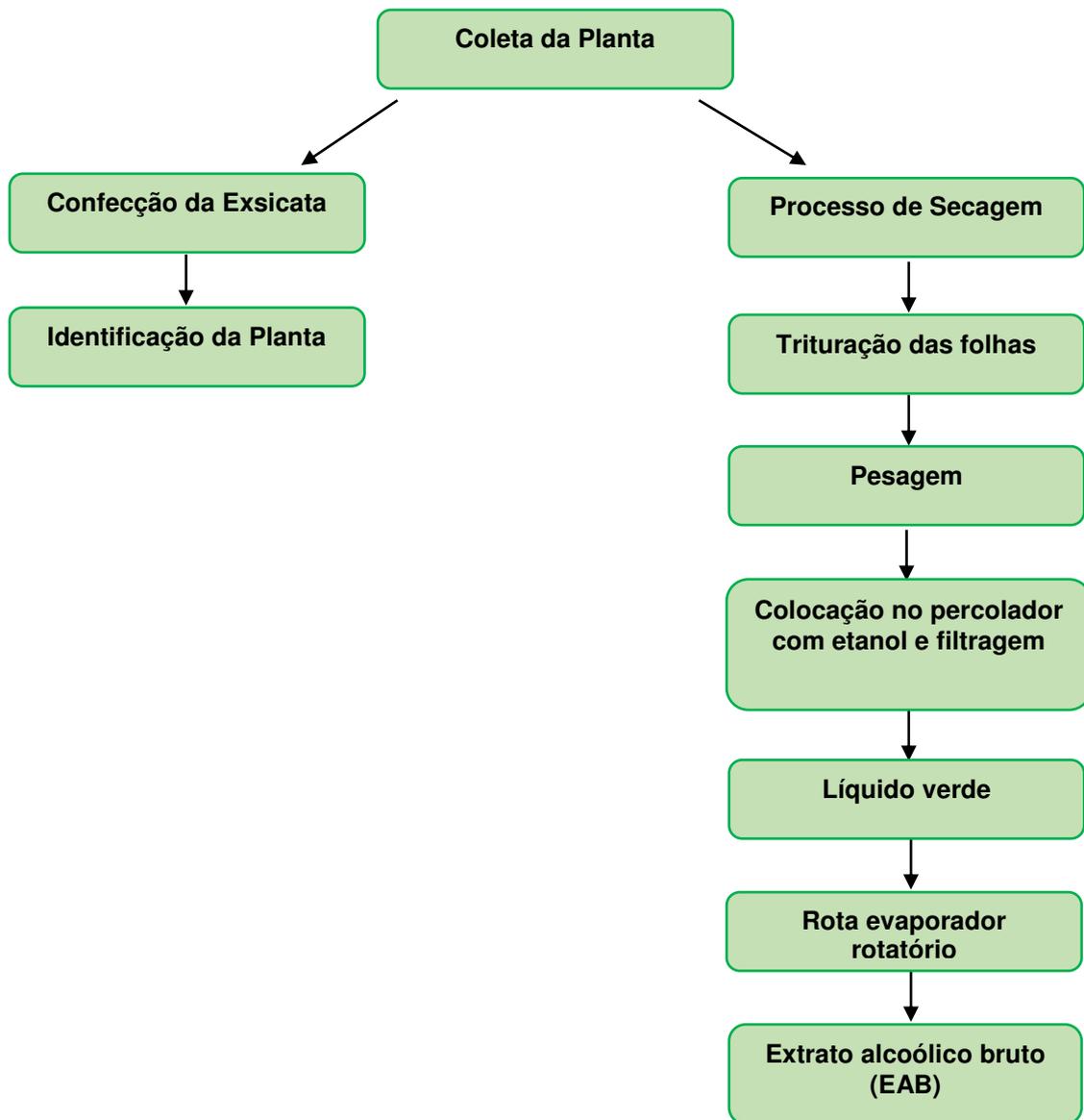


Figura 4 – Fluxograma das etapas de coleta, identificação da planta e obtenção do EAB (Autor, 2016).

3.3.1 Coleta e identificação da planta

As folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Figura 5) foram coletadas no mês de Agosto/2014, às 6 horas da manhã, no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde a planta foi cultivada.



Figura 5 – Apresentação das folhas e frutos de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).

Com a finalidade de identificar botanicamente a espécie vegetal utilizada no estudo, partes aéreas (folhas e frutos) de plantas adultas frescas foram prensadas (Figura 6), em seguida postas para secagem em estufa artesanal a uma temperatura de 38°C por 72 horas, para confecção de exsicatas.

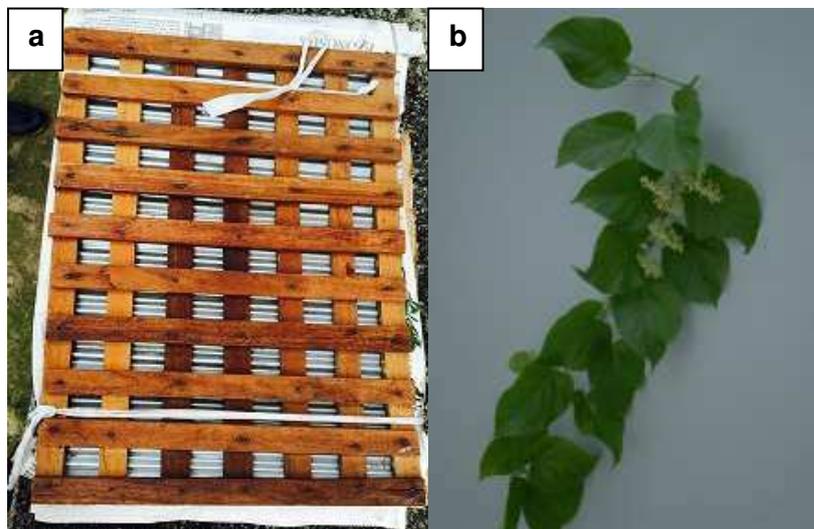


Figura 6 – Prensa utilizada (a) e imagem da espécie vegetal antes do processo de secagem na estufa artesanal (b) (Autor, 2016).

A identificação botânica da planta foi realizada pelo Professor Lombardi, J (Anexo A). Amostras representativas das exsicatas foram depositadas no Herbário CSTR, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR/UFCG), sob número de tombo – CSTR 5170.

3.3.2 Obtenção do extrato vegetal

- **Processo de secagem**

As folhas foram desidratadas em estufa com ar circulante, a 38°C, por 72 horas, e trituradas em moinho tipo Harley, sendo o rendimento médio de 17% aproximadamente (Figura 7), seguindo a metodologia de Vasconcelos (2004).



Figura 7 – Rendimento médio de 17% das folhas da planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).

- **Preparação do extrato vegetal**

O extrato alcoólico (EA) do pó das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis foi preparado através do método de remaceração. O pó das folhas secas foi extraído com álcool a 95% à temperatura ambiente (26°C), em um interpolador de aço inox, e deixado em repouso por 72 horas (Figura 8).



Figura 8 – Pó das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis com álcool a 95%, em interpolador de aço inox (Autor, 2016).

Em seguida, o material foi filtrado e submetido a uma nova extração por 48 horas. Dessa forma, esse procedimento foi repetido para extração exaustiva do material vegetal. Mediu-se o pH do filtrado obtido e, em seguida, ele foi colocado em rota evaporador rotatório R-210 BUCHI (Figura 9), à pressão de 64 Bar com temperatura de 40°C, por um período de 48h.



Figura 9 – Rota evaporador rotatório R-210 BUCHI (Autor, 2016).

Ao final, foi obtido um material escuro, higroscópico, denominado extrato alcoólico bruto, com uma quantidade mássica de 85,8g, como pode ser observado na Figura 10.



Figura 10 – Extrato alcoólico bruto de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (Autor, 2016).

3.3.3 Screening fitoquímico

Para a caracterização fitoquímica da planta foram realizados testes clássicos de identificação para os principais grupos de princípios ativos: alcalóides (reações de Bouchardat, Mayer, Dragendorff e Ácido Sílico-Tungstico), esteróides (reação de Liebermann-Buchard), taninos (reação de gelatina a 0,5% e reação com cloreto férrico a 2%), flavonóides (fita-magnésio e fluorescência) e saponinas (teste de espuma), evidenciados no Anexo B.

3.4 Fase Exploratória

Na fase exploratória, foram desenvolvidos filmes e *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, conforme esquema apresentado na Figura 11.

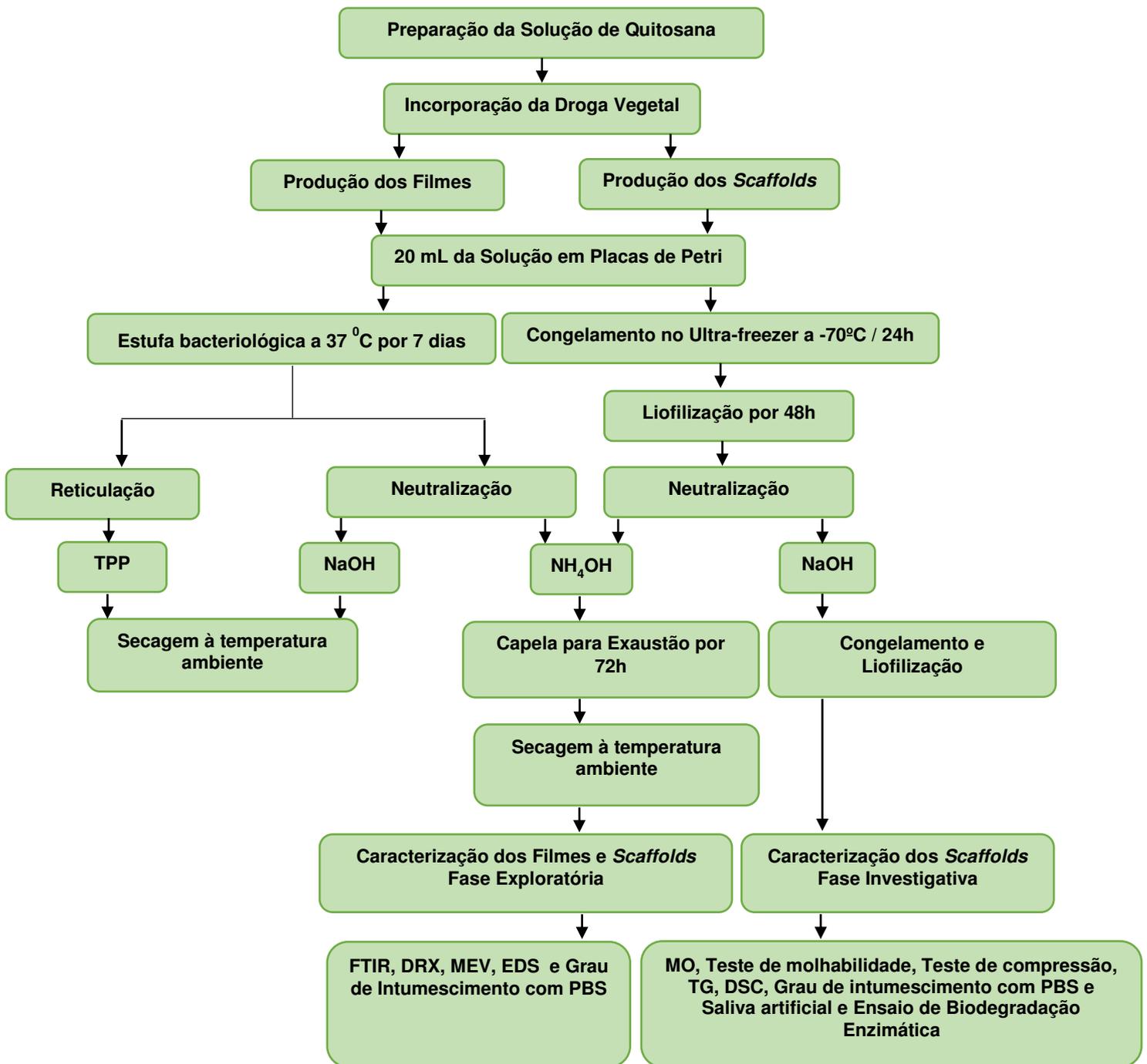


Figura 11 – Fluxograma da produção dos filmes e *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal (Autor, 2016).

3.4.1 Metodologia da preparação dos filmes e *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal

3.4.1.1 Técnica de preparação dos filmes

A preparação dos filmes de quitosana foi conduzida de acordo com a técnica de evaporação de solvente, segundo a metodologia empregada por Holanda (2011), Sousa (2012). A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 10 g de quitosana em 1L de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial sob agitação mecânica durante 24 h a 430 rpm (Figura 12).



Figura 12 – Solução de quitosana com ácido acético glacial sob agitação mecânica (Autor, 2016).

Foram adicionados 20 mL da solução, com pH 4.38, em placas de Petri em acrílico com diâmetros de 55x13 mm. A quitosana empregada para o preparo da solução foi a quitosana de baixa massa molar, grau de polimerização entre 1186-1924 e utilizada sem purificação. O ácido acético glacial P.A. foi empregado como solvente para a quitosana.

A preparação dos filmes contendo a droga vegetal foi realizada dissolvendo-se em 250 mL da solução de quitosana, 5%, 10%, 15% e 20% da droga vegetal, proporcionalmente à concentração de quitosana empregada. As concentrações da droga vegetal foram selecionadas tomando como base os estudos desenvolvidos por Santos (2007) e Rosendo (2009) que utilizaram 1,0 grama de pó das folhas de *Cissus verticillata* (L.) em pacientes, sendo essa dosagem considerada ideal para ser empregada pela população como terapêutica.

Essa solução foi colocada também no agitador mecânico durante 2 h a 550 rpm, até que a droga vegetal dissolvesse de forma homogênea. Após a dissolução da droga vegetal, o pH das soluções obtidas ficou em torno de 4,54. Da mesma

forma, foram vertidos 20 mL de cada uma das soluções obtidas em placas de Petri em acrílico.

As placas foram então acondicionadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 7 dias para evaporação do ácido e formação do filme (Figura 13).



Figura 13 – Solução de quitosana em placas de Petri, acondicionadas em estufa a 37°C (Autor, 2016).

Após a secagem dos filmes, os mesmos foram retirados da estufa para a neutralização.

Na Tabela 2 observam-se as nomenclaturas adotadas neste trabalho para os diferentes filmes confeccionados.

Tabela 2 – Nomenclatura dos filmes confeccionados.

Filme	Nomenclatura
Filme de Quitosana	FQ
Filme de Quitosana com 5% da droga vegetal	FQ5
Filme de Quitosana com 10% da droga vegetal	FQ10
Filme de Quitosana com 15% da droga vegetal	FQ15
Filme de Quitosana com 20% da droga vegetal	FQ20

Fonte: Autor, 2016.

3.4.1.2 Técnica de preparação dos *scaffolds*

Assim como descrito no item 3.4.1.1, a solução de quitosana foi preparada e mantida sob agitação mecânica por um período de 24 h sendo, em seguida, vertidas nas placas de Petri, na mesma concentração. A adição da droga vegetal à solução

de quitosana também procedeu-se da mesma maneira. A diferença foi que, a partir dessa etapa, empregou-se a técnica de *freeze drying*, segundo a metodologia empregada por Sampaio *et al.* (2012) e Cruz (2015). Nessa técnica, as placas de Petri foram acondicionadas e congeladas no Ultra-freezer 490 L, de ultra baixa temperatura da AmericanLab, a uma temperatura de -70°C por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas para o liofilizador L 108 fabricado pela LIOTOP (Figura 14), permanecendo por um período de 48 horas.



Figura 14 – Liofilizador L 108 fabricado pela LIOTOP (Autor, 2016).

Após a liofilização dos *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, os mesmos foram neutralizados.

Na Tabela 3 observam-se as nomenclaturas adotadas neste trabalho para os diferentes *scaffolds* confeccionados.

Tabela 3 – Nomenclaturas dos *scaffolds* confeccionados.

<i>Scaffold</i>	Nomenclatura
<i>Scaffold</i> de Quitosana	SQ
<i>Scaffold</i> de Quitosana com 5% da droga vegetal	SQ5
<i>Scaffold</i> de Quitosana com 10% da droga vegetal	SQ10
<i>Scaffold</i> de Quitosana com 15% da droga vegetal	SQ15
<i>Scaffold</i> de Quitosana com 20% da droga vegetal	SQ20

Fonte: Autor, 2016.

3.4.2 Processo de neutralização

Parte das amostras foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) e outra parte foi neutralizada com hidróxido de amônio (NH₄OH), por serem estas bases solúveis. O NH₄OH é uma base fraca, enquanto o NaOH é uma base forte.

- Processo de Neutralização com Hidróxido de Amônio

No preparo da solução de hidróxido de amônio, foi dispensado em um balão volumétrico 500 mL de água destilada, estando a capela para exaustão de gases da SPLabor ligada, e incorporado 50 mL de amônio; completando-se com mais água destilada até ser atingido o volume final de 1000 mL. Filmes e *scaffolds* foram neutralizados com a solução de hidróxido de amônio, pH 12,78, permanecendo as amostras sob atmosfera dessa solução, com a capela de exaustão ligada, por um período de 72 horas (Figura 15). Em seguida, as amostras foram colocadas para secar à temperatura ambiente (23°C).



Figura 15 – Processo de neutralização dos filmes e *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, na solução de hidróxido de amônio (Autor, 2016).

Algumas amostras a serem neutralizadas com o hidróxido de amônio foram separadas em triplicata sendo analisados dados como espessura, diâmetro e massa, antes e após o processo de neutralização. A espessura e o diâmetro das amostras foi verificado com o auxílio de um paquímetro digital DIGIMESS 100-174BL (Figura 16), enquanto a massa das amostras foi verificada através da balança analítica de precisão da BEL ENGINEERING, sob nº 11.05.03.

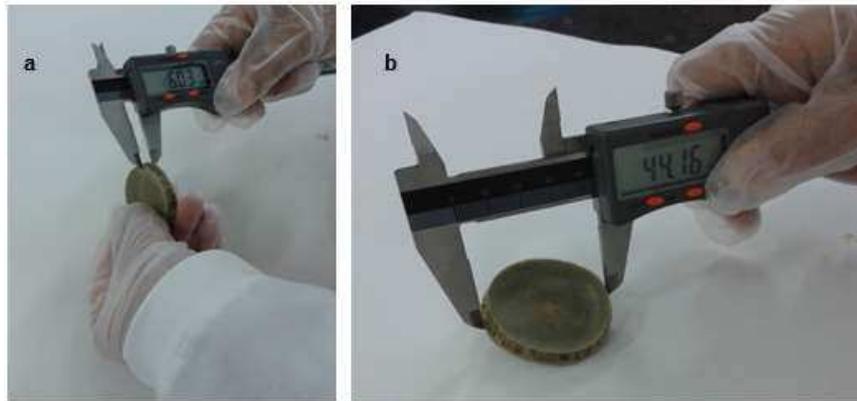


Figura 16 – Espessura (a) e diâmetro (b) das amostras verificados com o auxílio de paquímetro digital DIGIMESS 100-174BL (Autor, 2016).

- Processo de Neutralização com Hidróxido de Sódio

Nessa etapa de neutralização foi empregado o hidróxido de sódio em micro pérola P.A. A solução de hidróxido de sódio foi preparada dissolvendo-se 40 gramas da base em 500 mL de água destilada, sendo posteriormente adicionado o mesmo solvente até ser atingido o volume final de 1000 mL.

Filmes e *scaffolds* foram neutralizados com a solução de hidróxido de sódio 1 M (pH 14), permanecendo imersos nessa solução durante 30 minutos (Figura 17), sendo em seguida realizadas sucessivas lavagens com água destilada a fim de atingir o pH entre 6 e 6,5.



Figura 17 – Processo de neutralização dos filmes e *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal, na solução de hidróxido de sódio (Autor, 2016).

O acompanhamento do pH foi realizado com pHmetro digital T-1000 da Tekna, previamente calibrado com soluções padrão. Entretanto, depois de muitas sessões tentando a neutralização completa das amostras com o hidróxido de sódio, o pH da solução não atingiu o valor desejado e, além disso, a cada mudança de água destilada, era evidenciado macroscopicamente (pela coloração da água), que grande parte da droga vegetal incorporada ia sendo perdida. Foi adicionado 20 mL de água destilada aos *scaffolds*, os quais foram novamente congelados e liofilizados. Já os filmes foram colocados para secar à temperatura ambiente (23°C).

3.4.3 Processo de reticulação

O processo de reticulação consiste na ligação cruzada entre cadeias poliméricas que são provocadas por agentes reticulantes que possuam, no mínimo, dois grupos funcionais (Holanda, 2011).

No presente estudo, os filmes foram submetidos ao processo de reticulação empregando-se o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) como agente reticulante.

A solução de tripolifosfato de sódio foi preparada em três concentrações distintas a fim de se avaliar a ação desse agente reticulante sobre as amostras. Assim sendo, uma solução de 1% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 1 grama do sal em 100 mL de água destilada; a solução de 0,5% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,5 grama do sal em 100 mL de água destilada e, no preparo da solução de 0,25%, dissolveu-se 0,25 grama do sal em 100 mL de água destilada.

Em uma parte das amostras foi incorporada a solução de tripolifosfato de sódio (TPP), pH 8,48, na concentração de 1% por um período de 15 minutos. Em outra parte das amostras, foi incorporada a solução de TPP, com mesmo pH e na concentração de 0,5% por 30 minutos, e em outras amostras de filmes foi incorporada à solução de 0,25% por um período de 15 minutos e 30 minutos. Sequencialmente, as amostras foram lavadas em água destilada sendo, posteriormente, colocadas para secar à temperatura ambiente (23°C).

3.5 Caracterização

Os filmes e *scaffolds* de quitosana, sem e com a droga vegetal incorporada em diferentes concentrações, desenvolvidos na fase exploratória, foram

caracterizados pelas técnicas de Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Grau de Intumescimento com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Nessa fase ainda foi observado o aspecto macroscópico das amostras produzidas, sendo verificados também os resultados dos processos de neutralização com NH_4OH e de reticulação com TPP.

Na fase investigativa, os *scaffolds* sem e com a incorporação da droga vegetal em diferentes concentrações, foram caracterizados pelas técnicas de Microscopia Ótica (MO), Teste de Molhabilidade, Teste de Compressão, Análise Termogravimétrica (TG), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Grau de Intumescimento com PBS e saliva artificial e Ensaio de Biodegradação Enzimática. As análises foram realizadas no CERTBIO / UFCG.

3.5.1 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite caracterizar bandas de absorção importantes de qualquer composto, sendo uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização da estrutura de polímeros (Brugnerotto *et al.*, 2001).

Essa técnica está baseada nas transições de estados vibracionais e pode monitorar a absorção de todas as ligações químicas de uma molécula, que tem uma vibração associada para cada ligação. A espectroscopia no infravermelho consiste de uma radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético passando através da amostra. Parte desta radiação é absorvida pela amostra e parte é transmitida. Desse modo, o espectro resultante pode ser expresso em tempos da absorção ou da transmissão, criando uma impressão digital molecular da amostra (Kawano, 2007).

Todas as amostras foram caracterizadas por Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), sendo essa análise realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 da Perkin Elmer FTIR/FTNIR *Spectrometer* com varredura entre 4000 a 400 cm^{-1} .

3.5.2 Difração de Raios X (DRX)

A Difração de raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica de Difração de Raios X é frequentemente usada para determinar a cristalinidade em polímeros. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (Kahn, 2015).

No presente estudo, a técnica de DRX foi empregada para determinar o grau de cristalinidade das amostras, sendo as mesmas submetidas à análise por Difração de Raios X (DRX), através de um Difratorômetro de Raios X Shimadzu, modelo XRD 7000, à temperatura ambiente, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), com varredura angular de $5^\circ < 2\theta < 45^\circ$, tensão de 40kV e corrente 30mA.

Para determinação da cristalinidade das amostras foi utilizado comandos opcionais do software Standard do equipamento Shimadzu, o qual determina a porcentagem de cristalinidade pela relação das áreas de fases cristalina e não cristalina, com um ajuste pelo coeficiente de correção de Lorentz.

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para a compreensão do comportamento de superfícies (Fook, 2005; Fidéles, 2010).

A caracterização por MEV foi realizada no equipamento modelo Phenom Pro X, acoplado com sistema para microanálise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS, sendo realizadas imagens usando aumentos de 150x, 500x e 1000x.

3.5.4 Grau de Intumescimento

Esse ensaio teve como objetivo avaliar o comportamento do material quando imerso em uma solução com características semelhantes ao meio interno do organismo. Trata-se de um experimento de grande importância uma vez que a

absorção de líquido pelo material pode ser um fator importante na liberação do fármaco (Cruz, 2015).

Para execução do ensaio, foram cortados, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 24 da Embramac®, 5 cubos com aresta aproximada de 0,5 cm dos scaffolds de quitosana e quitosana com a droga vegetal incorporada nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, tendo suas dimensões verificadas com o auxílio do paquímetro digital. Cada cubo ficou com uma área de superfície de 1,5 cm² e com o volume de 0,125 cm³. Os filmes foram cortados com o auxílio de uma tesoura na dimensão de 1,0 x 1,0 cm. Após cortadas, as amostras foram colocadas na estufa microprocessada para cultura bacteriológica STERILIFER, a uma temperatura de 50°C, por um período de 30 minutos, a fim de reduzir a umidade das amostras. Cada amostra foi então devidamente pesada, a seco, em balança analítica de precisão da BEL ENGINEERING, sob nº 11.05.03, antes da imersão em solução de PBS.

Na fase exploratória, foram avaliadas amostras de filmes e *scaffolds* em PBS. Após determinada a metodologia a ser empregada, foram avaliados, na análise de intumescimento, *scaffolds* em PBS e em saliva artificial.

O PBS empregado foi o da Sigma Aldrich, sob número de referência P4417 – 50TAB, sendo a solução preparada dissolvendo-se em 600 mL de água destilada, 3 tabletes do PBS até a completa homogeneização. Cada amostra foi imersa em 6 mL da solução de PBS e de saliva artificial, por um período de 24 h. Em sequência, foram removidas das soluções, secas ligeiramente em papel absorvente para eliminar o excesso da solução, e o peso úmido de cada fragmento foi medido na mesma balança.

A saliva artificial utilizada no presente estudo era composta por cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio hexaidratado, cloreto de cálcio dihidratado, fosfato de potássio monobásico, carmelose sódica, solução de sorbitol a 70% (p/p), solução conservante de parabenos, flavorizante de menta qs, solução de ácido cítrico (25% a 50%) qs com pH 6,0 - 7,0 e água purificada qsp.

O cálculo do grau de intumescimento foi realizado segundo a equação 1.

$$GI = \frac{M_f - M_0}{M_0}$$

Onde: GI - Grau de intumescimento (1)
M_f - Massa final (intumescida)
M₀ - Massa seca

3.5.5 Microscopia Ótica (MO)

A caracterização por MO, para avaliação morfológica dos *scaffolds*, foi realizada em um Microscópio Óptico Digital Hirox Modelo KH-1300, de reflexão e transmissão, com canhão MX(G)2016Z e aumentos de 40x e 80x, acoplado a uma estação de Análise de Imagens, empregando-se o software 2D Measure. A análise foi realizada nas superfícies em contato com o ar, em contato com a placa e na superfície transversal das amostras.

3.5.6 Teste de Molhabilidade

O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Figura 18.

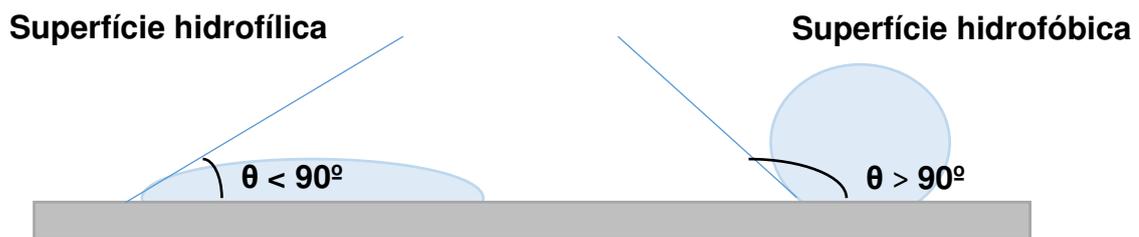


Figura 18 – Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície (Autor, 2016).

A medição do ângulo de contato é um indicador da ação de molhamento de toda substância testada. Um baixo valor de ângulo de contato indica que o líquido molha bem, considerando que um alto valor indica um pior molhamento. A partir disto, tem sido relatado (Kontakiotis *et al.*, 2007; Luz, Ribeiro e Pandolfelli, 2008), que se o valor do ângulo de contato é menor de 90° o líquido molha a superfície; se é maior que 90° não houve molhamento e um ângulo de contato igual a zero representa completo molhamento.

Luz, Ribeiro e Pandolfelli (2008) relatam que os valores experimentais do ângulo de contato podem ser obtidos a partir das medidas diretas da tangente da gota líquida com a superfície sólida do substrato.

Para a realização do ensaio, os *scaffolds* foram cortados em uma dimensão de aproximadamente 25 x 5 mm, sendo empregado um goniômetro (Figura 19)

desenvolvido por alguns pesquisadores do CERTBIO, e que encontra-se instalado no Laboratório de Ensaio Mecânicos do CERTBIO / UFCG.

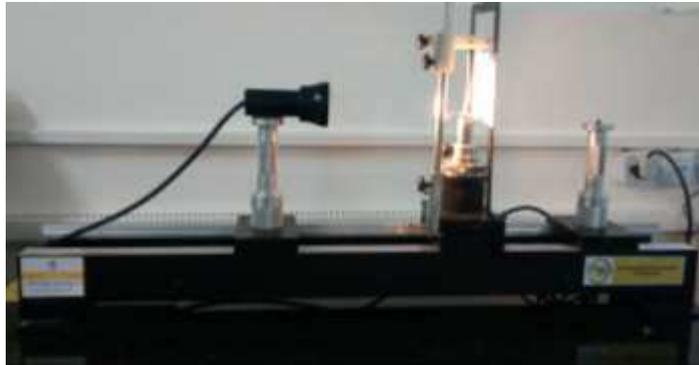


Figura 19 – Goniômetro, CERTBIO / UFCG (Autor, 2016).

A técnica aqui empregada consiste no cálculo da tensão superficial dos *scaffolds* de quitosana, com diferentes concentrações da droga vegetal incorporada, baseada na análise do formato da gota, sendo avaliadas tanto a superfície das amostras em contato com o ar, como a superfície em contato com a placa de Petri. Inicialmente encheu-se a pipeta com água destilada esterilizada, conservando-se o instrumento na posição vertical através de um suporte (Figura 20). Colocou-se um volume não definido de água destilada na pipeta e deixou-se pingar uma gota no material ensaiado. Esse procedimento foi repetido em triplicata para cada variável, sendo realizadas imagens fotográficas em sequência, as quais foram enviadas para o programa Angle Calculator que calculou o ângulo da gota formada, verificando assim se o material é hidrofílico ou hidrofóbico.



Figura 20 – Análise de molhabilidade dos *scaffolds* de quitosana: amostra no suporte (a), gotejamento da água destilada (b), obtenção da fotografia da gota (c) (Autor, 2016).

O ângulo de molhabilidade entre a gota de água destilada com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fazem a gota se espalhar sobre a superfície (Cardoso *et al.*, 2011).

3.5.7 Teste de Compressão

Esse tipo de análise é caracterizado pelo modo como os *scaffolds* respondem às solicitações mecânicas aplicadas, podendo estas ser do tipo de tensão ou deformação. A natureza desta resposta depende da estrutura química, temperatura, tempo e das condições de processamento do polímero. Os *scaffolds* podem estar sujeitos a uma variedade de tensões durante o período de uso e sabe-se que as interações entre polímeros podem influenciar e modificar as propriedades de misturas em relação aos polímeros puros (Pinheiro, 2008).

Nesse ensaio, os *scaffolds* foram previamente medidos com um paquímetro em altura e diâmetro (altura média de 6,2 mm e diâmetro médio de 28,8 mm) sendo, posteriormente, inseridos no equipamento universal de ensaios mecânicos INSTRON 3366, empregando-se dois pratos de compressão (um fixo e um móvel), com uma média de carga de 10KN, velocidade do travessão de 1,3 mm/min e uma deformação do corpo de prova de 90% (Figura 21).

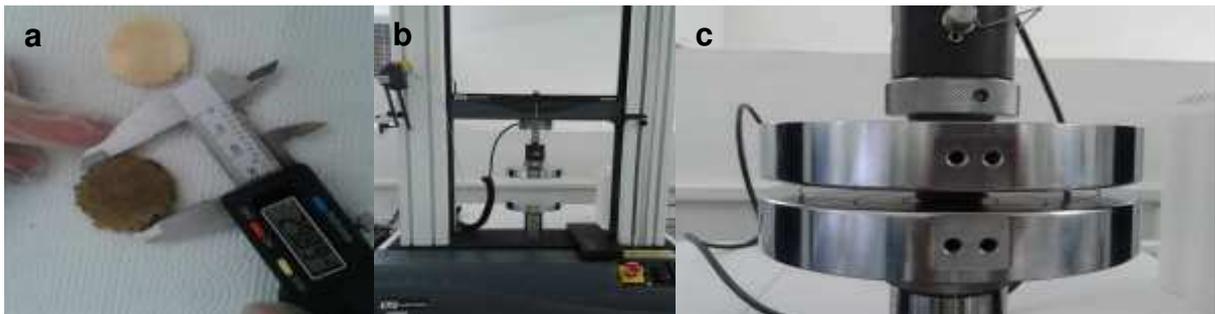


Figura 21 – Medição das amostras (a), Equipamento INSTRON 3366 (b), Teste de compressão (c) (Autor, 2016).

3.5.8 Análise Térmica

3.5.8.1 Análise Termogravimétrica (TG)

A termogravimetria é uma das técnicas de análise térmica que permite a avaliação da variação de massa de uma substância em função do tempo ou temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Possui diversas aplicações inclusive na indústria farmacêutica na avaliação da estabilidade térmica dos fármacos, fases de decomposição dos mesmos entre outras (Ionashiro *et al.*, 2008).

A DTG (derivada primeira da curva termogravimétrica, em função da temperatura ou tempo) é um tratamento matemático da curva termogravimétrica, auxiliando na interpretação da curva não só nas temperaturas inicial e final de decomposição como também na maior resolução do número de etapas em que a substância é decomposta (Ionashiro *et al.*, 1988).

As curvas de TG dos scaffolds foram obtidas por meio de Equipamento PYRIS TGA 01 da PerkinElmer, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 20 mL/min, sendo a massa das amostras em torno de 4,0 mg, acondicionadas em cadinho de alumina, com variação de temperatura de 25°C a 400°C/min, e razão de aquecimento de 10°C/min.

3.5.8.2 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica bastante utilizada para a obtenção de informações sobre as temperaturas de transição dos materiais como a temperatura de transição vítrea, a temperatura de cristalização e a temperatura de fusão cristalina (Dallan, 2005).

As análises de DSC deste experimento foram realizadas em equipamento DSC 8500 da PerkinElmer, o qual permitiu o cálculo do ΔH (variação da entalpia de transformação da reação), ou seja, mediu a quantidade de calor liberada ou absorvida durante a mudança de fase das amostras analisadas.

Foi empregada a atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, usando amostras com massa em torno de 1840 mg, acondicionadas em cadinho de alumina, com a temperatura variando de 25°C a 400°C/min e razão de

aquecimento de 10°C/min.

3.5.9 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Este ensaio foi realizado com base nas normas ASTM F1635-04 Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2009) e a ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications (2007).

Para a realização desse ensaio, os *scaffolds* foram cortados na dimensão de 1,0 cm², pesados em balança analítica sendo em seguida isolados em recipientes plásticos. As amostras foram divididas em três grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de PBS com pH 7,39, o segundo contendo uma solução de PBS/Lizosima com pH 7,29 e o terceiro grupo contendo saliva artificial com pH 6,76.

Foram utilizadas seis amostras de cada *scaffold* de quitosana e quitosana com diferentes concentrações de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, tanto para o tampão PBS, como para a solução de PBS/Lizosima e para a saliva artificial resultando em 270 amostras, as quais foram imersas em 6 mL (quantidade suficiente para recobrir a amostra) de cada solução e avaliadas nos períodos de 7, 14 e 21 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – Grupos de amostras para degradação enzimática *in vitro*.

Scaffolds	Período								
	7 Dias			14 Dias			21 Dias		
	PBS	PBS/ Lizosima	Saliva artificial	PBS	PBS/ Lizosima	Saliva artificial	PBS	PBS/ Lizosima	Saliva artificial
SQ	06*	06	06	06	06	06	06	06	06
SQ5	06	06	06	06	06	06	06	06	06
SQ10	06	06	06	06	06	06	06	06	06
SQ15	06	06	06	06	06	06	06	06	06
SQ20	06	06	06	06	06	06	06	06	06

*Número de amostras

Os *scaffolds* foram pesados em balança analítica, imersos nas soluções e colocados na estufa a 37°C. Ao final de 7 dias, foi removido o 1º grupo, sendo as amostras lavadas em água destilada, colocadas no ultra-freezer 490 L, de ultra baixa temperatura da AmericanLab, a uma temperatura de -70°C por 24 horas, e, em seguida, no liofilizador L108 LIOTOP por 48 horas sendo, posteriormente, pesadas em balança analítica. Nos segundo e terceiro grupos, as soluções de PBS, PBS/Lisozima e saliva artificial foram trocadas por novas soluções com a mesma composição e concentração e novamente acondicionados na estufa à mesma temperatura. Após 14 dias, o segundo lote foi removido da estufa, passando pela mesma sequência de procedimentos. As soluções (PBS, PBS/Lisozima e saliva artificial) do 3º lote foram trocadas por novas soluções e novamente as amostras foram acondicionadas na estufa por mais 7 dias. Após 21 dias, as amostras do 3º lote também foram lavadas em água destilada, colocadas no ultra-freezer, no liofilizador e pesadas em balança analítica.

As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação dos *scaffolds*, observados a partir da média de ensaios repetidos nas seis amostras.

O cálculo da perda de massa foi determinado pela equação 2, expressa abaixo:

$$PM = \frac{M_i - M_f}{M_f} \quad \text{Onde: PM - Perda de massa} \quad (2)$$

M_i - Massa inicial (g)
 M_f - Massa final (g)

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através das medidas estatísticas: média, desvio padrão e mediana; e inferencialmente através dos testes estatísticos: Wilcoxon para dados pareados na comparação entre as avaliações; Kruskal-Wallis para a comparação entre concentrações e no caso de diferenças significativas com comparações do referido teste; e teste Mann-Whitney para a comparação entre o filme e o *scaffold* ou entre as soluções empregadas no processo de neutralização. Destaca-se que a escolha dos testes não paramétricos foi devido ao número de amostras em cada grupo.

O programa utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 21. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi 5,0%.

O software Origin[®], versão 8.0 também foi empregado na construção de alguns gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da Fase Exploratória

4.1.1 Aspecto macroscópico dos filmes e scaffolds de quitosana sem e com a droga vegetal incorporada

Os filmes de quitosana obtidos, macroscopicamente, apresentaram coloração clara, aspecto homogêneo e flexível (Figura 22a), corroborando com os resultados encontrados por Holanda (2011); além de um aspecto liso, plano e uniforme. À medida em que a droga vegetal foi incorporada em diferentes concentrações, os filmes tornaram-se esverdeados, assumindo a coloração do EAB (Figura 22b), contrastando dessa forma com a coloração clara do filme de quitosana. Os FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20 apresentaram aspectos macroscópicos semelhantes, com uma coloração mais acentuada à medida em que a droga vegetal foi incorporada.

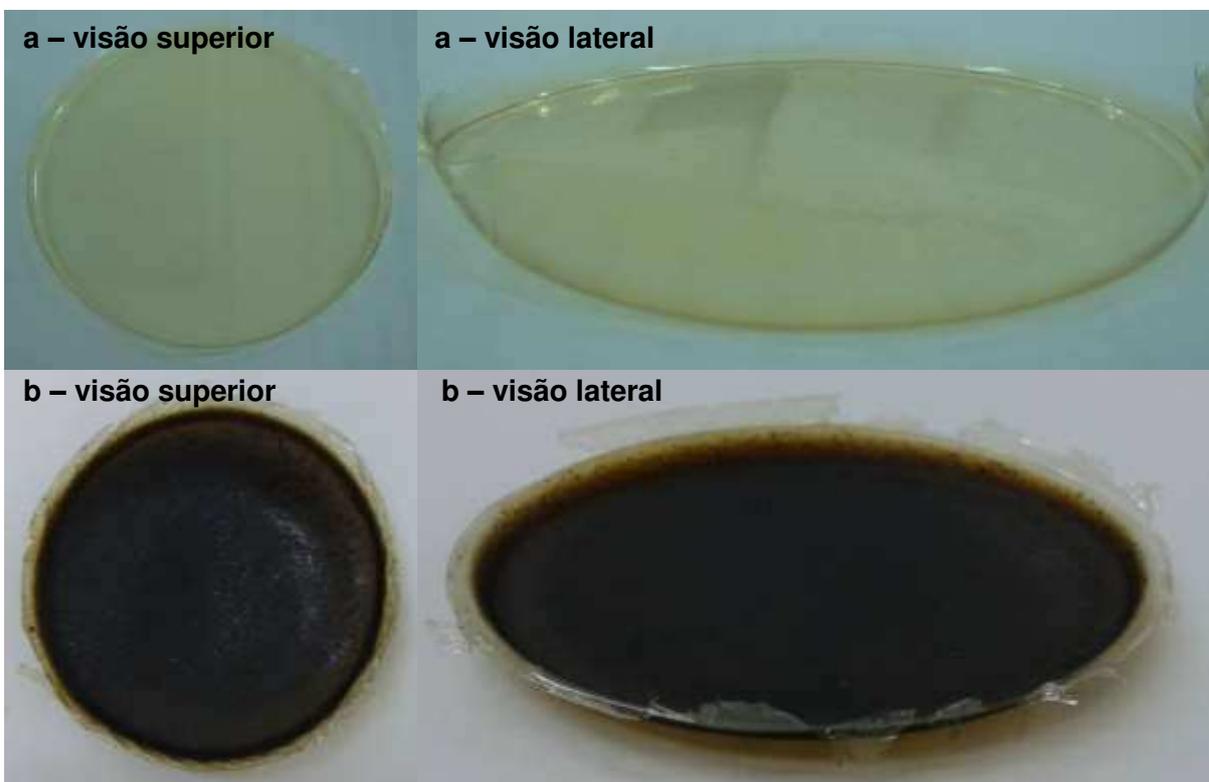


Figura 22 – Aspecto macroscópico do FQ (a), FQ20 (b) (Autor, 2016).

Em virtude desse perfil semelhante entre as amostras, ao longo do trabalho são demonstrados os resultados das amostras com menor concentração (5%) e com maior concentração (20%), da droga vegetal incorporada.

Os *scaffolds* de quitosana, macroscopicamente, apresentaram-se como estruturas com superfície irregular, corroborando com os resultados encontrados por Cruz (2015). Assim como nos filmes, com a incorporação da droga vegetal, os *scaffolds* assumiram uma coloração esverdeada. Na Figura 23 é possível observar o aspecto macroscópico da superfície do SQ, em contato com o ar (a), em contato com a placa (b) e de corte transversal (c). De igual modo, na Figura 24, evidencia-se os mesmos aspectos no SQ20.

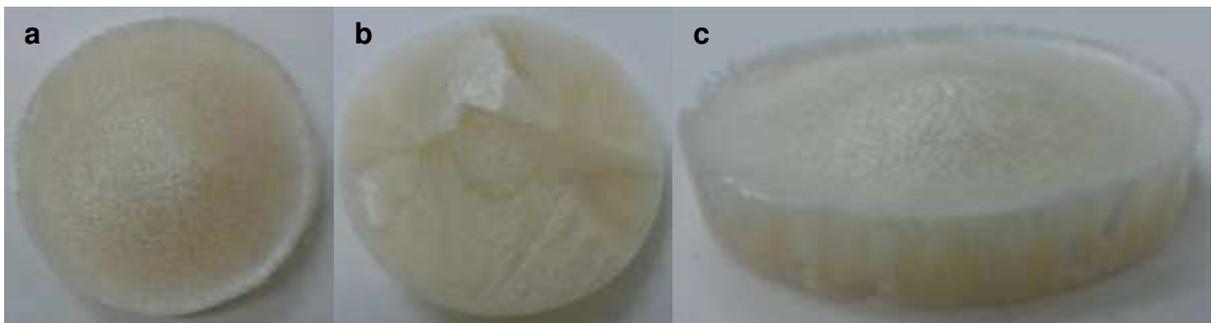


Figura 23 – Aspecto macroscópico do SQ - superfície em contato com o ar (a), em contato com a placa (b) e de corte transversal (c) (Autor, 2016).

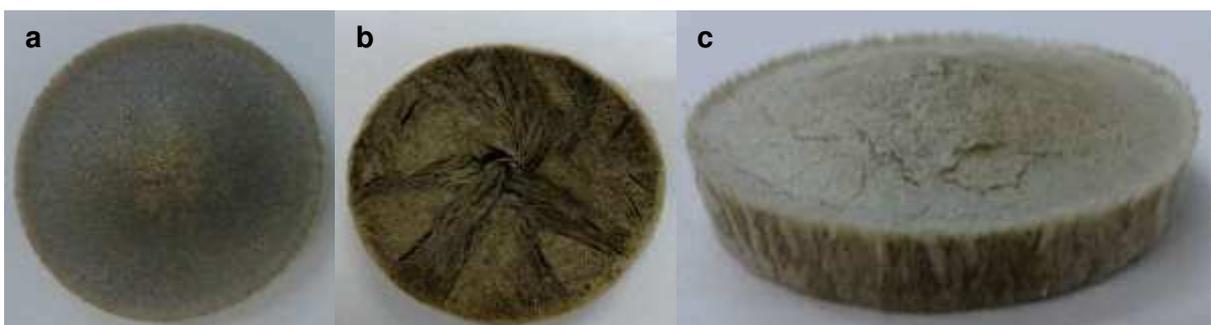


Figura 24 – Aspecto macroscópico do SQ20 - superfície em contato com o ar (a), em contato com a placa (b) e de corte transversal (c) (Autor, 2016).

Apesar do caráter subjetivo, utilizando-se uma propriedade organoléptica (olfato), percebeu-se que tanto os filmes como os *scaffolds* que continham *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis apresentaram um odor característico dessa droga vegetal.

4.1.2 Neutralização das amostras com Hidróxido de Amônio

Após o processo de neutralização das amostras com hidróxido de amônio observou-se que a solução de NH_4OH que continha os filmes com 5% e 10% da droga vegetal ficou com a coloração alterada, sendo essa alteração de coloração mais evidente ainda na solução que continha os filmes com 15% e 20%. Essa alteração de coloração não foi percebida nas soluções que continham os *scaffolds* com 5%, 10%, 15% e 20% da droga vegetal incorporada (Figura 25).



Figura 25 – Aspecto das soluções de hidróxido de amônio após o processo de neutralização (Autor, 2016).

Uma das características que ficou claramente evidente foi a diferença de tamanho entre os *scaffolds* SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20 antes e após o processo de neutralização com NH_4OH , observando-se as diferenças de volumes entre estas duas condições (Figura 26).

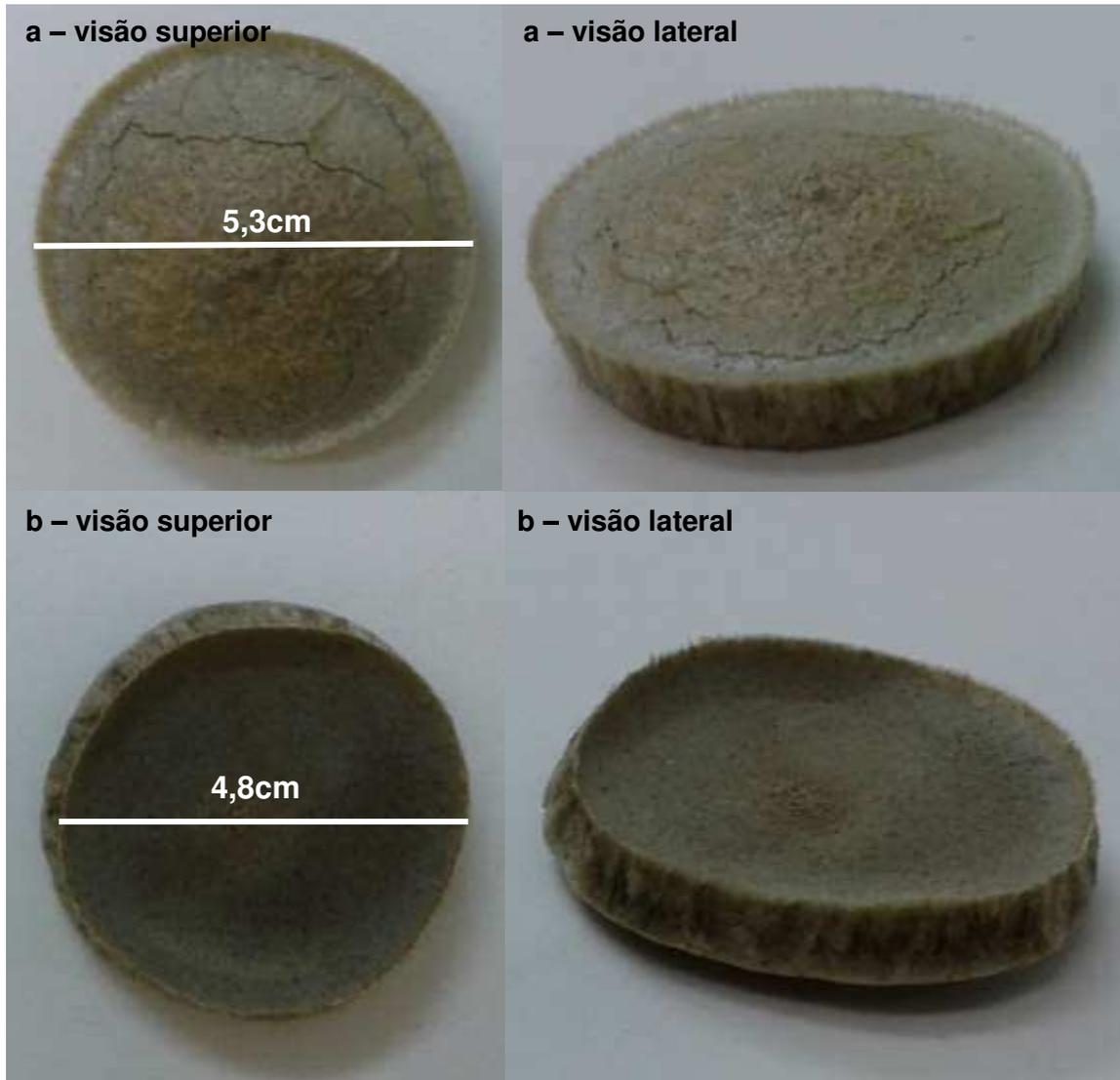


Figura 26 – Aspectos macroscópicos dos SQ20 antes (a) e após (b) o processo de neutralização com NH_4OH (Autor, 2016).

Através da medida de massa (g) e o cálculo dos volumes (cm^3) e densidades (g/cm^3) dos filmes e *scaffolds* (Equação 3 e 4) foi possível demonstrar que as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas antes do que após o processo de neutralização com NH_4OH , havendo uma redução do volume dos mesmos com conseqüente aumento de densidade.

(3) - Cálculo do Volume

$$V = \pi r^2 \times h$$

onde:

V – volume (cm^3)

r – raio (cm)

h – espessura (cm)

(4) - Cálculo da Densidade

$$D = m/v$$

onde:

D – densidade (g/cm^3)

m – massa (g)

v – volume (cm^3)

Nas Figuras 27 a 32 estão descritos os resultados da massa, volume e densidade das amostras segundo o tipo de neutralização (NH_4OH), concentração da droga vegetal incorporada e concentração antes e depois da neutralização, bem como a diferença entre as duas avaliações.

As Figuras 27 e 28 destacam que as médias da massa foram correspondentemente mais elevadas antes do que após o processo de neutralização, tanto nos filmes como nos *scaffolds*. E que, quanto maior a incorporação da droga vegetal à quitosana, maior era a perda de massa.

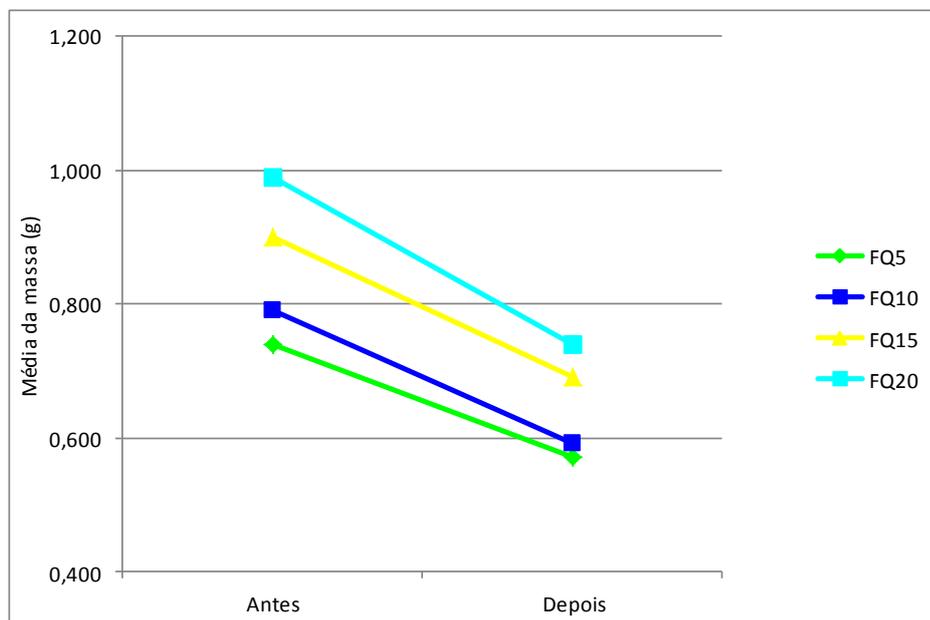


Figura 27 – Médias da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).

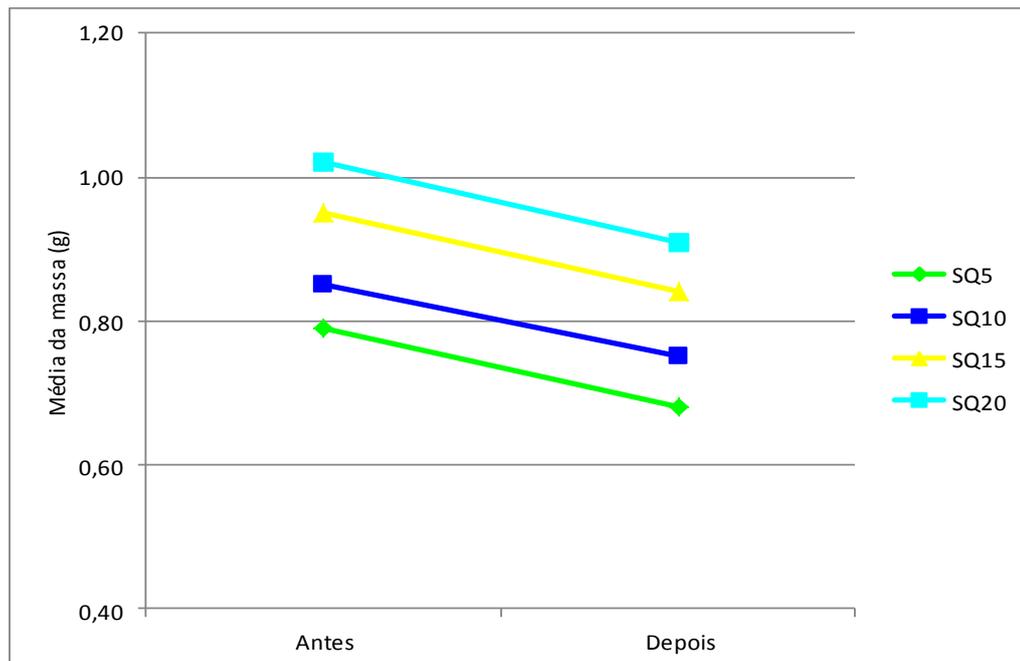


Figura 28 – Médias da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos *scaffolds* (Autor, 2016).

As diferenças absolutas das médias variaram de 0,17 g a 0,25 g nos filmes, e de 0,10 g a 0,11 g nos *scaffolds*, entretanto sem diferenças significativas entre as duas avaliações para cada tipo (filme ou *scaffold*) e concentração ($p > 0,05$). Foram registrados aumentos dos valores das médias com o aumento da concentração em cada uma das avaliações tanto no filme quanto no *scaffold*, sendo verificadas diferenças significativas entre as concentrações em cada tipo e avaliação ($p \leq 0,05$). Através dos testes de comparações múltiplas (entre pares de concentrações), com exceção das concentrações de 5% e 10% na avaliação, comprova-se diferenças significativas entre todos os demais pares em cada avaliação e tipo. As médias dos *scaffolds* foram correspondentemente mais elevadas do que as médias do filme em cada avaliação, entretanto, a única diferença significativa ($p < 0,001$) entre filme e *scaffold* foi registrada na variável diferença absoluta (variação) na concentração de 20% (Apêndice A).

As Figuras 29 e 30 mostram que as médias do volume foram correspondentemente mais elevadas na avaliação antes do que após o processo de neutralização em cada concentração e avaliação, entretanto sem diferenças significativas entre as duas avaliações ($p > 0,05$).

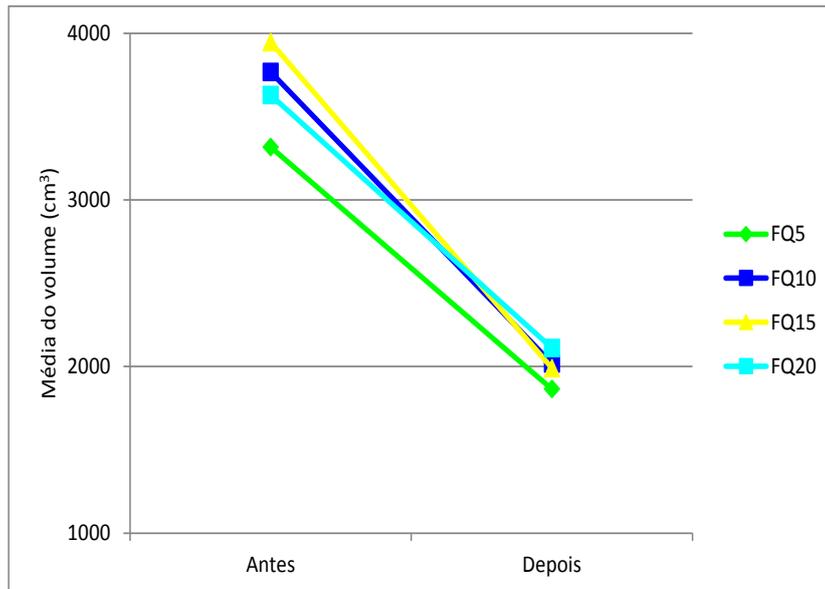


Figura 29 – Médias do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).

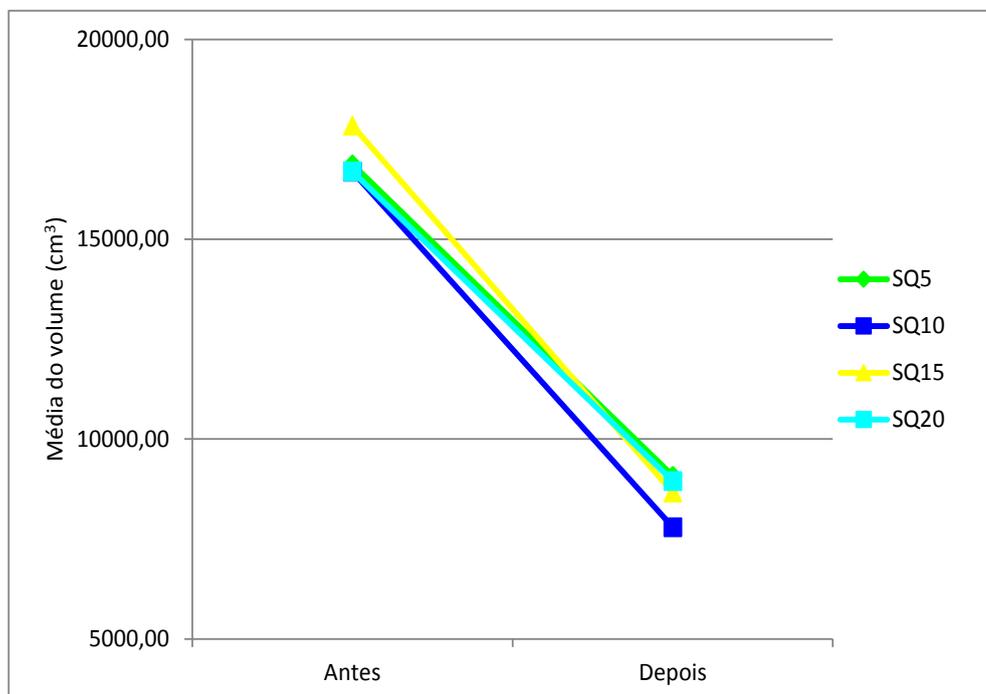


Figura 30 – Médias do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos *scaffolds* (Autor, 2016).

Não foram registradas diferenças significativas entre as concentrações em nenhuma das avaliações e nem para a variável diferença absoluta ($p > 0,05$). As médias foram correspondentemente mais elevadas para o *scaffold* do que para o filme com diferenças significativas entre filme e *scaffold* para cada concentração e avaliação. Na variável diferença absoluta (variação ou redução), as médias foram correspondentemente mais elevadas no *scaffold* do que no filme, com diferenças significativas entre filme e *scaffold* em cada concentração ($p \leq 0,05$) (Apêndice B).

Cruz (2015) também verificou redução do volume dos *scaffolds* desenvolvidos, mas em seu trabalho esse fato deveu-se à ação reticuladora do tripolifosfato nos *scaffolds* de quitosana e quitosana/fármaco.

As médias da densidade foram correspondentemente mais elevadas nas avaliações após o processo de neutralização, entretanto sem diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figuras 31 e 32).

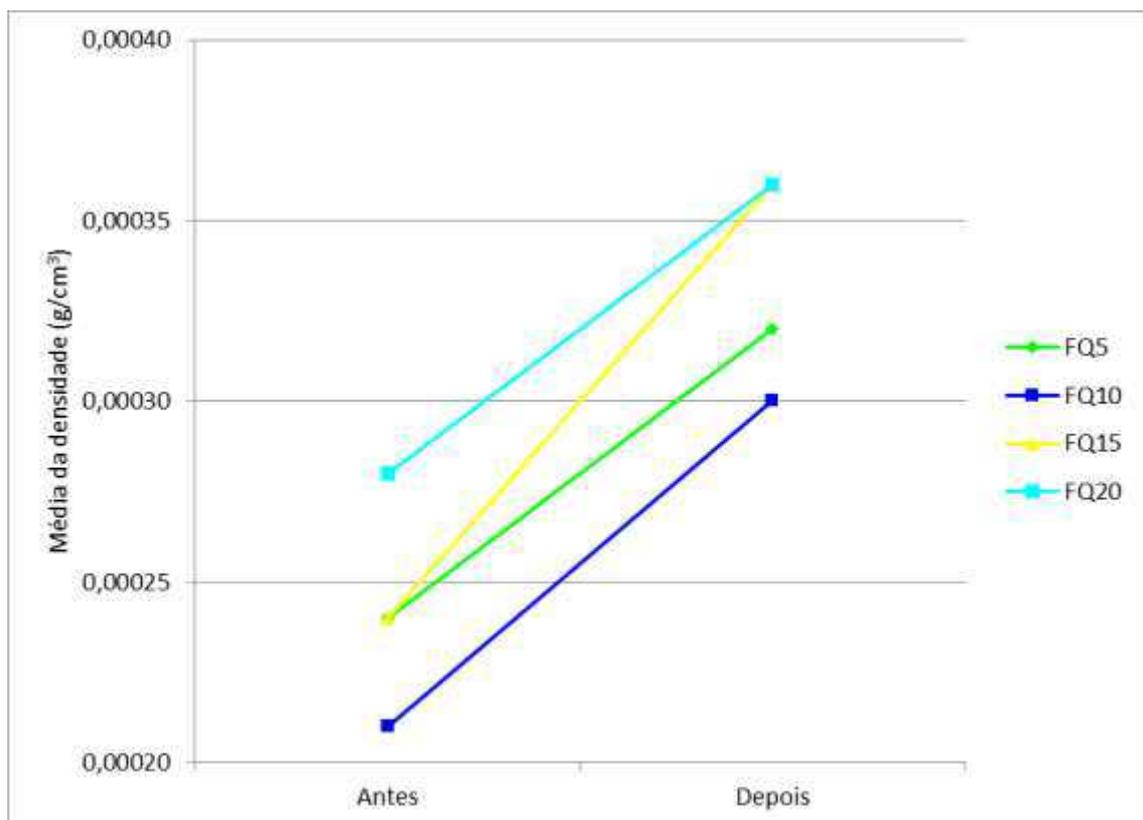


Figura 31 – Médias da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes (Autor, 2016).

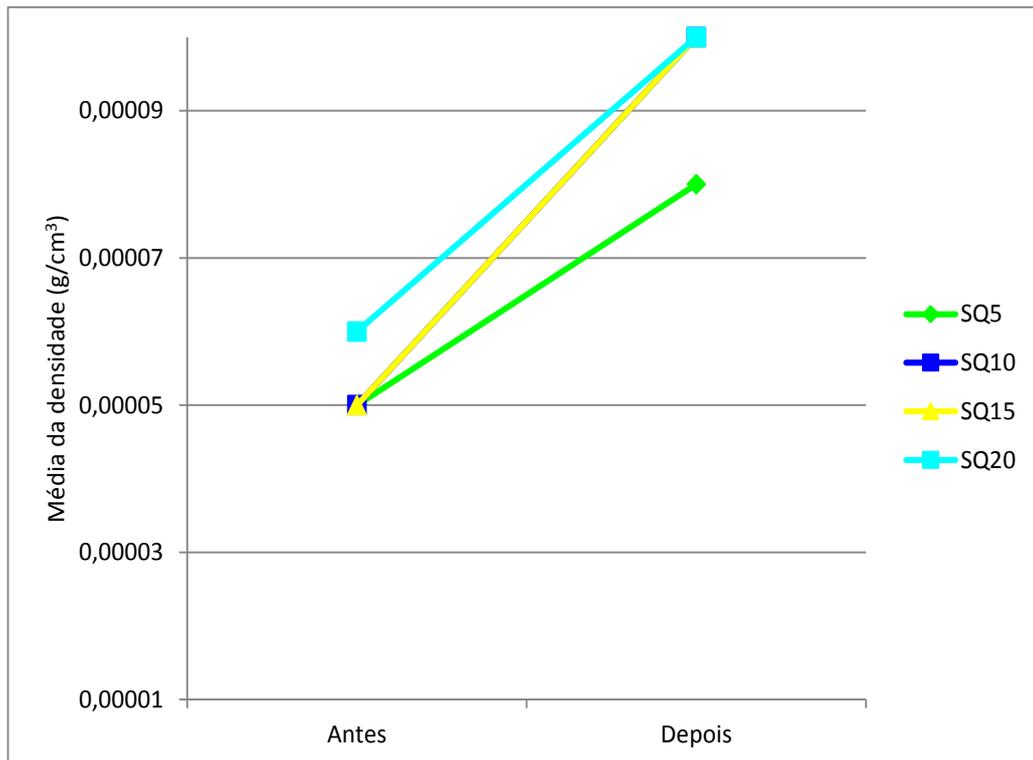


Figura 32 – Médias da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos *scaffolds* (Autor, 2016).

As médias da densidade oscilaram de $0,00024 \text{ g/cm}^3$ a $0,00036 \text{ g/cm}^3$ no filme e de $0,00005 \text{ g/cm}^3$ a $0,00010 \text{ g/cm}^3$ no *scaffold*, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações em cada tipo, em nenhuma das variáveis analisadas. As médias da densidade foram correspondentemente mais elevadas no filme do que no *scaffold*, diferenças estas que se mostraram significativas entre os tipos em cada uma das avaliações. A única diferença significativa entre as concentrações na variável diferença absoluta ocorreu na concentração de 10% e, para a referida variável se verifica que a média foi mais elevada no filme do que no *scaffold* ($0,00009 \text{ g/cm}^3 \times 0,0005 \text{ g/cm}^3$) (Apêndice C).

4.1.3 Reticulação com TPP

Quanto ao processo de reticulação dos filmes evidenciou-se que, em contato com o TPP, todas as amostras sofreram grande processo de reticulação, tornando-se frágeis, enrugados e quebradiços e, portanto, inviáveis para análise (Figura 33).



Figura 33 – Amostras de filmes de quitosana/droga vegetal em contato com o TPP na concentração de 0,5% e 1% (a) e nas concentrações de 0,25% por 15 e 30 minutos (b). Após processo de reticulação, evidencia-se o aspecto das amostras com 1% (c), 0,5% (d) e 0,25% (e) (Autor, 2016).

4.1.4 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para identificar, por meio das bandas características, os grupamentos químicos típicos de cada polímero que constituíam os filmes e *scaffolds* produzidos.

Os principais valores de faixa de absorvância de FTIR característicos da estrutura da quitosana e insulina, bem como os respectivos valores mensurados neste trabalho estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 – Principais valores de absorvência detectados nos filmes e *scaffolds* de quitosana e quitosana/insulina.

Sinal	Faixa de Absorbância	Absorções identificadas (cm ⁻¹)
Estiramento simétrico e assimétrico do grupo NH ₂	3000-3300	3550, 3525, 3500, 3294, 3277, 3224, 3305
Estiramento O-H	3500-3200	3550, 3525, 3500, 3305, 3294, 3277, 3224
Estiramento simétrico e assimétrico metila e metileno	2900-2800	2888, 2877, 2876, 2877
Estiramento C=O de amidas	1670-1640	1658, 1650, 1647, 1642, 1624
Deformação NH ₂	1640-1560	1650, 1642, 1646, 1624
Estiramento simétrico de sais de ácido carboxílico	1400	1380, 1369
Deformação simétrica C-H	1380-1370	1380, 1369
Vibrações C-O-C	1159	1161, 1153, 1149, 1110, 1064
Estiramento C-O de álcoois e fenóis	1250-1000	1031, 1029, 1027, 1024, 1020, 1012
Deformações C-H	1000-650	992

Fonte: Adaptado de Prashanth, Kittur, Tharanathan (2002), Tonhi e Plepis (2002), Fraga *et al.* (2006), Kasyap *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Kasaai (2008).

As absorções atribuídas aos grupamentos funcionais característicos de quitina e quitosana foram constatados nos filmes e *scaffolds* produzidos e os valores expressos na última coluna da Tabela 5 correspondem aos valores reais mensurados durante as análises do FTIR. Pequenos deslocamentos na constatação da absorvência das bandas, em relação às faixas de absorvências atribuídas aos sinais referidas pela literatura não invalidam a interpretação.

Foram feitas análises de FTIR do pó da quitosana (Figura 34), do pó e do extrato da droga vegetal (Figuras 35a e 35b), observando-se as principais bandas características dos materiais estudados.

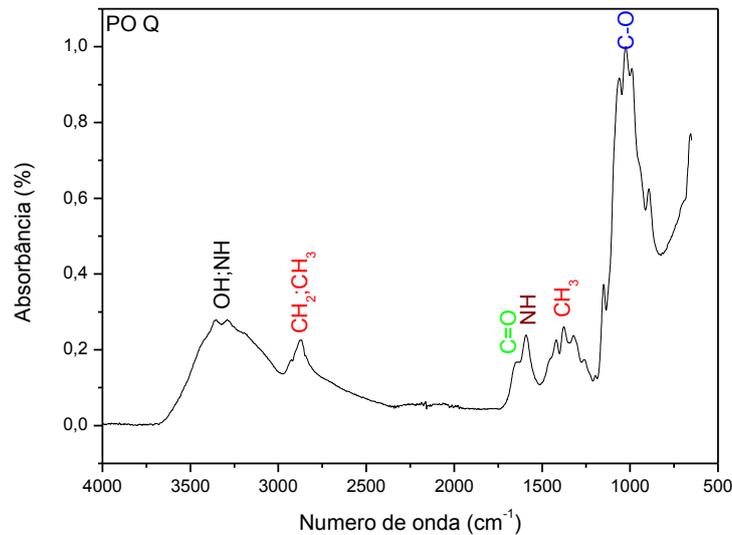


Figura 34 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da quitosana (Autor, 2016).

No espectro de infravermelho obtido do pó da quitosana é possível verificar as absorções típicas desse polímero, corroborando com os resultados encontrados na literatura. A banda de absorção em torno de 3400 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação -NH e, quase sobreposta, verifica-se o estiramento do grupo -OH presente na estrutura da quitosana na faixa 3260 cm^{-1} . As bandas em 2922 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramentos dos grupos C-H assimétrico (CH_2) e simétrico (CH_3), respectivamente. Na região de 1670 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} pode ser observada uma absorção atribuída ao estiramento C=O de amidas; e a banda em 1542 cm^{-1} corresponde à deformação da ligação -NH da amina. As bandas em 1406 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} são características da vibração de deformação angular simétrica do grupo -CH_3 pertencente ao grupo acetamido. A banda em 1258 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupo -C-O-H . Bandas de absorção na região de 1152 e 1064 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento dos grupos -C-O-C assimétrico e -C-O-C simétrico. A pequena banda em 897 cm^{-1} corresponde ao movimento de rotação da estrutura sacarídica da quitosana (Mincheva *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2010; Paluszkiwicz *et al.*, 2011).

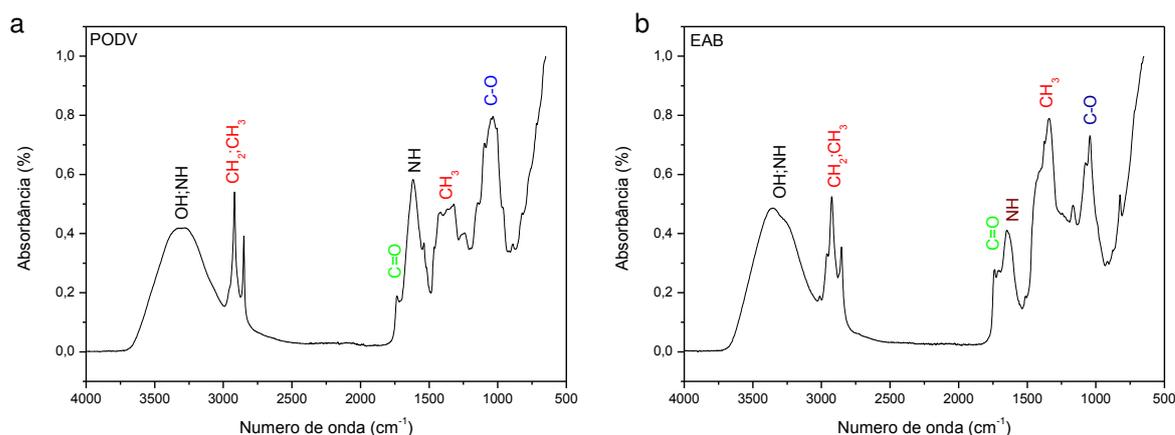


Figura 35 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da droga vegetal (a) e do EAB (b) (Autor, 2016).

Assim como no espectro do pó da quitosana, evidencia-se nos espectros do pó da droga vegetal *Cissus verticillata* (L.) e do Extrato Alcoólico Bruto dessa planta, a presença de bandas com alto grau de absorção na região de 3400 e 3500 cm^{-1} , correspondente ao agrupamento amino, o qual foi provavelmente sobreposto pelo grupo $-\text{OH}$ decorrentes da formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, sendo mais evidente no EAB do que no pó da droga vegetal. É possível observar também, em aproximadamente em 2800 cm^{-1} , uma banda que pode ser atribuída aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila. Na região de 1670 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} pode ser observada uma absorção atribuída ao estiramento C=O de amidas, mais evidente no extrato do que no pó da droga vegetal, enquanto o grupo amina $-\text{NH}$ está mais evidente no pó do que no extrato. Ainda é possível detectar as bandas em 1406 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} que são características da vibração de deformação angular simétrica do grupo $-\text{CH}_3$ sendo, nesse caso, mais evidente no extrato do que no pó da droga vegetal; e entre 1250 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} pode ocorrer uma absorção atribuída ao estiramento C-O de alcoóis e fenóis.

Lembrando que embora o pó da planta contenha centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Assim sendo, o extrato da droga vegetal apresenta os compostos ativos que foram extraídos da planta e que desenvolvem ação farmacológica sendo, por esse motivo, incorporado aos filmes e *scaffolds* de quitosana.

Na Figura 36 (a) é possível observar o espectro do FQ neutralizado com NH_4OH . À medida em que a droga vegetal foi incorporada, evidenciou-se um aumento significativo nas bandas em torno de 2800 cm^{-1} e entre 1406 e 1379 cm^{-1} , além de um estreitamento da banda de absorção localizada na região de 3400 e 3500 cm^{-1} que conseqüentemente, sofreu um aumento da sua absorbância. Este evento pode estar relacionado ao fato de que a droga vegetal contém os mesmos grupos funcionais nesta faixa de absorbância, ocorrendo assim, aumento na intensidade desta banda devido ao aumento da concentração de grupos O-H., demonstrando assim a incorporação da droga vegetal na quitosana. Os FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20 apresentaram espectros com perfis semelhantes (Apêndice D), tendo sido demonstrado na Figura 36 (b) o espectro do FQ20.

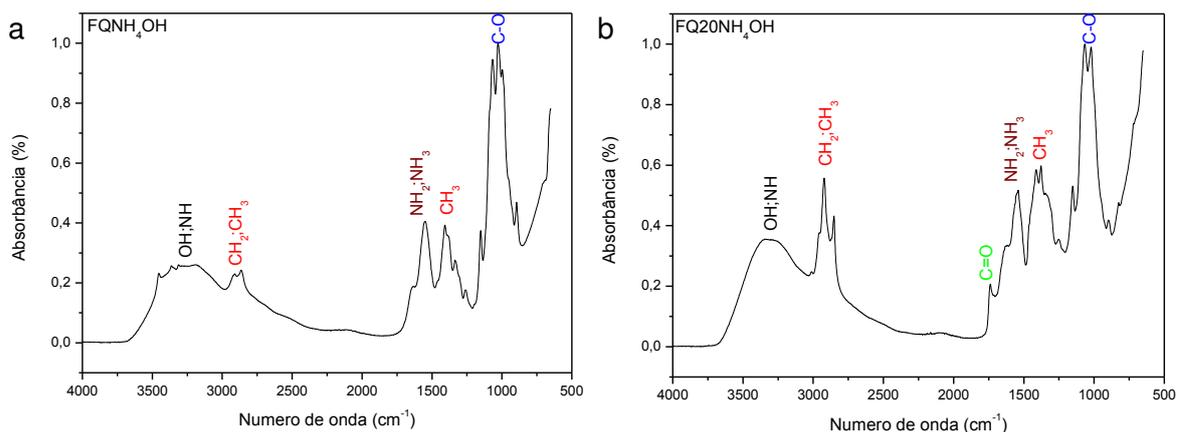


Figura 36 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do FQ (a) e FQ20 (b), neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).

As bandas 1640 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} , respectivamente, correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. Para Arof e Osman (2003), a existência dessas duas bandas (C=O e N-H), conjuntamente, indicam a presença de grupos amidas uma vez que a quitosana não está 100% desacetilada.

Da mesma forma, a banda na região de 1379 cm^{-1} é característica da vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil (CH_3) do grupo acetamido, dados que confirmam que a quitosana utilizada neste estudo é um produto parcialmente desacetilado (Sionkowska *et al.*, 2004).

Analisando-se o FTIR do SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20 percebe-se que essas amostras apresentaram um comportamento semelhante ao dos filmes produzidos, e espectros com perfis semelhantes entre si (Apêndice E). Um dado relevante é que, à medida em que a droga vegetal foi sendo incorporada, ocorreu gradativamente um estreitamento da banda de absorção localizada na região de 3400 e 3500 cm^{-1} que, conseqüentemente, teve a sua absorbância aumentada, demonstrando a incorporação da droga vegetal à quitosana. Em 2800 cm^{-1} verifica-se também um aumento da banda, mas no SQ20 esse aumento é menor quando comparado com o FQ20 (Figura 37).

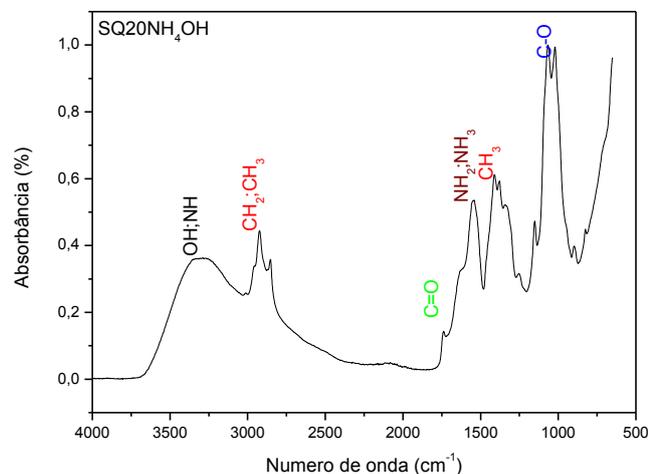


Figura 37 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do SQ20, neutralizado com NH_4OH (Autor, 2016).

Características semelhantes foram verificadas com as amostras neutralizadas com NaOH . Os espectros do FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20 apresentaram um perfil semelhante (Apêndice F). As Figuras 38a e 38b demonstram os espectros dos FQ e FQ20, respectivamente. O espectro de infravermelho obtido dessas amostras, demonstrou uma banda de absorção em torno de 3400 cm^{-1} . Este resultado corrobora com os encontrados por Fidèles (2010) e Holanda (2011) em seus estudos, que observaram em seus espectros bandas de estiramento entre 3400 a 3500 cm^{-1} e atribuíram a vibrações de estiramentos dos grupos funcionais O-H e N-H, assim como às ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias de polissacarídeos.

À medida em que a droga vegetal foi incorporada nos filmes, houve um aumento significativo nas bandas em 2800 cm^{-1} , em 1542 cm^{-1} correspondendo à

deformação de grupos NH_2 e NH_3 , e entre 1406 e 1379 cm^{-1} . Entretanto, não percebe-se o estreitamento da banda de absorção localizada na região de 3400 e 3500 cm^{-1} , tão evidente nas amostras neutralizadas com NH_4OH . A Figura 38 (b) mostra o espectro do FQ20, no qual constatou-se ainda a absorção atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ de amidas na região de 1670 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} .

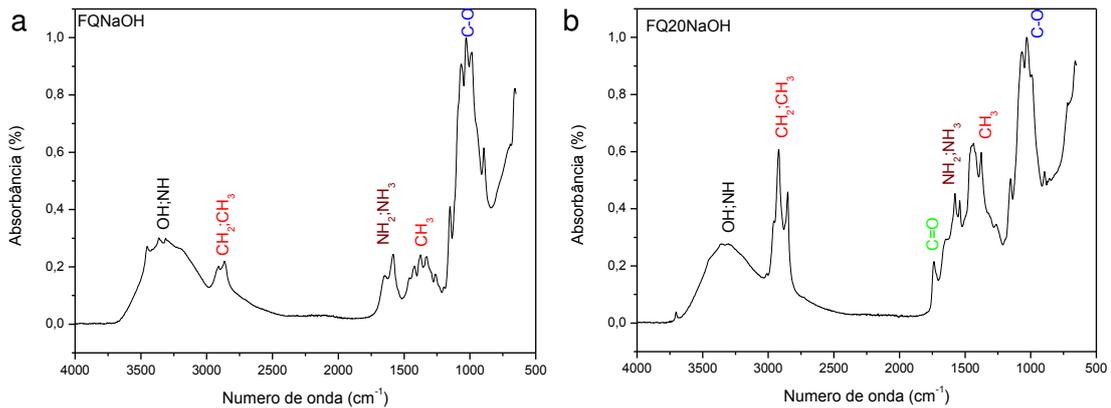


Figura 38 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do FQ (a) e FQ20 (b), neutralizados com NaOH (Autor, 2016).

Analisando-se os espectros do SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, neutralizados com NaOH, observou-se um comportamento semelhante entre os mesmos (Apêndice G) entretanto, no SQ20 ficou evidente um aumento nas bandas localizadas em 1542 cm^{-1} correspondendo à deformação de grupos NH_2 e NH_3 , e entre 1406 e 1379 cm^{-1} equivalente à vibração de deformação angular simétrica do grupo $-\text{CH}_3$ (Figura 39).

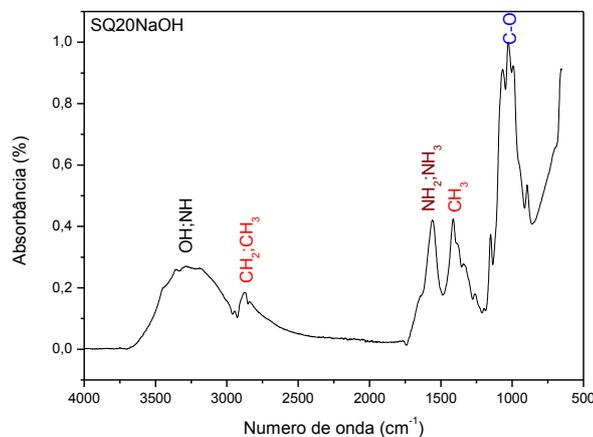


Figura 39 – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do SQ20, neutralizado com NaOH (Autor, 2016).

Assim como no FQ20 e SQ20 neutralizados com NH_4OH , nas amostras correspondentes neutralizadas com NaOH , verificou-se também um aumento da banda em 2800 cm^{-1} , equivalente aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila, mas no SQ20 esse aumento é menor quando comparado com o FQ20.

4.1.5 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 40 é possível observar o difratograma do pó da quitosana que apresenta picos típicos de materiais semicristalinos, sendo observado um pico de base larga bem definido $2\theta = 20^\circ$, e um outro pico menos definido em $2\theta = 10^\circ$ corroborando com os resultados encontrados por Dallan (2005), Xu *et al.* (2005), Lima (2010), Luo *et al.* (2011) e Cruz (2015).

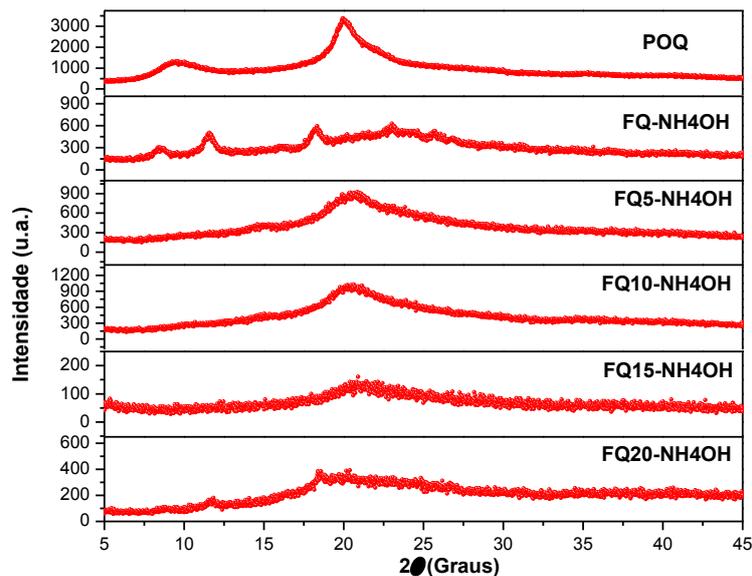


Figura 40 – Difratogramas do pó da quitosana e dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).

Ainda foi possível observar nos difratogramas dos filmes de quitosana neutralizados com NH_4OH que, à medida em que a droga vegetal foi sendo incorporada, os filmes foram diminuindo a sua cristalinidade, apresentando picos característicos de um material menos cristalino.

Assim sendo, o grau de cristalinidade dos filmes de quitosana neutralizados com NH_4OH foi de 9,4191 (%) e, à medida em que a droga vegetal foi sendo

incorporada aos filmes, esse grau de cristalinidade foi reduzindo, de forma que no FQ20, o grau de cristalinidade chegou a 0,0000 (%).

Lima (2010) e Holanda (2011), analisando filmes de quitosana também evidenciaram que, a incorporação da insulina nessas estruturas promoveu a redução da cristalinidade das mesmas.

Os difratogramas do pó da quitosana e dos filmes neutralizados com NaOH estão demonstrados na Figura 41, observando-se um comportamento típico de polímeros semicristalinos, com picos $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$, condizentes com os difratogramas apresentados por Campana Filho *et al.* (2007), Baskar e Kumar (2009), Fidéles (2010), Lima (2010) e Barbosa (2011).

Os FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20 apresentaram, em seus difratogramas, um comportamento semelhante ao do pó da quitosana entretanto observou-se que, à medida em que a droga vegetal foi sendo incorporada, os picos $2\theta = 10^\circ$, $2\theta = 15^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$ foram reduzindo em intensidade.

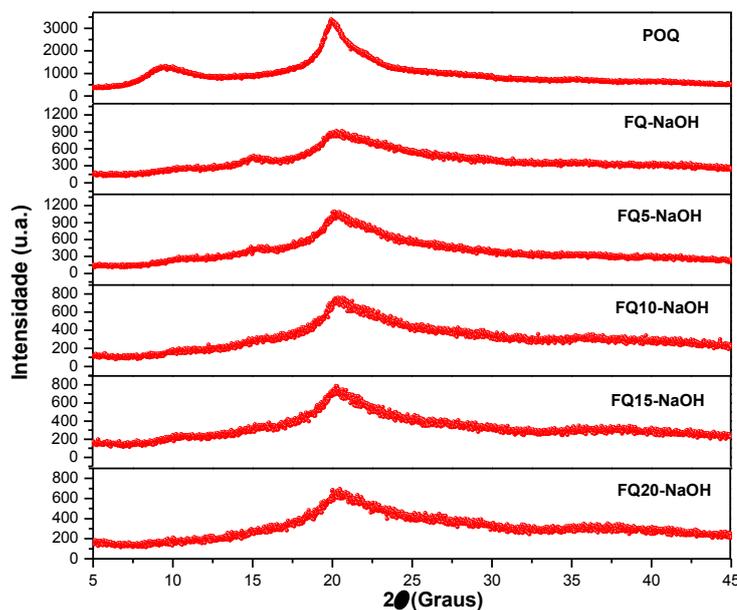


Figura 41 – Difratogramas do Pó da Quitosana e dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH (Autor, 2016).

Da mesma forma, foram avaliados os graus de cristalinidade das amostras, comprovando-se que o FQ, FQ5, FQ10 e FQ15 mantiveram o grau de cristalinidade em uma média de 6,9055 (%). Já o FQ20 apresentou uma redução do seu grau de cristalinidade, o qual ficou em 3,4908 (%).

O delineamento geral dos difratogramas dos SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20 não diferem entre si. Na Figura 42 encontram-se os difratogramas dos *scaffolds* de quitosana neutralizados com NaOH, ficando o perfil semicristalino evidente nas amostras analisadas, com picos $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$. Avaliando-se o grau de cristalinidade entre o SQ e o SQ20, evidenciou-se uma redução de 4,6509 (%) para 3,4499 (%). Resultados semelhantes foram encontrados por Cruz (2015).

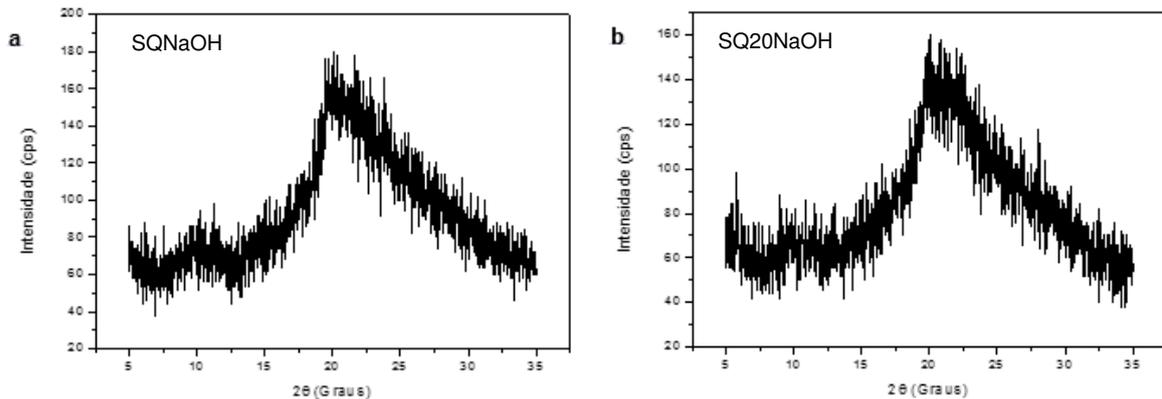


Figura 42 – Difratogramas dos SQ (a) e SQ20 (b), neutralizados com NaOH (Autor, 2016).

O ensaio de DRX confirmou a interação química ocorrida entre a quitosana e a droga vegetal, através da diminuição da cristalinidade, o que foi confirmado pelos resultados de FTIR, assim como a análise de MEV dessas estruturas. De igual modo, os resultados encontrados no DRX corroboram com os resultados do teste de molhabilidade, em que o ângulo de contato das amostras que contêm a droga vegetal foi menor que o da amostra de quitosana, expressando uma maior hidrofiliabilidade do material, estando assim de acordo com as afirmações de Signini e Campana Filho (2001) e Lima (2010).

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Na Figura 43 é possível observar a morfologia dos filmes de quitosana, sem a incorporação da droga vegetal, e neutralizados com NaOH (a) e com NH_4OH (b).

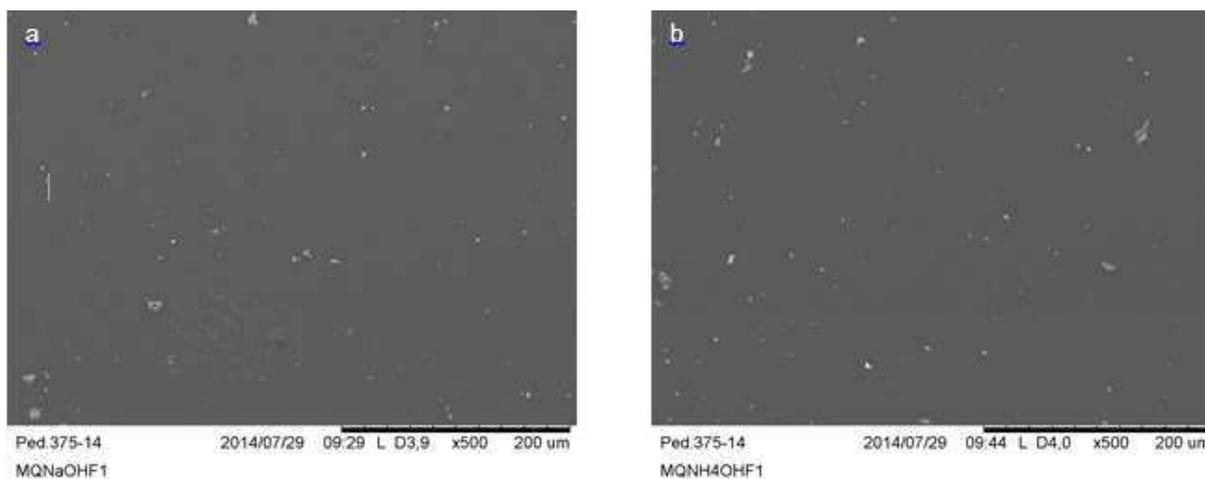


Figura 43 – Micrografia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana neutralizados com NaOH (a) e com NH_4OH (b). Aumento 500x (Autor, 2016).

Em ambos os casos observa-se que a superfície dos filmes se apresentou de maneira uniforme, lisa e plana, sem a presença de poros visíveis. Marreco *et al.* (2004), Dallan (2005), Fidèles (2010), Lima (2010), Holanda (2011) e Furtado (2014) estudaram a morfologia de filmes de quitosana e encontraram, igualmente, uma superfície plana e densa.

A partir dos resultados de espectroscopia dispersiva de raios X apresentados na Tabela 6 para os filmes de quitosana neutralizados com NaOH e NH_4OH , foi observado a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), próprios dos filmes de quitosana, constatando assim que não houve presença de agentes contaminantes durante a confecção dos filmes.

Tabela 6 - Percentual atômico dos filmes de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio e com hidróxido de amônio, de acordo com os resultados do EDS.

<u>Elemento Químico</u>	<u>Percentual Atômico (%)</u>	
	FQ - NaOH	FQ - NH_4OH
Carbono (C)	67,9	60,0
Oxigênio (O)	31,9	33,2
Nitrogênio (N)	0,1	6,7
Magnésio (Mg)	0,0	0,0

Igualmente aos resultados encontrados nos filmes de quitosana, os filmes de quitosana com a incorporação da droga vegetal (FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20) e

neutralizados com NaOH não apresentaram alterações morfológicas, estando suas micrografias demonstradas nas Figuras 44a, 44b, 44c e 44d, respectivamente.

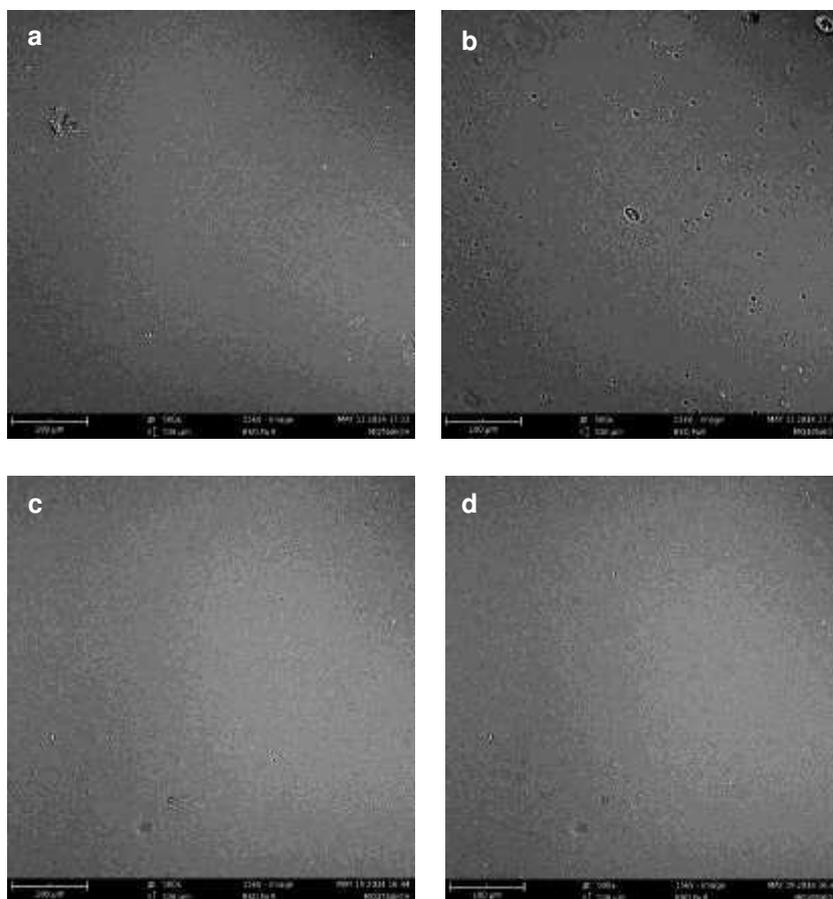


Figura 44 – Micrografia eletrônica de varredura do FQ5 (a), FQ10 (b), FQ15 (c) e FQ20 (d), neutralizados com NaOH. Aumento 500x (Autor, 2016).

Na Tabela 7 observa-se, de acordo com os percentuais de massa, a presença dos elementos C, O e N próprios do filme de quitosana.

Tabela 7 - Percentual atômico dos filmes de quitosana – FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH, de acordo com os resultados do EDS.

Elemento Químico	Percentual Atômico (%)				
	FQ	FQ5	FQ10	FQ15	FQ20
Carbono (C)	8,4	7	8,5	8,0	7,5
Oxigênio (O)	82,1	81,8	77,5	77,1	74,9
Nitrogênio (N)	9,5	7,8	9,4	8,8	8,7
Magnésio (Mg)	-	3,4	4,6	6,1	8,9

Na análise química pontual obtida por EDS, constatou-se a alteração da composição química da membrana, uma vez que foi possível observar que, com o acréscimo da droga vegetal, houve o aparecimento e o aumento gradativo de magnésio, elemento químico presente na droga vegetal.

Na Figura 45 encontram-se os resultados da MEV dos FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20 neutralizados com NH_4OH , observando-se que, com a incorporação da droga vegetal, houve alteração na morfologia dos filmes.

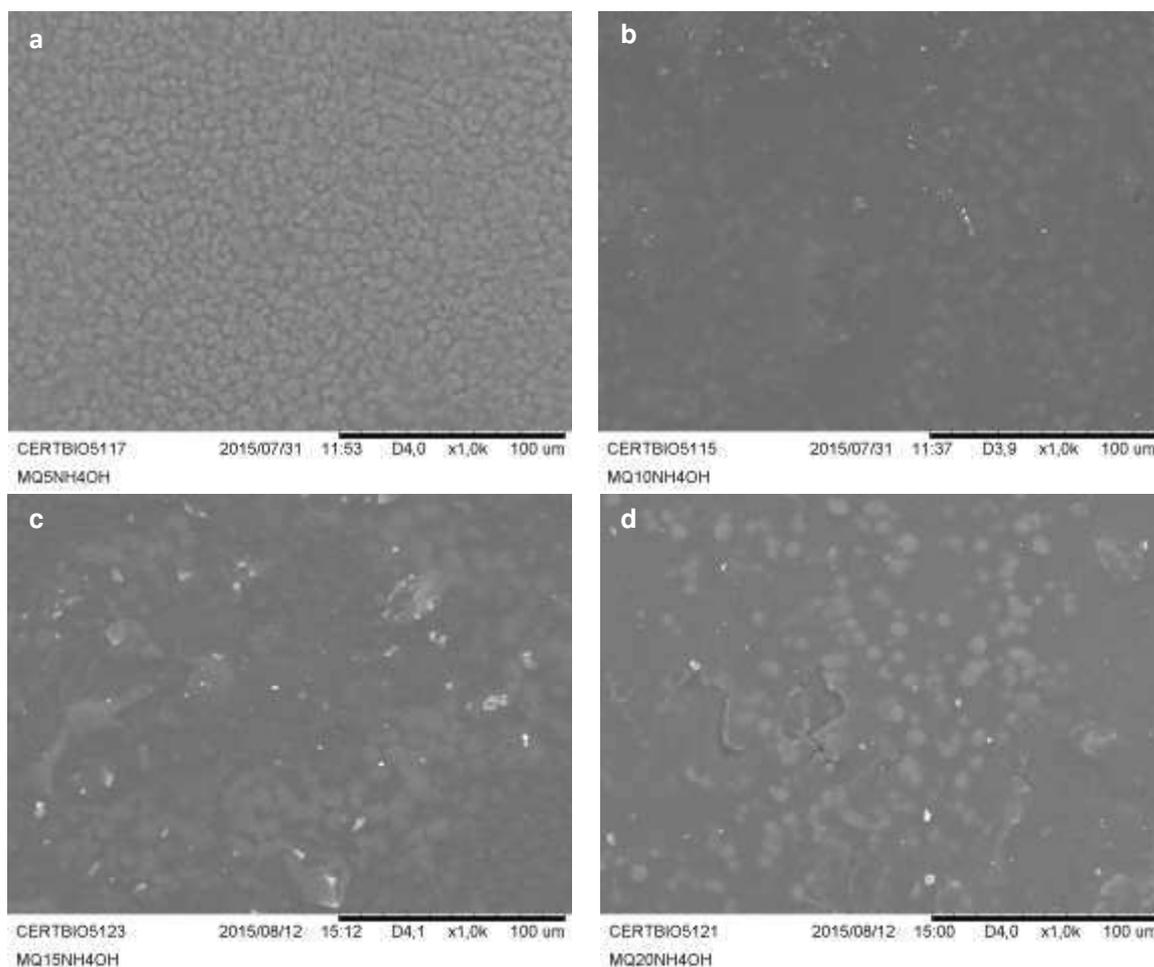


Figura 45 – Micrografia eletrônica de varredura do FQ5 (a), FQ10 (b), FQ15 (c) e FQ20 (d), neutralizados com NH_4OH . Aumento 1000x (Autor, 2016).

A partir da análise química pontual obtida através da técnica de EDS, foi possível comprovar que, com o aumento gradativo da droga vegetal, constatou-se a presença de cálcio, silício e magnésio, elementos químicos contidos na droga vegetal.

As morfologias das superfícies em contato com o ar (fase não condensada), em contato com a placa (fase condensada), e da área de corte (seção transversal) dos *scaffolds* de quitosana e de quitosana com a droga vegetal incorporada, neutralizados com NH_4OH , podem ser visualizadas nas Figuras 46, 47 e 48 respectivamente. Ressaltando que, as micrografias de maior dimensão correspondem ao aumento de 150x, e as de menor dimensão referem-se ao aumento de 1000x.

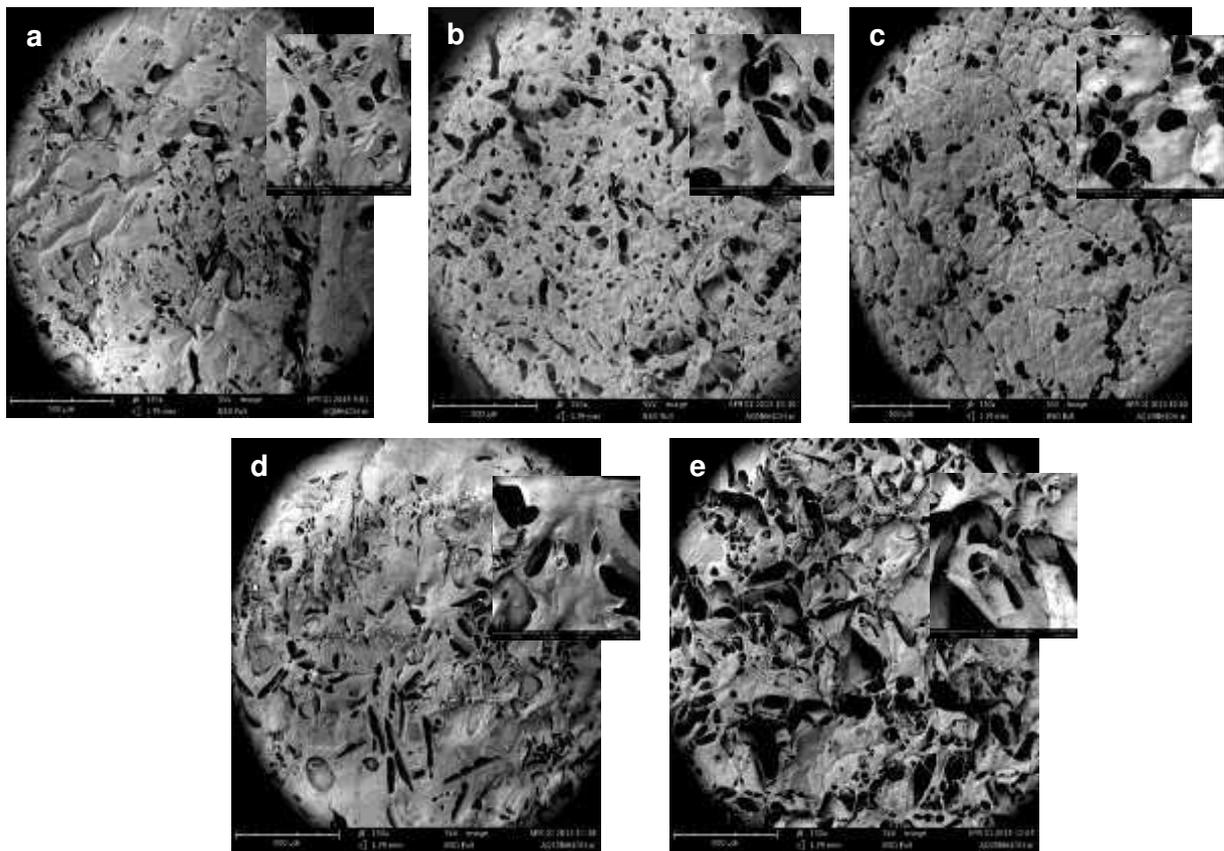


Figura 46 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com NH_4OH , superfície em contato com o ar. SQ (a), SQ5 (b) SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).

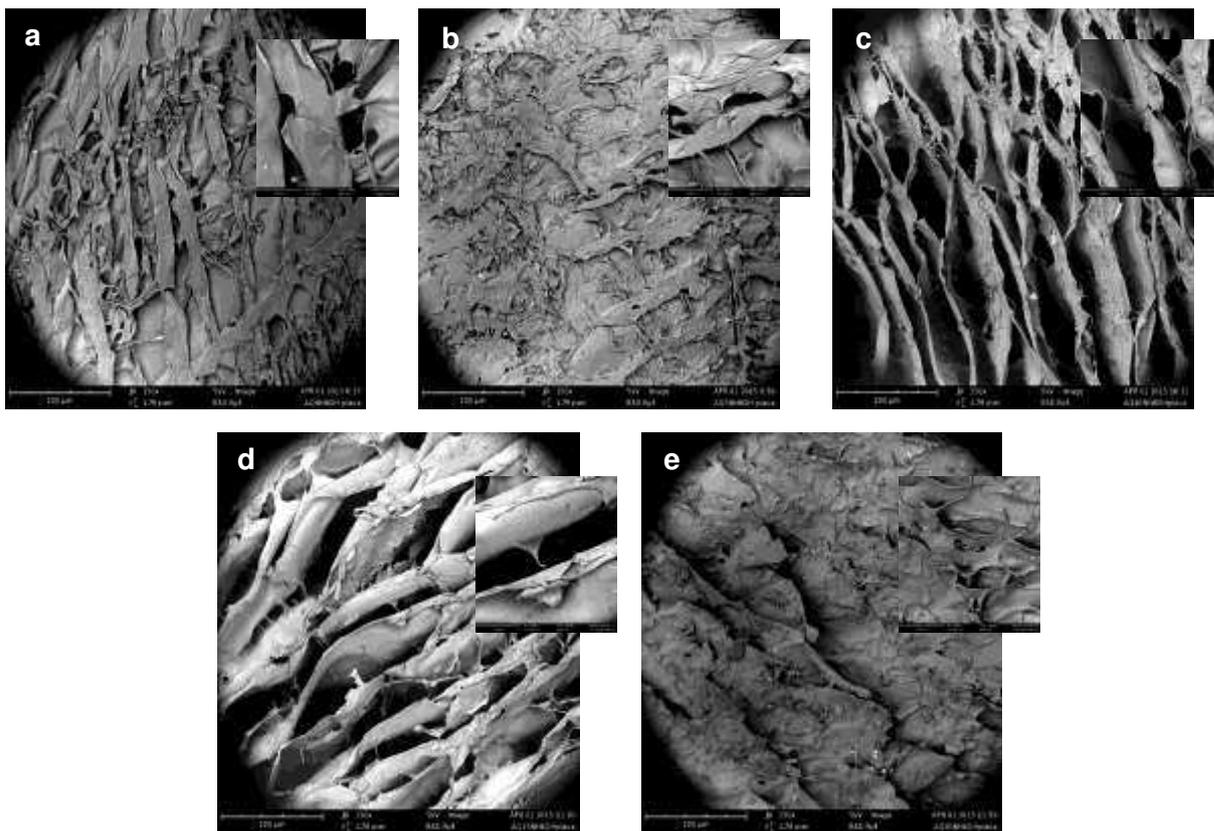


Figura 47 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com NH_4OH , superfície em contato com a placa. SQ (a), SQ5 (b), SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).

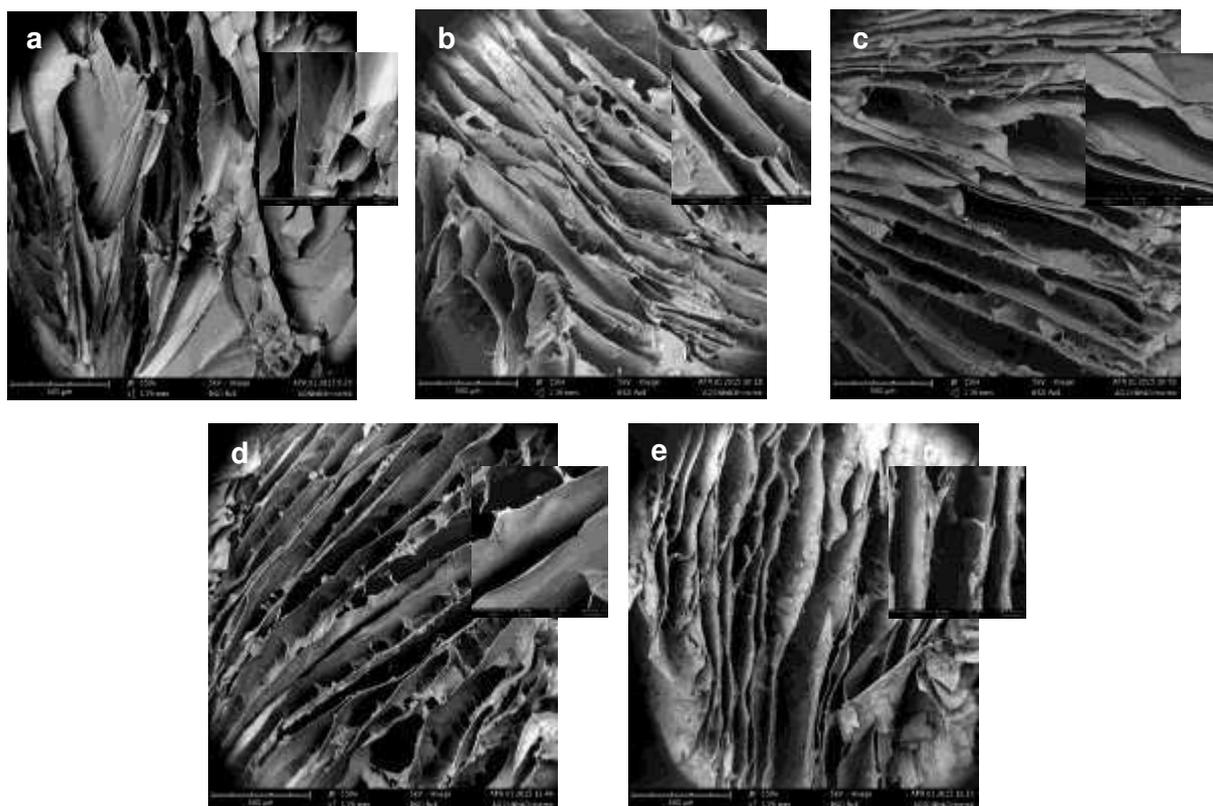


Figura 48 – Micrografia eletrônica de varredura dos SQ neutralizados com NH_4OH , superfície da seção transversal. SQ (a), SQ5 (b) SQ10 (c), SQ15 (d) e SQ20 (e). Aumento 150x nas micrografias de maior dimensão e de 1000x nas micrografias de menor dimensão (Autor, 2016).

As micrografias revelaram na superfície de corte (seção transversal) uma estrutura multicamadas - lamelas dispostas paralelamente, além de uma estrutura porosa em todas as superfícies analisadas, indicando a presença de poros intercomunicantes, corroborando com os resultados encontrados por Azevedo *et al.* (2007), Fávere (2009), Fook (2012) e Cruz (2015).

A morfologia diferente da superfície das amostras em contato com o ar e em contato com a placa corrobora com o estudo de Beppu, Arruda e Santana (1999).

A porosidade evidenciada em todos os *scaffolds* é de grande importância para um sistema de liberação de fármacos uma vez que permite a penetração de fluidos biológicos, facilitando a difusão dos fármacos para o meio (Fávere, 2009).

Macroscopicamente, observa-se uma diferença de coloração na superfície de corte, que possivelmente está associada a diferentes concentrações da droga vegetal (Figura 49).

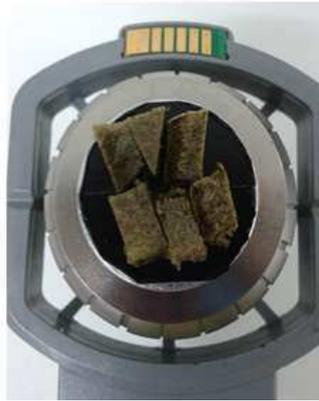


Figura 49 – Aspecto macroscópico das amostras no porta amostra do MEV (Autor, 2016).

Por esse real motivo, na superfície de corte do SQ5 e SQ20 ainda foram realizadas análises em duas áreas diferentes: na área mais próxima à superfície em contato com o ar (Figura 50a), e na área mais próxima à superfície em contato com a placa (Figura 50b), evidenciando-se em ambas as superfícies de cortes, estruturas lamelares e presença de poros interconectados.

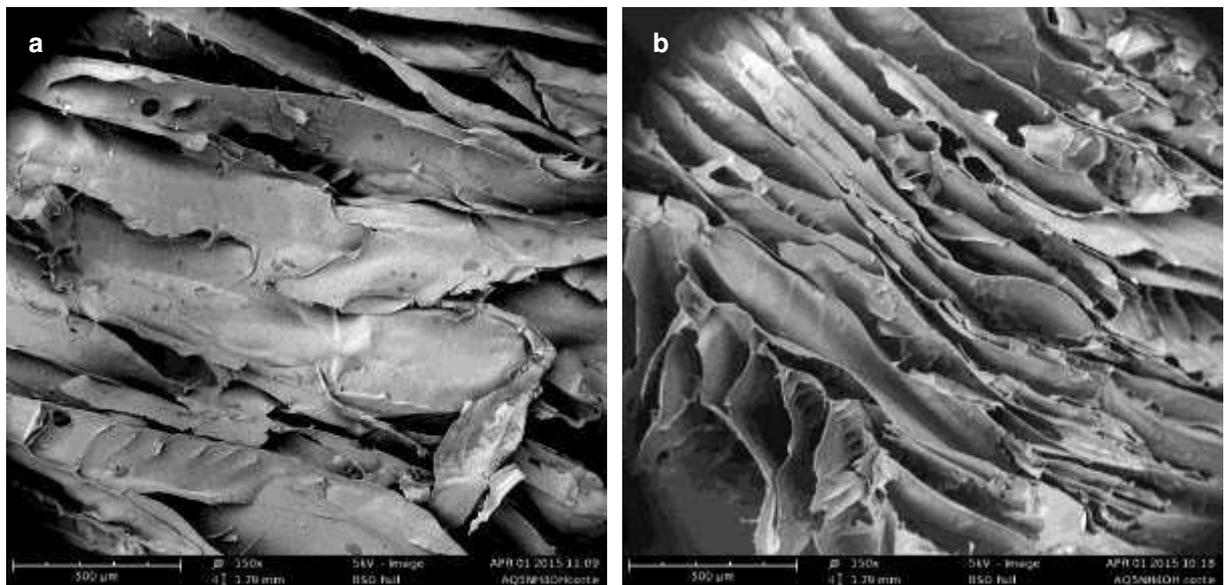


Figura 50 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ5 neutralizado com NH_4OH . Superfície de corte em contato com o ar (a), e superfície de corte em contato com a placa (b). Aumento 150x (Autor, 2016).

Da mesma forma, essa morfologia foi encontrada nas análises do SQ20 (Figura 51). Ressaltando que as micrografias eletrônicas de varredura do SQ10 e SQ15 apresentaram, de igual modo, características semelhantes.

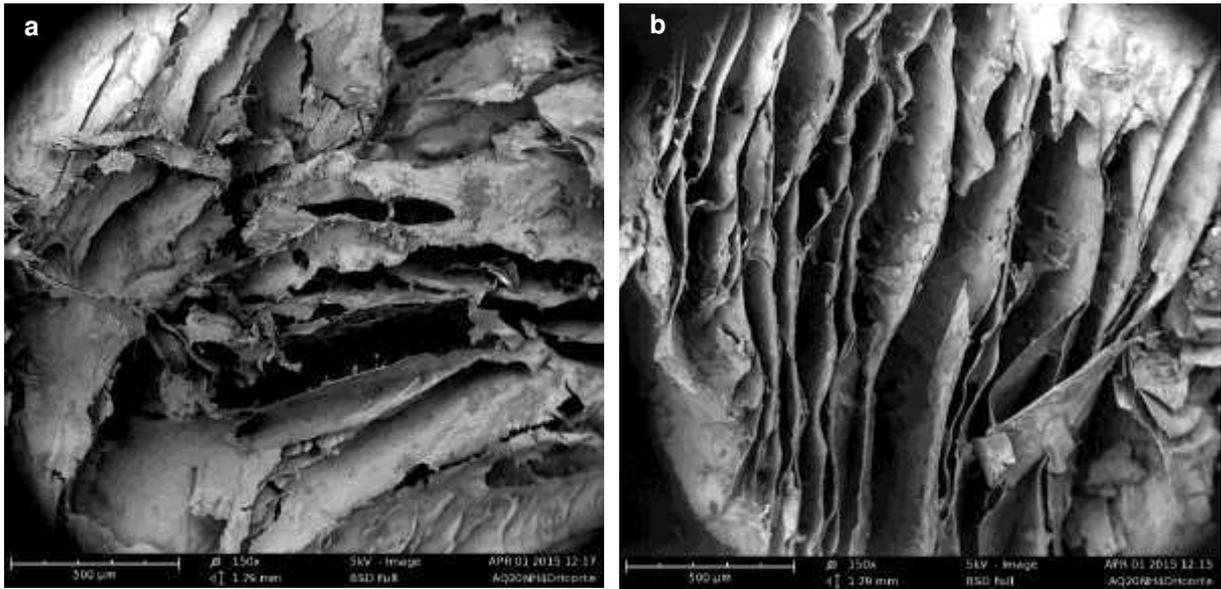


Figura 51 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ20 neutralizado com NH_4OH . Superfície de corte em contato com o ar (a), e superfície de corte em contato com a placa (b). Aumento 150x (Autor, 2016).

Em todas as amostras (SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20) foram selecionados dois pontos aleatórios, nas superfícies em contato com o ar, com a placa e na superfície de corte. O ponto 1 equivale a uma área esbranquiçada encontrada de forma dispersa ao longo da superfície do *scaffold*; já o ponto 2 corresponde a uma área aleatória da superfície do *scaffold*. Na Figura 52 é possível observar a análise desses dois pontos no SQ5, neutralizado com NH_4OH .

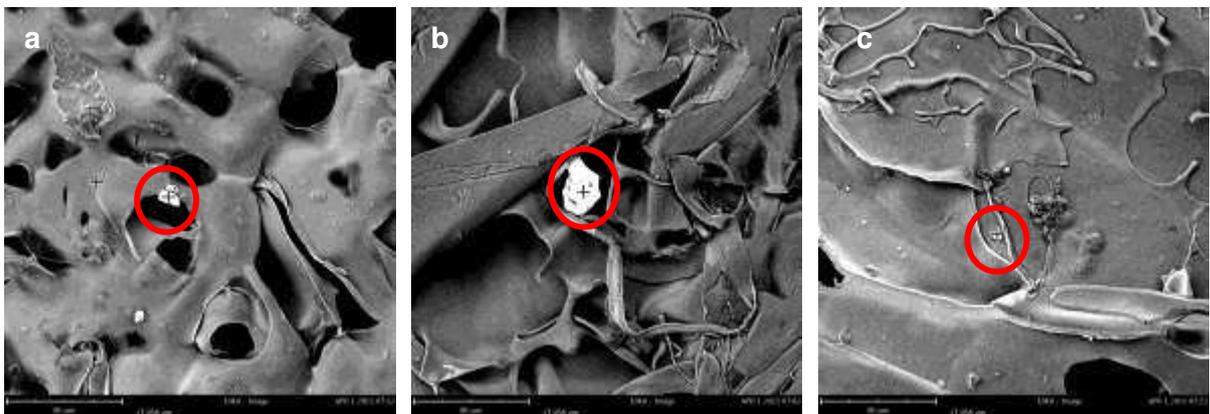


Figura 52 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ5 neutralizado com NH_4OH . Ponto 1 (em vermelho) e ponto 2 evidenciados nas superfícies em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 1000x (Autor, 2016).

A partir dos resultados de espectroscopia dispersiva de raios X apresentados na Tabela 8 para o SQ5 neutralizado com NH_4OH , foi observado a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), próprios dos *scaffolds* de quitosana. No ponto 1, correspondente ao ponto branco presente em todas as superfícies, evidencia-se ainda a presença de silício e do cálcio. No ponto 2 ainda foi encontrado o magnésio.

Tabela 8 - Percentual atômico do SQ5 neutralizado com NH_4OH .

<u>Elemento Químico</u>	<u>Percentual Atômico (%)</u>					
	SQ5					
	Superfícies - Ponto 1			Superfícies - Ponto 2		
	Ar	Placa	Corte	Ar	Placa	Corte
Carbono (C)	1,4	1,6	-	9,6	9,3	7,9
Oxigênio (O)	31,3	55,7	62	67,1	68	75,2
Nitrogênio (N)	3,3	4,8	5,6	10	10,8	12,8
Magnésio (Mg)	-	-	-	5,7	5	4,1
Silício (Si)	28	31	12,9	-	-	-
Cálcio (Ca)	-	-	2,2	-	-	-

Da mesma forma, foram observadas as imagens da MEV do SQ20 (Figura 53).



Figura 53 – Micrografia eletrônica de varredura do SQ20 neutralizado com NH_4OH . Ponto 1 (em vermelho) e ponto 2 evidenciados nas superfícies em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 1000x (Autor, 2016).

Na Tabela 9 encontra-se o percentual atômico do SQ20, analisando-se as superfícies em contato com o ar, com a placa e a superfície de corte transversal.

Tabela 9 - Percentual atômico do SQ20, neutralizado com NH_4OH .

<u>Elemento Químico</u>	<u>Percentual Atômico (%)</u>					
	SQ20					
	Superfícies - Ponto 1			Superfícies - Ponto 2		
	Ar	Placa	Corte	Ar	Placa	Corte
Carbono (C)	-	-	-	-	-	-
Oxigênio (O)	56,5	45,5	62,5	52,4	45,2	60,8
Nitrogênio (N)	7,2	-	9,6	-	-	9,5
Magnésio (Mg)	9,2	7,7	7,5	9,2	2,4	2,9
Silício (Si)	-	-	0,9	-	-	-
Cálcio (Ca)	3,5	5,6	2,2	7,3	7,2	4,7

Na análise química pontual obtida por EDS constatou-se que no SQ20 não foi observada a presença de carbono e nem a do nitrogênio em algumas áreas. E que, à medida em que a droga vegetal foi incorporada aos *scaffolds*, aumentou a

quantidade de cálcio e magnésio nas estruturas, sendo o silício percebido apenas na área de corte do ponto 1.

De acordo com os estudos desenvolvidos por Silva (1996), o silício, o cálcio, o fósforo e o magnésio fazem parte da composição da droga vegetal incorporada aos filmes e *scaffolds* de quitosana.

4.1.7 Grau de Intumescimento com PBS

Nas Figuras 54 a 59 são apresentados os resultados de intumescimento por tipo, concentração, forma e soluções utilizadas no processo de neutralização.

Destacam-se nas Figuras 54 e 55 que, as amostras neutralizadas com hidróxido de amônia, as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas na forma intumescida do que na condição seca.

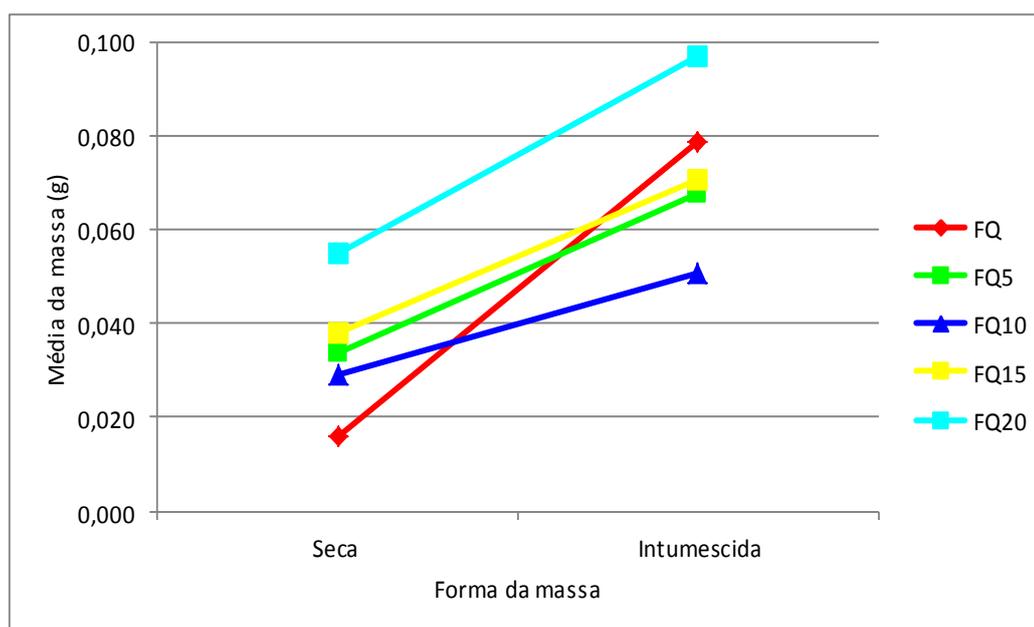


Figura 54 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos filmes neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).

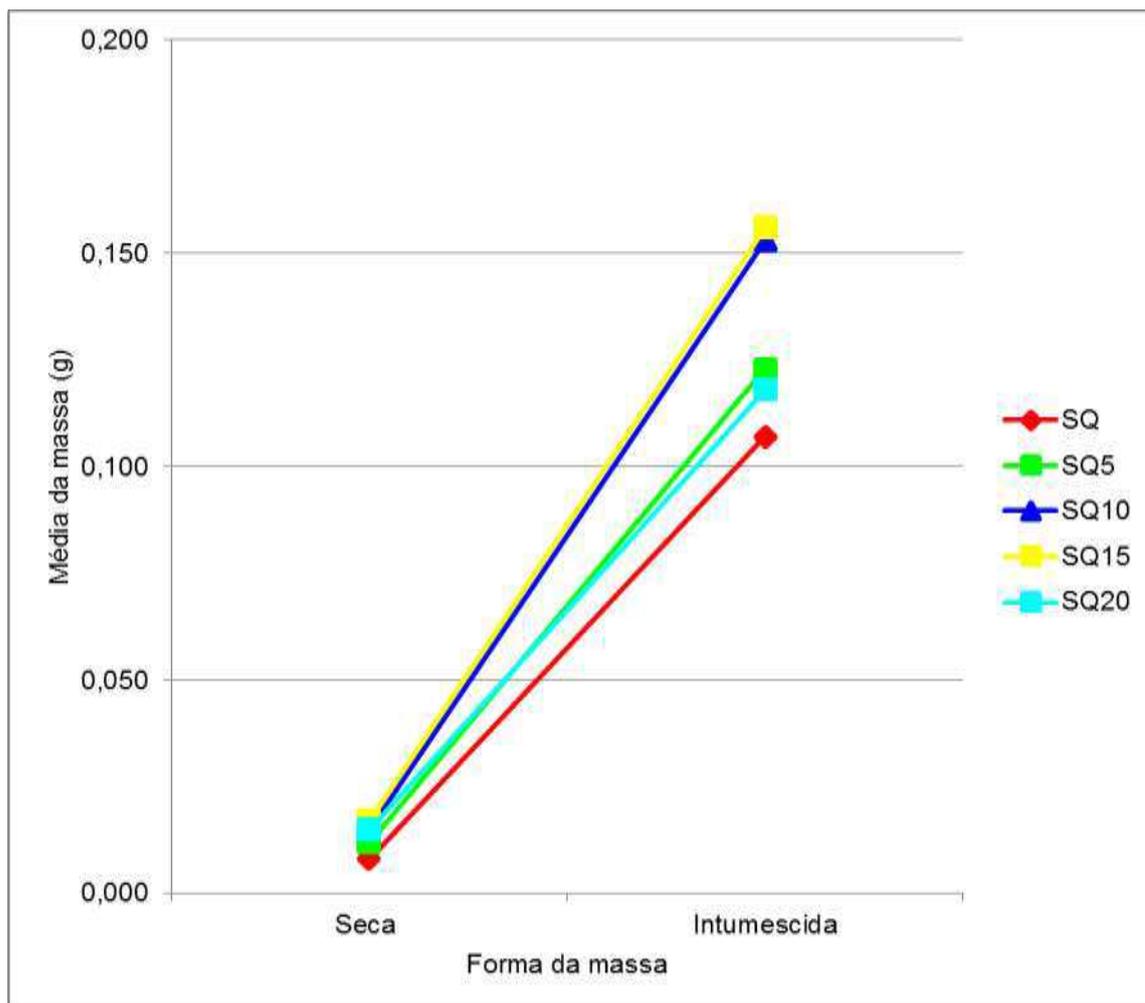


Figura 55 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos *scaffolds* neutralizados com NH_4OH (Autor, 2016).

As diferenças nas médias das massas variaram de 0,023 g a 0,063 g no filme e de 0,099 g a 0,140 g no *scaffold*, entretanto sem diferenças significativas entre as duas formas e em nenhum dos tipos (filme ou *scaffold*) e concentração; as médias oscilaram com a concentração da droga vegetal, sendo verificadas diferenças significativas entre as concentrações em cada um dos tipos e variáveis, com diferenças significativas entre os pares: na massa seca do filme, exceto entre 5% com 15% e entre 15% com 20%; na massa intumescida do filme entre 10% com cada uma das outras concentrações, e na variável diferença absoluta, exceto entre 5% com 15% e entre 20% com cada uma das outras concentrações.

As médias foram correspondentemente mais elevadas no filme do que no *scaffold* na massa seca enquanto que, na massa intumescida e nas diferenças absolutas, as médias foram correspondentemente mais elevadas no *scaffold* do que

no filme, diferenças estas que se mostraram significativas entre filme e *scaffold* em cada concentração e variável (Apêndice H).

Analisando-se as amostras neutralizadas com hidróxido de sódio, constatou-se que, igualmente ao que foi verificado na amostras neutralizadas com NH_4OH , as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas na forma intumescida do que na condição seca, tanto nos filmes como nos *scaffolds*, aumentando com a concentração da droga vegetal nos filmes, e oscilando nos *scaffolds* (Figuras 56 e 57).

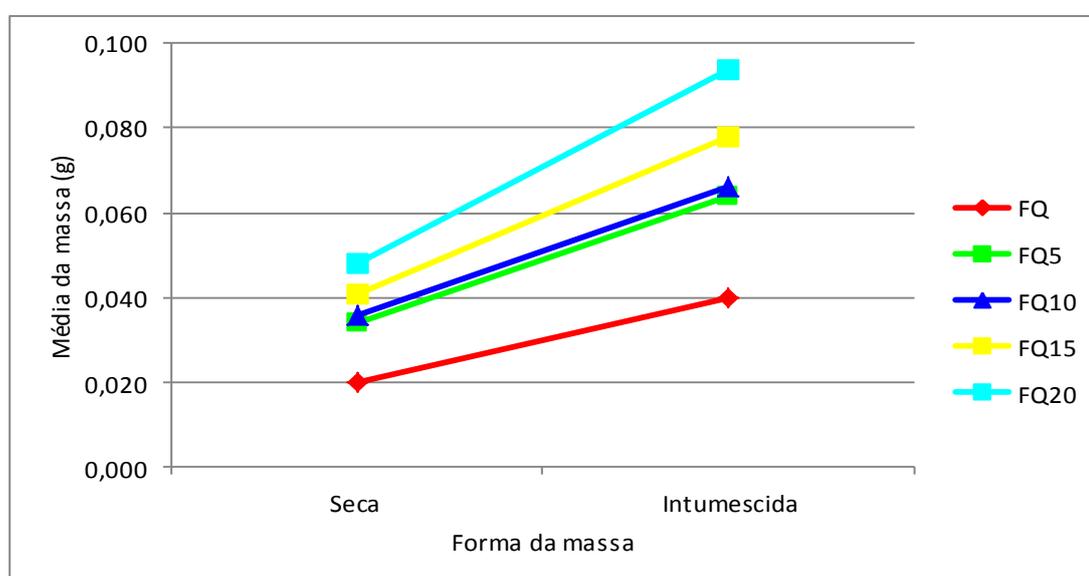


Figura 56 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos filmes neutralizados com NaOH (Autor, 2016).

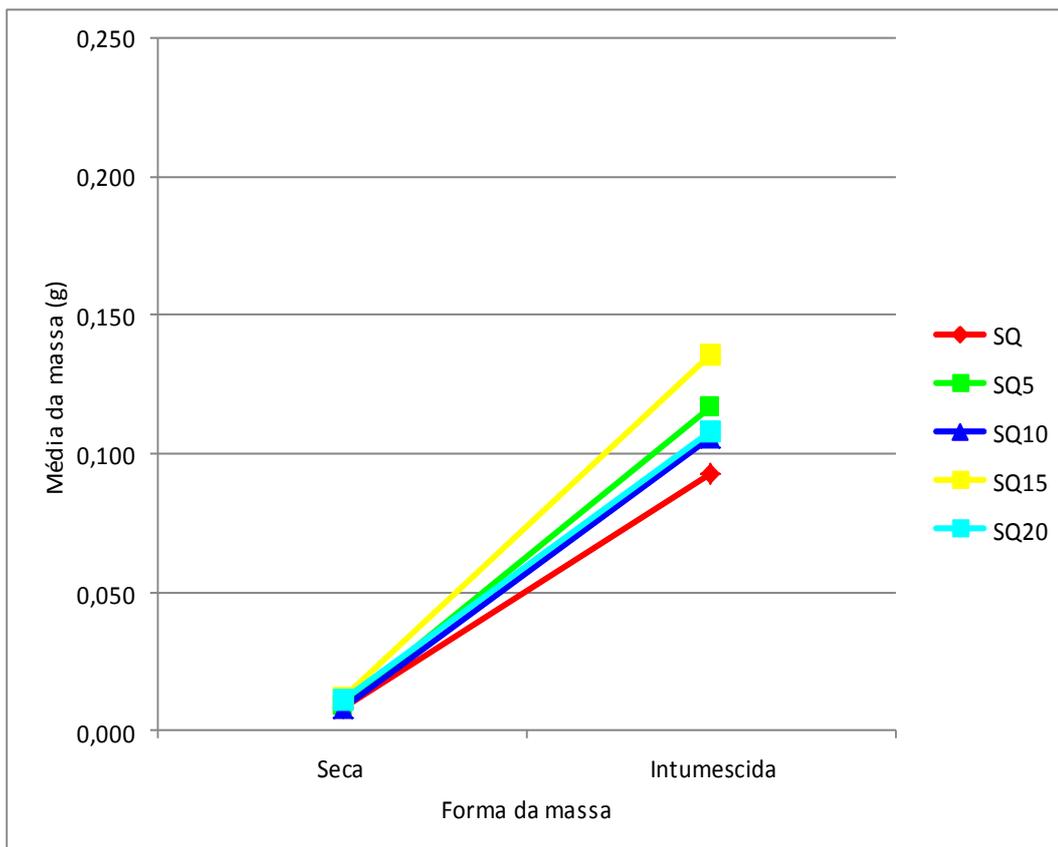


Figura 57 – Médias da massa segundo a concentração e a forma na concentração nos *scaffolds* neutralizados com NaOH (Autor, 2016).

As diferenças das massas variaram de 0,019 g a 0,046 g no filme e de 0,085 g a 0,124 g no *scaffold*, entretanto sem diferenças significativas entre as duas formas e em nenhum dos tipos (filme ou *scaffold*) e concentração; as médias das massas aumentaram com a concentração da droga vegetal no filme e oscilaram no *scaffold*, sendo verificadas diferenças significativas entre as concentrações em cada um dos tipos e variáveis, com diferenças significativas entre os pares: na massa seca do filme entre a concentração 0% com todos os demais, entre 5% com 15% e 20%, e entre 10% com 20%; na massa intumescida do filme e na variável diferença absoluta, exceto entre 5% com 10% e entre 15% com 20% em todos os demais pares; na massa seca do *scaffold* entre cada uma das concentrações 0%, 5% e 10% com cada uma das concentrações 15% e 20%; na massa intumescida e na variável diferença absoluta entre 15% com 0%, 10% e 20% e entre 0% com 5%. As médias da massa seca foram correspondentemente mais elevadas no filme do que no *scaffold*, enquanto que as médias da massa intumescida e as diferenças absolutas foram correspondentemente mais elevadas no *scaffold* do que no filme, sendo

comprovadas diferenças significativas entre filme e *scaffold* em todas as concentrações em cada uma das três variáveis analisadas (Apêndice I).

Dessa forma, ficou evidente que todas as amostras apresentaram habilidade de retenção da solução de PBS e um aumento no grau de intumescimento, uma vez que absorveram mais água do que seus próprios pesos. Constatou-se ainda que os *scaffolds* apresentaram maior grau de intumescimento quando comparado com os filmes. Para Tiğh, Karakeçili e Gümüşderelioğlu (2007), essa capacidade pode ser atribuída tanto à manutenção das suas estruturas 3D, quanto à hidrofiliabilidade das amostras, comprovadas no teste de molhabilidade.

Esses resultados corroboram também com os encontrados na difração de raios-x, tendo em vista que, nos difratogramas evidenciou-se a redução da cristalinidade das amostras com a incorporação da droga vegetal e, quanto menor a cristalinidade das amostras, maior a sua capacidade de absorção de fluidos.

Fernandes (2009), analisando filmes de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina, reticuladas com tripolifosfato, para serem empregadas como curativos para queimaduras ou como material para reparo da cartilagem articular, percebeu que, após a imersão das amostras em triplicata na solução de PBS, por um período de 1, 3 e 24 horas, o grau de intumescimento da quitosana aumentou, quando da reticulação com o TPP, e diminuiu pela adição de sulfato de condroitina.

Furtado (2014) observou em seus estudos que, os filmes de quitosana/curcumina, em pHs ácidos, imersos em solução de PBS (pH 7,4) durante diferentes períodos de tempo, apresentaram menor intumescimento quando comparado com os filmes de quitosana.

Tomaz e Moraes (2015), incorporando extrato alcoólico de alecrim em filmes de alginato e quitosana por impregnação, visando sua aplicação como curativo para lesões de pele, comprovou que durante a imersão das amostras em 10 mL de etanol por 24h não ocorreu intumescimento, e que o etanol interagiu muito fracamente com o filme.

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Sampaio *et al.* (2012) que desenvolveram e caracterizaram *scaffolds* de quitosana e quitosana reticulada com genipina nas concentrações de 0,15% e 0,3%, permanecendo as mesmas em contato com a solução de PBS por 24 horas e apresentando, ao final da análise, uma alta capacidade de intumescimento em todas as composições.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Cruz (2015) que, analisando *scaffolds* de Quitosana (Q), Quitosana/Tripolifosfato (QT), Quitosana/1,4–Naftoquinona (QN) e Quitosana/Tripolifosfato/1,4–Naftoquinona (QNT) observou em seus estudos que houve um ganho de massa de aproximadamente 13, 8, 12 e 9 vezes nos *scaffolds*, respectivamente.

Esse ganho considerável de massa dos *scaffolds*, após a permanência por 24 horas em solução de PBS, indicou uma alta capacidade de absorção por todos os *scaffolds*, fato este que decorreu provavelmente da penetração do líquido nos *scaffolds* e da interação da água (através de pontes de hidrogênio) com pontos reativos ($-\text{NH}_3^+$, NH_2 e $-\text{OH}$), segundo Cruz (2015).

Analisando-se as soluções empregadas no processo de neutralização das amostras, constatou-se que as médias foram mais elevadas na forma intumescida quando comparado com a forma seca, tanto nos filmes quanto nos *scaffolds* (Figuras 58 e 59).

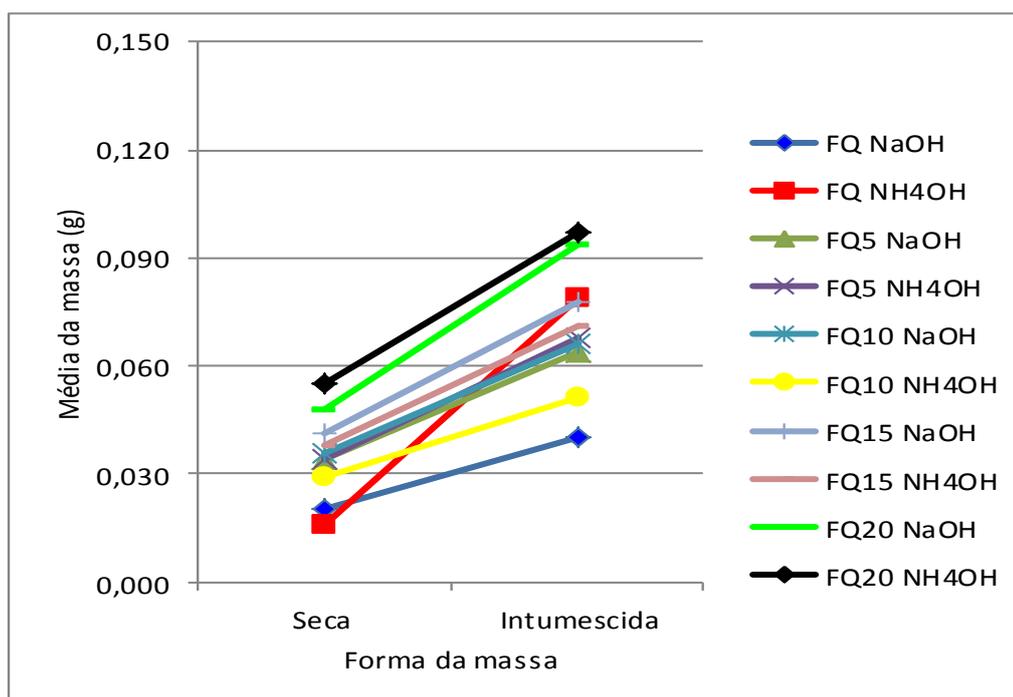


Figura 58 – Médias da massa segundo a concentração, solução, concentração e a forma na concentração nos filmes (Autor, 2016).

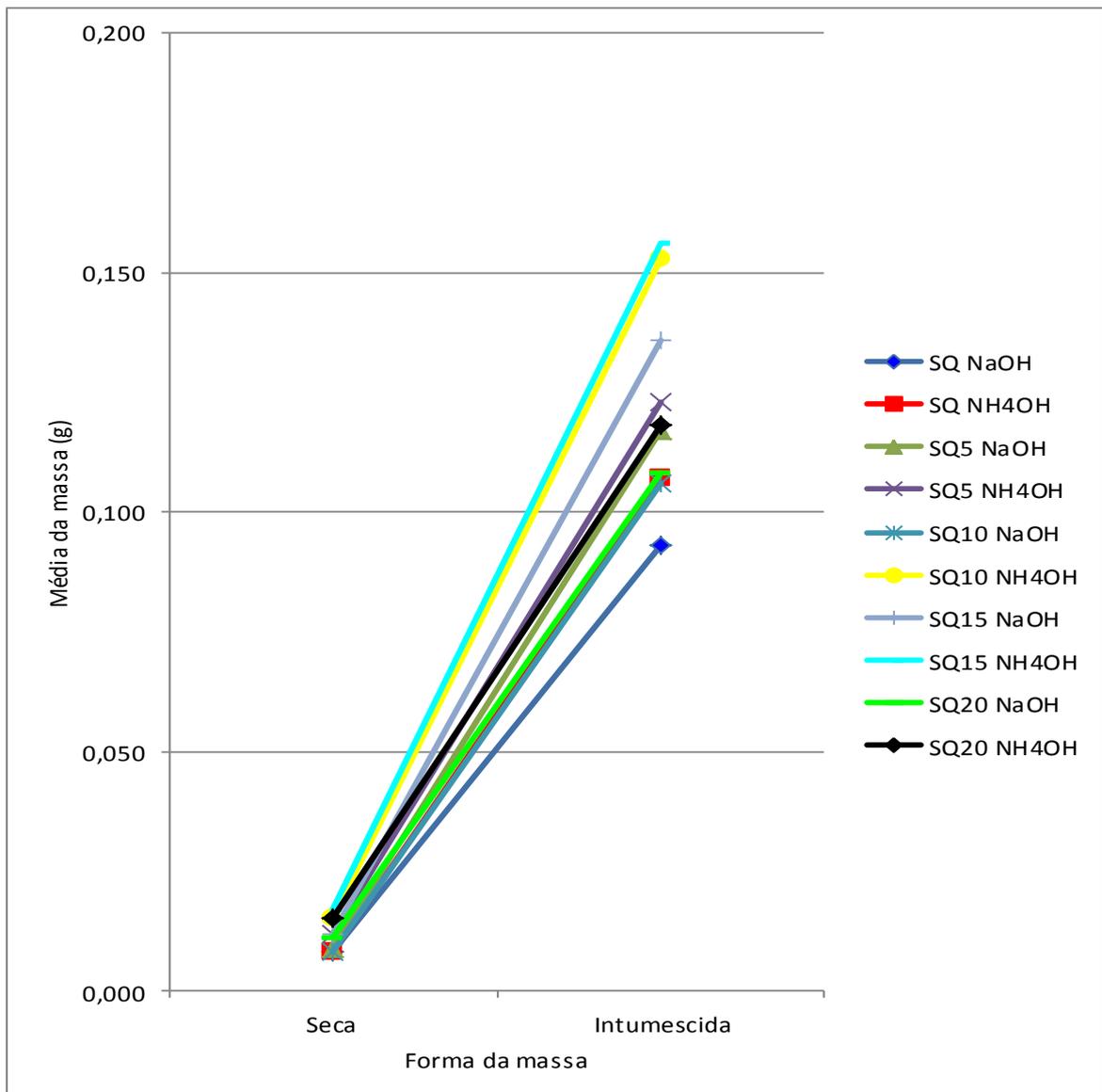


Figura 59 – Médias da massa segundo a concentração, solução, concentração e a forma na concentração nos *scaffolds* (Autor, 2016).

Diferenças significativas entre as soluções utilizadas no processo de neutralização foram registradas na massa seca do filme na concentração de 10%, assim como na massa intumescida e na variável diferença absoluta nas concentrações de 0% e 10% de incorporação da droga vegetal.

As médias foram correspondentemente mais elevadas na substância NaOH do que no NH₄OH, na concentração de 10% do filme em cada uma das variáveis enquanto que na concentração de 0%, as médias foram correspondentemente mais elevadas na solução NH₄OH do que NaOH.

Exceto para 0% na massa seca do *scaffold*, nas outras concentrações na massa seca, assim como em 10% da massa intumescida do *scaffold* e na variável

diferença absoluta constatou-se diferenças significativas, verificando-se que as médias foram correspondentemente mais elevadas na solução de NH_4OH do que na de NaOH , em cada uma das variáveis com diferença significativa (Apêndice J).

Esses resultados corroboram com os encontrados na difração de raios-x, uma vez que a neutralização com a solução de NH_4OH promoveu uma maior redução de cristalinidade das amostras quando comparada com a solução de NaOH , favorecendo, desse modo, um maior intumescimento das mesmas.

4.2 Resultados da Fase Investigativa

Nessa etapa do trabalho, a partir dos resultados encontrados, passaram a ser desenvolvidos e caracterizados apenas os *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação da droga vegetal neutralizados com hidróxido de amônia.

4.2.1 Microscopia Ótica (MO)

Na Figura 60 observa-se a micrografia ótica do SQ (superfície de corte transversal).

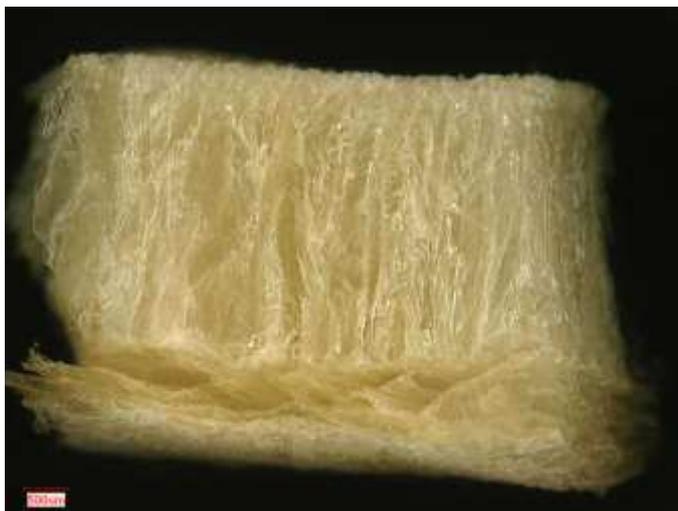


Figura 60 – Micrografia ótica do SQ (superfície de corte transversal). Aumento 40x (Autor, 2016).

Na Figura 61 constata-se na micrografia ótica do SQ, as superfícies em contato com o ar (a) e em contato com a placa (b).

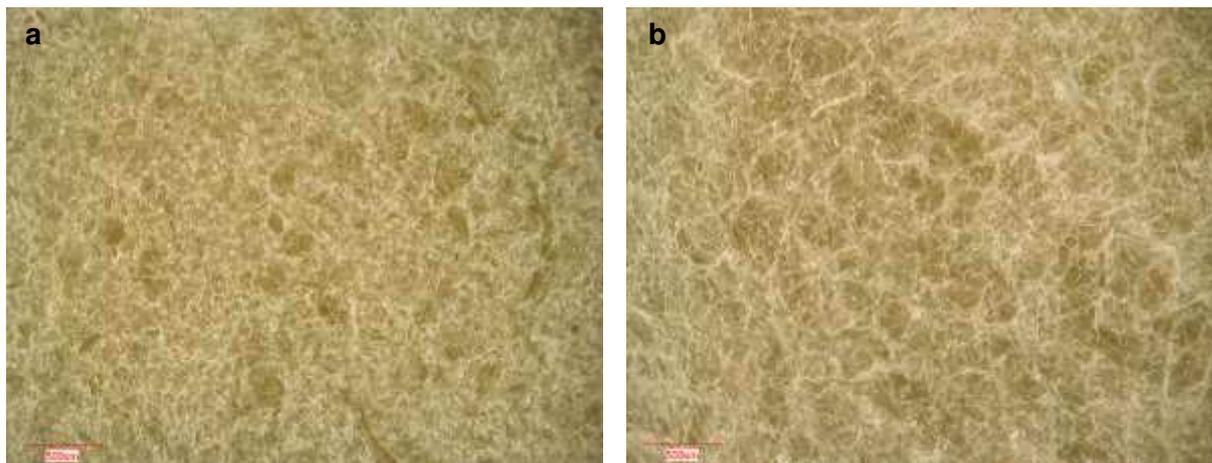


Figura 61 – Micrografia ótica do SQ. Superfície em contato com o ar (a), e superfície em contato com a placa (b). Aumento 80x (Autor, 2016).

Foi possível observar a presença de poros intercomunicantes ao longo de todas as superfícies da amostra, e de estruturas lamelares na superfície de corte, confirmando os resultados obtidos através da MEV.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Sampaio *et al.* (2012) que comprovaram em seus estudos a formação porosa das estruturas dos *scaffolds* através da identificação do contorno de alguns poros.

Através da microscopia ótica foi ainda possível observar que, à medida em que a droga vegetal foi sendo incorporada ao *scaffold*, houve uma maior preferência na interação polímero – droga vegetal na área condensada (em contato com a placa), o que também ficou evidente macroscopicamente e na MEV. Esse fato pode estar relacionado à densidade das partículas da droga vegetal (Figura 62).

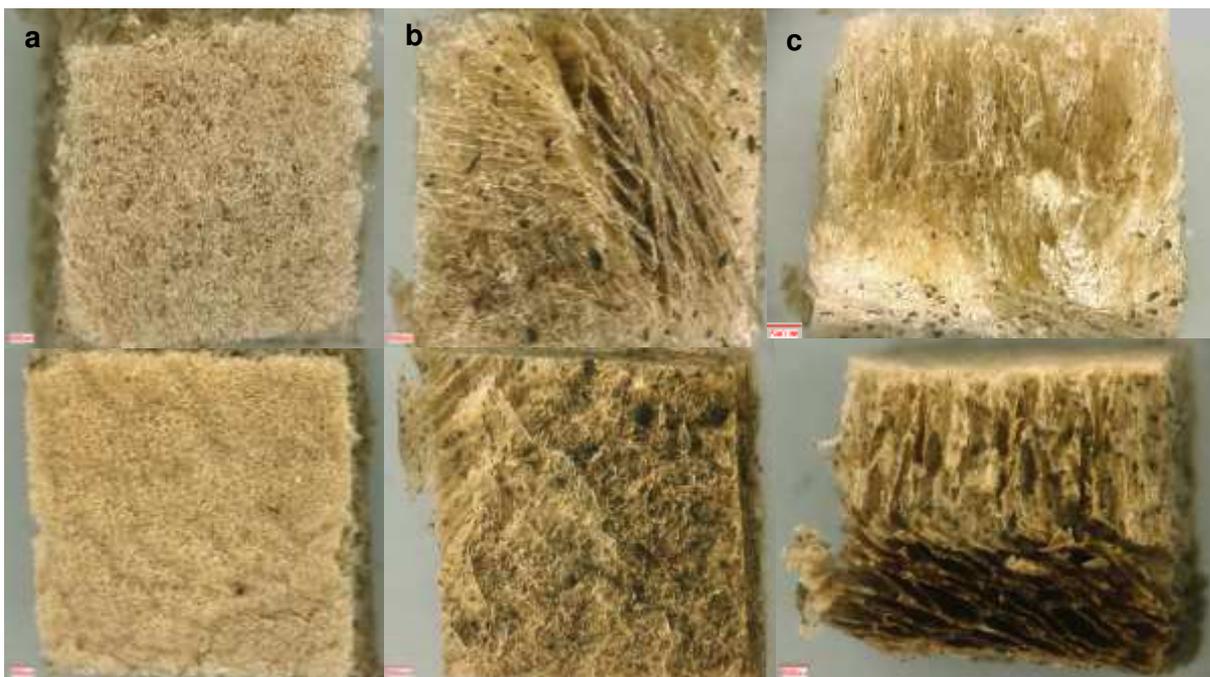


Figura 62 – Micrografia ótica dos SQ5 e SQ20. Superfície em contato com o ar (a), superfície em contato com a placa (b), e na superfície de corte transversal (c). Aumento 40x (Autor, 2016).

4.2.2 Teste de Molhabilidade

A Figura 63 ilustra o resultado de molhabilidade dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, sendo o mesmo obtido a partir da média dos ângulos de contato encontrados nas amostras.

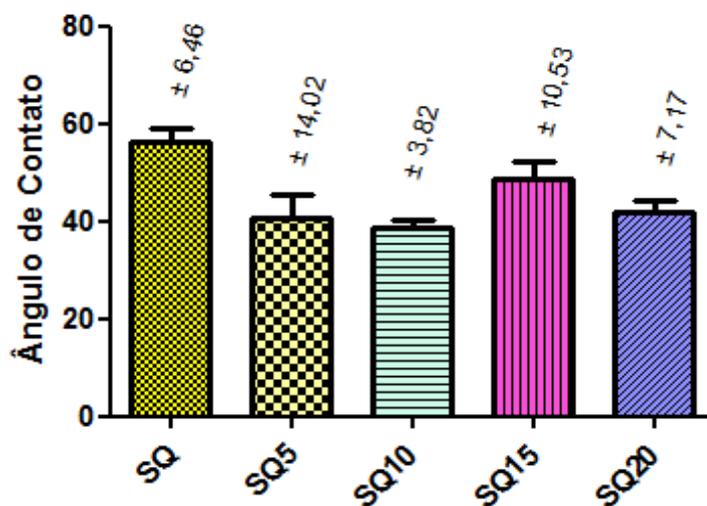


Figura 63 – Análise do ângulo de contato das superfícies das amostras (Autor, 2016).

De acordo com os resultados do teste de molhabilidade, verificou-se que todos os *scaffolds* apresentaram uma medida de ângulo de contato menor que 90°, o que indica que todas as amostras apresentaram um perfil hidrofílico. A presença da droga vegetal interferiu no perfil hidrofílico dos *scaffolds*, promovendo um aumento na hidrofiliabilidade dos mesmos.

Assis e Silva (2003), produzindo filmes de quitosana, observaram que a hidrofiliabilidade da quitosana, em particular, se dá como função de seus grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares. Ainda nesse estudo, esses autores concluíram que outro aspecto que contribui para uma maior retenção de água é a estrutura porosa, uma vez que os poros facilitam a permeação e subsequente retenção de água na matriz polimérica.

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Lima (2010) que, analisando filmes de quitosana e quitosana com a incorporação de insulina, constatou uma tendência geral de diminuição do ângulo de contato nas amostras que possuíam 50 UI de insulina, em relação às preparações que não continham insulina, indicando maior caráter hidrofílico deste material.

Macedo *et al.* (2010) avaliando filmes de quitosana tratados por plasma de hidrogênio constatou que as amostras tratadas apresentaram uma molhabilidade maior do que as não tratadas, o que pode ser atribuído às modificações químicas que podem ter ocorrido no material.

Cardoso *et al.* (2012), perceberam que na tensão superficial de filmes de quitosana sem e com a incorporação de metais de cobre, zinco e magnésio, houve pequena variação no ângulo de contato dos filmes de quitosana pura em relação aos que continham os metais, não havendo mudança significativa em sua molhabilidade devido à incorporação do metal, permanecendo os mesmos com perfil hidrofílico.

Já Sousa (2012), desenvolvendo filmes biodegradáveis de quitosana/fosfato de cálcio (apatita) com incorporação de vitamina E percebeu, em seus estudos, que todos os filmes apresentaram hidrofiliabilidade entretanto, a presença do fosfato de cálcio nas proporções de 1%, 3% e 5% nos filmes de quitosana e quitosana com vitamina E alteraram os valores médios de ângulo, ou seja, com o aumento do fosfato a molhabilidade foi reduzida; enquanto o filme de quitosana com vitamina E teve um potencial maior em sua molhabilidade.

4.2.3 Teste de Compressão

A Figura 64 apresenta as curvas tensão-deformação dos *scaffolds* de quitosana sem e com a incorporação de diferentes concentrações da droga vegetal (5%, 10%, 15% e 20%) exemplificando, assim, o comportamento ao teste mecânico de compressão.

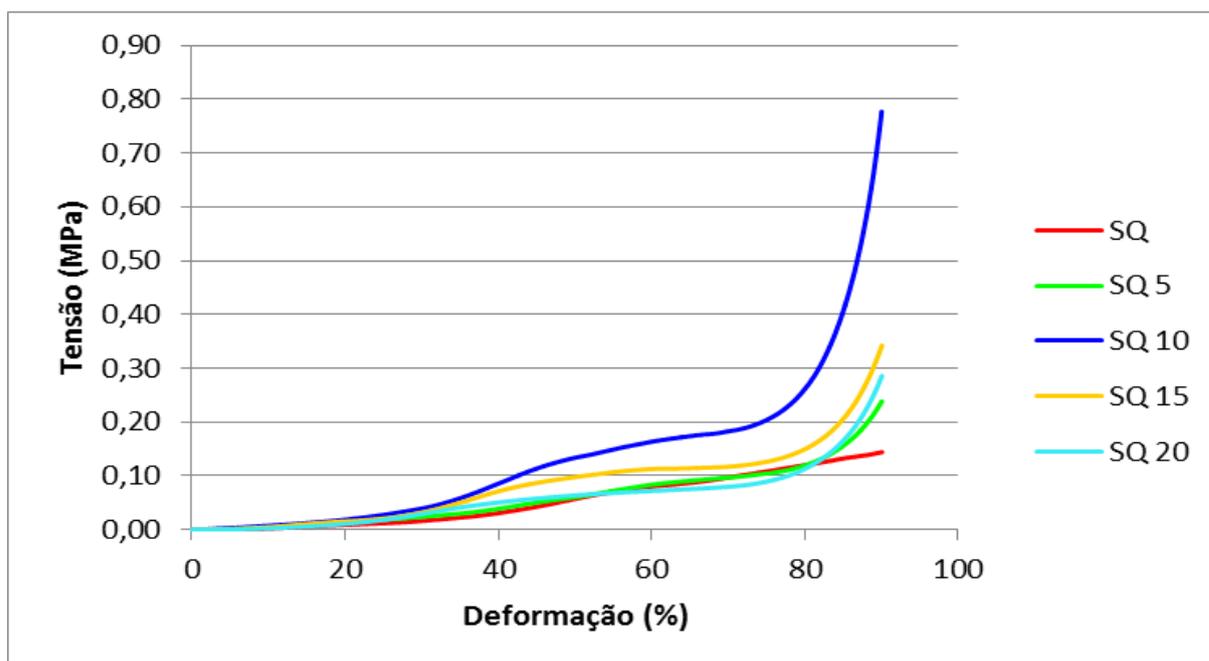


Figura 64 – Curvas tensão-deformação dos *scaffolds* de quitosana, sem e com a incorporação da droga vegetal em diferentes concentrações (Autor, 2016).

A partir das curvas tensão-deformação observou-se que os *scaffolds* sofreram deformação a 90%, mas para que os *scaffolds* que continham a droga vegetal incorporada sofressem deformação foi necessária uma maior tensão.

Ao comparar os dados, pode-se afirmar que as pequenas diferenças observadas entre as curvas são provenientes das diferentes concentrações da droga vegetal, que resultaram em diferentes tensões, como expostas na Tabela 10.

Tabela 10: Propriedades mecânicas de compressão.

Amostras	Tensão Máxima (Mpa)	Deformação Máxima (%)	Módulo de Elasticidade (Mpa)
SQ	0,14387	90,08068	0,27244
SQ5	0,23862	90,06050	2,10429
SQ10	0,77681	90,03373	10,73148
SQ15	0,34237	90,06631	3,57618
SQ20	0,28580	90,06814	3,20050
Desvio Padrão	0,24544	0,01737	3,98803
Média	0,35749	90,06187	3,97698
Mediana	0,28580	90,06631	3,20050

A presença da droga vegetal tornou os *scaffolds* mais resistentes à deformação, o que pode estar relacionado à presença de partículas do extrato distribuídas em toda a amostra.

Mendonça, Costa e Thiré (2012), produzindo *scaffolds* do poliéster microbiano poli (3-hidroxi-butarato) - PHB/Quitossana funcionalizados com fibronectina (FN) percebeu que, no teste de compressão, empregando uma célula de carga de 2 KN e velocidade do travessão de 1,3 mm/min, o $A_{PHB-QUI}^{FN}$ apresentou módulo de compressão igual a (18.0 ± 0.03) MPa mostrando-se mais resistente à compressão do que o $A_{PHB-QUI}$ que apresentou módulo de compressão igual a (13.07 ± 0.01) MPa. Diferença essa que pode ser atribuída às diferentes estruturas porosas dos *scaffolds*.

4.2.4 Análise Termogravimétrica (TG)

A Figura 65 ilustra os resultados de TG e DTG para os SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20. Com base na curva do SQ, foi possível observar que houve perda de massa em três etapas. Na primeira etapa, a perda foi de cerca de 13,6% iniciando em torno de $\pm 21^{\circ}\text{C}$ até aproximadamente $\pm 125^{\circ}\text{C}$, na segunda etapa a perda foi de cerca de 9,2% entre aproximadamente $\pm 125^{\circ}\text{C}$ e $\pm 248^{\circ}\text{C}$, e na terceira etapa a perda foi de cerca de 36% iniciando em torno de $\pm 248^{\circ}\text{C}$ e finalizando em aproximadamente $\pm 393^{\circ}\text{C}$.

Os resultados demonstraram que a perda inicial provavelmente ocorreu pelo desprendimento de moléculas pequenas como a água ainda contidas na estrutura polimérica após o processo de liofilização. Por volta de 300°C pôde-se observar uma queda brusca do percentual de massa, assumindo-se então que, neste intervalo de temperatura, ocorreu a degradação térmica do material.

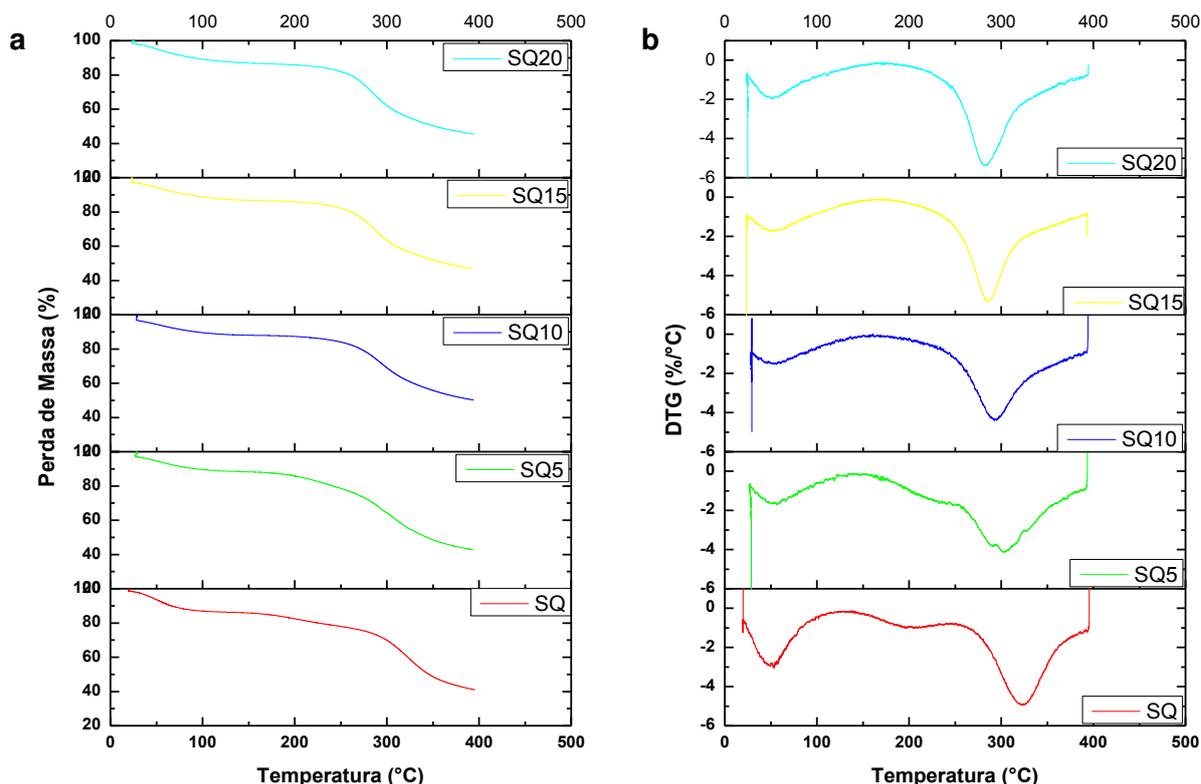


Figura 65 – Curvas TG (a) e DTG (b) dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20 obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min e sob atmosfera de nitrogênio (20mL/min) (Autor, 2016).

Analisando-se as curvas termogravimétricas dos *scaffolds* de quitosana com a incorporação da droga vegetal, constatou-se que a perda de massa ocorreu em duas etapas. Os SQ5 apresentaram uma perda de massa, na primeira etapa, de cerca de 11,1% iniciando em torno de $\pm 29^{\circ}\text{C}$ até aproximadamente $\pm 139^{\circ}\text{C}$ e na segunda etapa evidenciou-se uma perda de cerca de 45,8% entre aproximadamente $\pm 139^{\circ}\text{C}$ e $\pm 384^{\circ}\text{C}$. Na primeira etapa, os SQ20 apresentaram uma perda de massa em torno de 13,4% entre aproximadamente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e $\pm 170^{\circ}\text{C}$, e na segunda etapa a perda foi de cerca de 41,2%, iniciando em torno de $\pm 170^{\circ}\text{C}$ e finalizando em aproximadamente $\pm 388^{\circ}\text{C}$.

Do SQ5 ao SQ20 o perfil das curvas é semelhante, entretanto, à medida em que a droga vegetal foi sendo incorporada, houve uma diminuição da temperatura de degradação, ou seja, a estrutura foi se degradando mais rapidamente, como observado na Tabela 11.

Tabela 11: Decomposições térmicas dos *scaffolds*.

Amostras	Etapas de Decomposição					
	1ª Etapa		2ª Etapa		3ª Etapa	
	Tp (°C)	Perda de Massa (%)	Tp (°C)	Perda de Massa (%)	Tp (°C)	Perda de Massa (%)
SQ	±50,62	13,6	±198,57	9,2	±321,46	36,0
SQ5	±57,44	11,1	±303,22	45,8	-	-
SQ10	±54,23	12,3	±293,49	37,8	-	-
SQ15	±51,42	13,3	±285,68	39,7	-	-
SQ20	±50,09	13,4	±282,78	41,2	-	-

*Tp: Temperatura de decomposição máxima.

Furtado (2014), observou em seus estudos que não houve mudança no perfil das curvas de TG do filme de quitosana/curcumina, entretanto, observou que houve um aumento da perda de massa e temperatura no filme de quitosana/curcumina quando comparado com o filme de quitosana.

Os resultados do presente trabalho corroboram com os encontrados por Cruz (2015) que concluiu na análise termogravimétrica que os *scaffolds* de quitosana apresentaram perda de massa em três etapas. E que a perda inicial provavelmente está associada à perda de moléculas de água presentes nas amostras mesmo após o processo de liofilização.

4.2.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Nos resultados de DSC, para todas as amostras, foi observada a presença de dois eventos principais: um pico endotérmico e um exotérmico. Na curva de DSC dos *scaffolds* de quitosana, o evento endotérmico foi encontrado em aproximadamente 120°C e o evento exotérmico foi encontrado em torno de 300°C. Analisando filmes de quitosana, resultados semelhantes foram encontrados por Parize (2006) e Sousa (2012).

O evento endotérmico pode ser atribuído à perda de substâncias voláteis como a água, e o evento exotérmico corresponde à degradação da quitosana, corroborando com os resultados encontrados por Guinesi e Carvalheiro (2006), Sarmiento *et al.* (2006), Azevedo *et al.* (2010), Júnior *et al.* (2010) e Zawadzki e Kaczmarek (2010).

Analisando-se o SQ5 ao SQ20 percebeu-se que, à medida em que a droga vegetal foi incorporada, houve uma redução na temperatura de degradação, comprovando-se que o polímero se degradou a temperaturas mais baixas. Os resultados dessa análise corroboram com os encontrados na TG e DTG.

Na Tabela 12 encontram-se os principais dados relacionados aos eventos calorimétricos para as amostras estudadas.

Tabela 12: Dados dos eventos calorimétricos dos *scaffolds*.

Amostras	Eventos Calorimétricos	
	Perda de Material Volátil (°C)	Degradação (°C)
SQ	± 120°C	± 300°C
SQ5	± 120°C	± 280°C
SQ10	± 110°C	± 260°C
SQ15	± 80°C	± 255°C
SQ20	± 80°C	± 250°C

4.2.6 Grau de Intumescimento com PBS e Saliva Artificial

Nas Figuras 66 e 67 são apresentados os resultados de intumescimento por tipo de solução, concentração e forma utilizadas no processo de intumescimento, bem com as médias das diferenças relativas $[(M_f - M_0)/M_0]$. É possível observar os resultados da análise de grau de intumescimento dos *scaffolds*, quando os mesmos foram imersos por 24 horas em solução de PBS e saliva artificial, constatando-se que houve aumento das médias das massas em ambas as soluções e em todas as amostras analisadas.

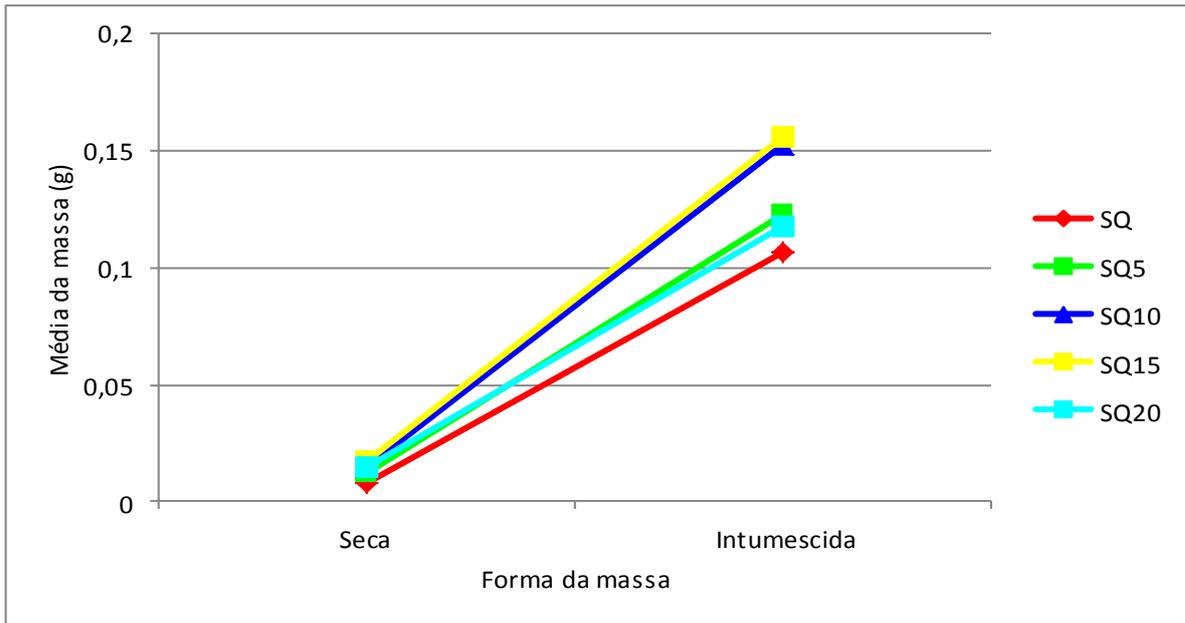


Figura 66 – Médias da massa segundo a concentração e a forma, na solução de PBS (Autor, 2016).

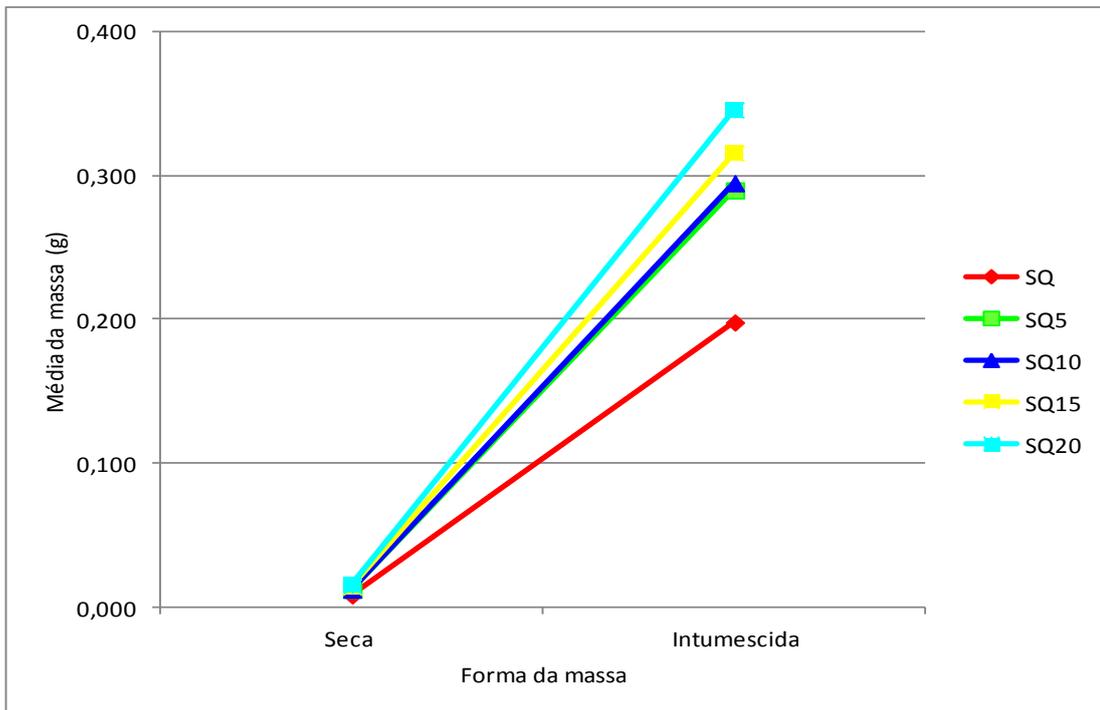


Figura 67 – Médias da massa segundo a concentração e a forma, na solução de saliva artificial (Autor, 2016).

Destaca-se que: as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas na forma intumescida do que na massa seca, sendo que os valores oscilaram de 0,008 g a 0,017 g na massa seca nas duas soluções; e na massa

intumescida variaram de 0,107 g a 0,156 g na solução do PBS e de 0,198 g a 0,346 g na saliva artificial, entretanto sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tipos de solução (PBS e saliva artificial) e concentração.

Com exceção da solução de PBS que mostrou uma redução da massa entre as concentrações de 15% para 20% nas duas formas e na saliva artificial que apresentou médias iguais nas concentrações de 5% e de 10%, nas demais situações, as médias da massa aumentaram com a concentração da droga vegetal em cada tipo de solução; ou seja, a incorporação da droga vegetal aos *scaffolds* favoreceu o aumento do intumescimento, sobretudo quando em contato com a saliva artificial. Nas médias das diferenças relativas, os valores indicaram aumento de massa após o intumescimento, com valores que variaram de 6,955 g (na concentração de 20%) a 12,137 g (na concentração de 0%) na solução de PBS e de 21,722 g (na concentração de 15%) a 25,309 g (na concentração de 0%) e, com exceção das diferenças na saliva artificial, se comprova diferenças significativas entre as concentrações. Através dos testes de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis, comprovou-se diferença entre os pares de concentrações: na massa seca do PBS, exceto entre 0% com 5% e entre 10% com 20% nos demais pares foram registradas diferenças significativas; na massa intumescida do PBS entre as concentrações 0%, 5% e 20% com 10% e 15%; na diferença relativa do PBS exceto entre 5%, 10% e 15% nos demais pares; na massa seca da saliva artificial exceto entre 5% com 10% e 15% com 20%; na massa intumescida entre 0% com todas as demais concentrações e entre 5% com 20%.

A única diferença significativa entre PBS e saliva artificial na massa seca foi registrada na concentração de 15% que teve média mais elevada na solução de PBS do que na saliva artificial (0,017 g x 0,014 g). Na massa intumescida e na variável diferença relativa, as médias na solução de saliva artificial foram correspondentemente mais elevadas do que as médias na solução de PBS com diferenças significativas em cada uma das concentrações (Apêndice K). Esta diferença no grau de intumescimento pode estar relacionada à hidrofiliabilidade e à cristalinidade do material.

Para Yang *et al.* (2010), os *scaffolds* de quitosana quando aplicados, geralmente apresentam grande adsorção de água, que pode facilitar a retenção de fluidos corporais e nutrientes necessários ao crescimento do tecido. A presença do

grupamento amino primário (-NH₂) e do grupo hidroxila (-OH) não só aumenta a afinidade do material com a água, como também forma ligações de hidrogênio.

4.2.7 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Segundo Dallan (2005), a avaliação da degradação de um biomaterial no meio biológico é de suma importância visto que esta caracterização está diretamente relacionada ao tempo em que o material será absorvido pelo organismo após sua inserção ou utilização no corpo. Esse ensaio teve como objetivo analisar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação dos *scaffolds*, como também verificar a influência da saliva artificial sobre essas amostras.

Nas Figuras 68 a 70 se apresentam os resultados da diferença relativa entre as duas medidas (inicial e final) e entre os dias de avaliação por concentração, sendo uma figura para cada uma das soluções. Nos Apêndices L a N estão expressos os dados comparativos entre as soluções por dias de avaliação e concentração. Já nos Apêndices O a Q encontram-se as comparações entre as concentrações por solução e dias de avaliação.

A Figura 68 destaca que as médias das massas quando foi utilizada a solução de PBS reduziram da medida inicial para a medida final, diferenças estas que se revelaram significativas entre as duas medidas em cada concentração e dias de avaliação.

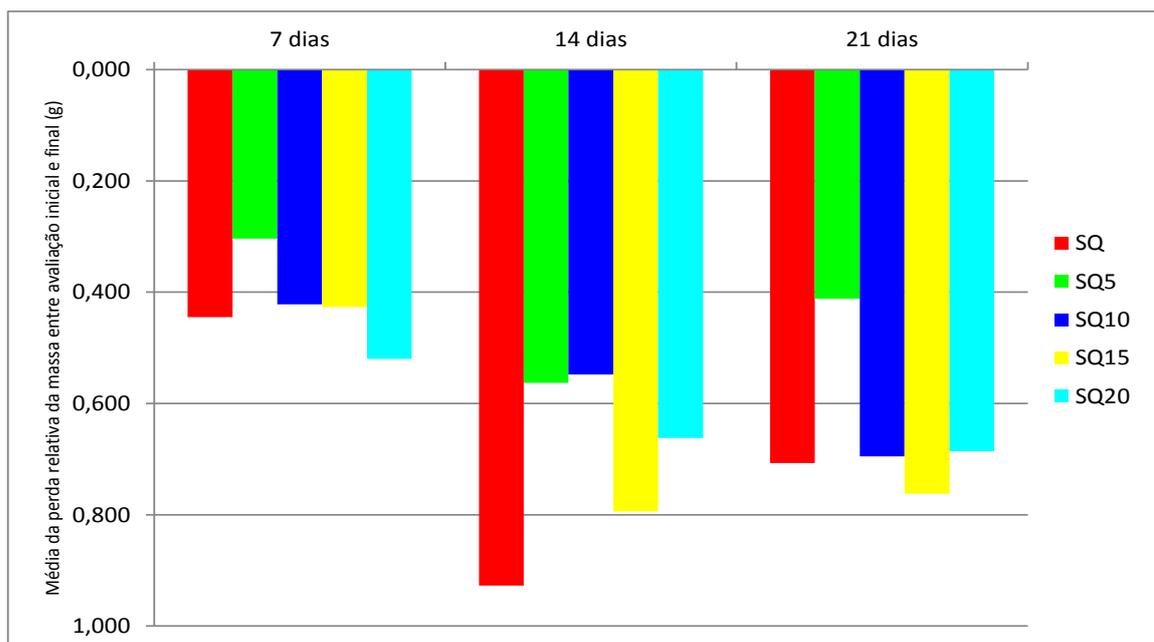


Figura 68 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de PBS (Autor, 2016).

No Apêndice L podem ser observados os resultados da massa inicial e final bem como a diferença relativa entre as duas medidas. As médias das diferenças relativas variaram de 0,304 g a 0,927 g, sendo menos elevadas nas avaliações com 7 dias em cada concentração. Diferenças significativas entre avaliações foram registradas nas concentrações de 0%, 5% e 15% na avaliação final e, com exceção da concentração de 10%, na diferença relativa. Para as situações com diferenças significativas, os resultados mostram que: as médias da avaliação final foram mais elevadas com 7 dias do que nas outras duas avaliações e, através das comparações múltiplas (entre pares de dias de avaliação) se comprova diferença significativa: na avaliação final e na diferença relativa entre todos os pares de dias de avaliação na concentração de 0%; entre 14 dias com cada uma das outras duas avaliações na concentração de 5%; entre 7 dias com 14 dias e 21 dias na concentração de 15%. Na variável diferença relativa, se comprova diferença significativa na concentração de 20%, entre 7 dias com 14 e com 21 dias.

Assim sendo, os *scaffolds* sofreram perda de massa considerável entre 7 e 14 dias de avaliação, apresentando um discreto ganho de massa entre 14 e 21 dias, o que provavelmente ocorreu pela formação de novas ligações químicas no material por influência da droga vegetal na solução tampão; ou pela lavagem insuficiente

para a remoção do sal, precipitação do mesmo nas amostras e, portanto, ganho de massa. Resultados semelhantes foram obtidos por Cruz (2015).

Da Figura 69 destaca-se que: com exceção da avaliação com 21 dias na concentração de 5%, quando a média da massa teve um pequeno acréscimo da avaliação inicial para final (média negativa), quando foi utilizada a solução PBS/Lisozima, nas demais situações, as médias reduziram e foram significativas entre todas as avaliações e em todas as concentrações nas avaliações com 7 dias e com 14 dias e na concentração de 10% em todas as três avaliações.

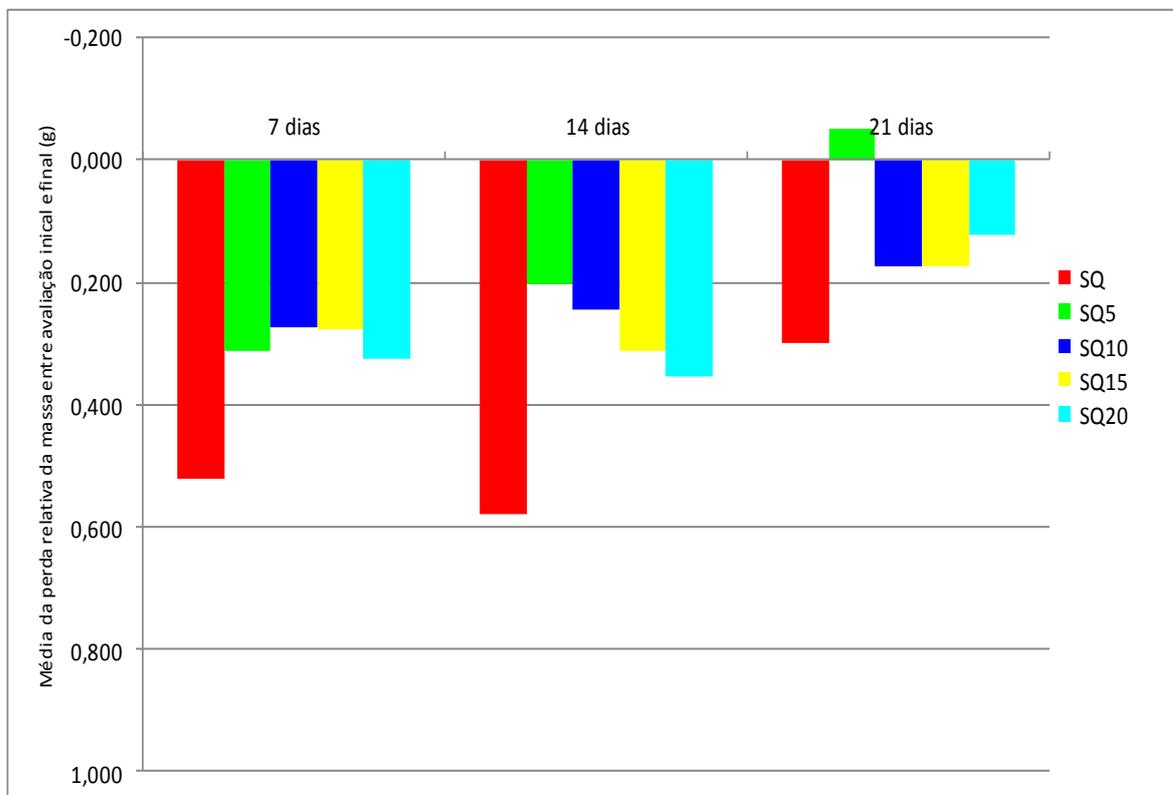


Figura 69 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de PBS/Lisozima (Autor, 2016).

A média da diferença relativa aumentou (-0,051 g) na avaliação com 21 dias na concentração de 5% e reduziu de 0,121 g a 0,580 g nas demais combinações, sendo que as menores reduções ocorreram nas avaliações com 21 dias em cada concentração. Diferenças significativas entre as avaliações foram registradas na medida inicial, medida final e na diferença relativa na concentração de 5%, assim como na medida final e na diferença relativa na concentração com 20%. Verifica-se diferenças significativas: na concentração de 5% entre 7 dias com 14 dias e com 21

dias na medida inicial, entre 21 dias com cada uma das avaliações na medida final e entre as três avaliações na variável diferença relativa. Na concentração de 20% entre 14 dias com cada uma das avaliações na medida final e entre 21 dias com cada uma das avaliações na concentração de 20% (Apêndice M).

De uma maneira geral, os *scaffolds* de quitosana sofreram maior degradação quando comparado com os *scaffolds* que continham a droga vegetal incorporada, tanto na solução de PBS como na de PBS/Lisozima. Como já se sabe, formas muito desacetiladas de quitosana (DA > 85%) exibem taxas de degradação relativamente baixas, enquanto formas com graus de desacetilação menores sofrem degradação mais rapidamente (Kamiyama, Onishi e Machida, 1999; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005). Como no presente estudo, a quitosana utilizada possuía um grau de desacetilação entre 75 e 85%, justifica-se a degradação da mesma em períodos de tempo relativamente curtos como os avaliados.

Os resultados demonstraram ainda que os *scaffolds* sofreram degradação quando em contato com a solução de PBS/Lisozima, principalmente nos dias 7 e 14 de avaliação, entretanto essa degradação foi menos acentuada quando comparada com a solução de PBS. Para Dallan (2005), o solvente de uma determinada solução é suficiente para a degradação de filmes de quitosana.

Esses resultados corroboram com os de Oliveira *et al.* (2012) que, avaliando a incorporação de carbonato de cálcio em filmes de quitosana perceberam que a degradação dos filmes ocorreu basicamente devido a presença do tampão PBS e não devido à ação da lisozima, e também por influência do pH das soluções, o que provavelmente foi observado devido ao comportamento eletrostático da quitosana e da lisozima que são diferenciados de acordo com o pH do meio.

Já Holanda (2011) e Souza (2012) trabalhando com filmes, e Cruz (2015) avaliando *scaffolds* em seus estudos, observaram uma maior degradação das amostras em contato com a solução de PBS/Lisozima.

Na solução de saliva artificial (Figura 70) foi possível observar ganho de massa em todas as avaliações, não ocorrendo biodegradação dos *scaffolds*, pelo menos nesses períodos de avaliação (7, 14 e 21 dias). O aumento de massa pode ser atribuído à presença dos constituintes sólidos da saliva que foi incorporada aos *scaffolds*.

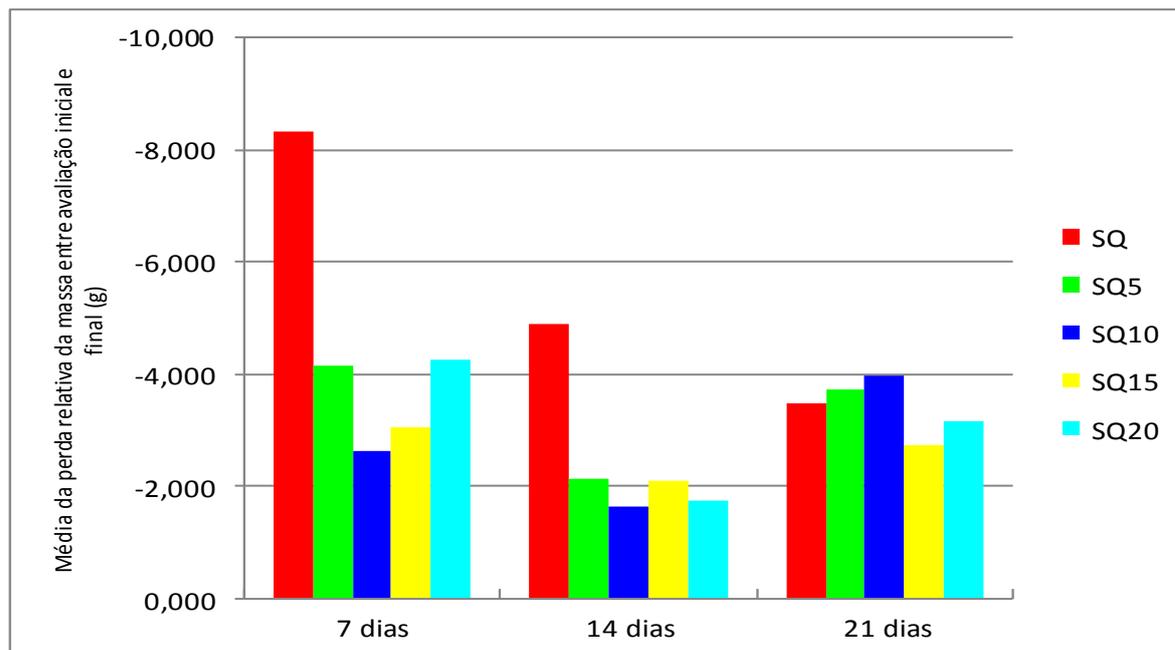


Figura 70 – Média da perda relativa por concentração e dias de avaliação, empregando-se a solução de saliva artificial (Autor, 2016).

Com exceção da avaliação com 21 dias na concentração 0%, nas demais concentrações e dias de avaliação foi comprovada diferenças significativas entre as medidas inicial e final. As únicas diferenças significativas entre as avaliações foram registradas na variável diferença relativa na concentração de 10%, 15% e 20% e nas medidas inicial e final na concentração de 15%; e para as variáveis com diferenças significativas se comprova diferença na concentração de 10%, entre 21 dias com cada uma das outras duas avaliações na variável diferença relativa; na concentração de 15%, entre 7 dias e 21 dias na medida inicial, entre 7 e as outras duas avaliações na medida final e entre 14 dias e cada uma das outras duas avaliações na variável diferença relativa. Já na concentração de 20%, entre 7 e 14 dias na variável diferença relativa (Apêndice N).

Na avaliação com 7 dias (Apêndice O), verificou-se diferença significativa entre as soluções na medida final e na variável diferença relativa em cada uma das concentrações. Para as situações com diferenças significativas se salienta que: as médias da massa, na medida final, foram correspondentemente menos elevadas na solução de PBS e mais elevadas na saliva artificial, exceto na concentração 0% que teve as médias iguais nas duas soluções PBS e PBS/Lisozima e mais elevada na saliva artificial; na variável diferença relativa, as médias foram de ganho (valores negativos) na saliva artificial e de perda nas outras duas soluções; as médias das

diferenças relativas foram mais elevadas na solução de PBS/Lisozima do que na de PBS nas concentrações de 0% e 5%, e mais elevadas na solução de PBS do que na de PBS/Lisozima nas concentrações de 10%, 15% e 20%. Os testes de comparações múltiplas mostraram diferenças significativas: na medida final, entre a saliva artificial e as outras duas soluções nas concentrações 0% e 5% e entre as três soluções nas concentrações de 10%, 15% e 20%; na variável diferença relativa, entre as três soluções nas concentrações de 0%, 10%, 15% e 20% e entre a saliva artificial com cada uma das outras soluções na concentração de 5%.

Na avaliação com 14 dias (Apêndice P) verificou-se diferença significativa entre as soluções na medida final e na variável diferença relativa em cada uma das concentrações. Para as situações com diferenças significativas se salienta que: as médias da massa na avaliação final foram correspondentemente menos elevadas na solução PBS e mais elevadas na saliva artificial, exceto na concentração de 15% onde as médias foram iguais nas soluções de PBS/Lisozima e na saliva artificial. Na variável diferença relativa, as médias foram de ganho (valores negativos) na saliva artificial nas concentrações de 0%, 5% e 10% e de perda (médias positivas) nas concentrações de 15% e 20%; as médias das diferenças relativas foram mais elevadas na solução de PBS do que PBS/Lisozima em todas as concentrações. Na medida final, se comprova diferença significativa entre as três soluções nas concentrações 0%, 5% e 10%, entre PBS e cada uma das outras soluções na concentração de 15% e entre PBS/Lisozima com cada uma das outras soluções na concentração de 20%. Na variável diferença relativa constatou-se diferença significativa entre os três pares de soluções nas concentrações 0%, 5%, 10% e 20% e entre PBS com as outras duas soluções na concentração com 15%.

Na avaliação com 21 dias (Apêndice Q) comprovou-se diferença significativa entre as soluções na medida final e na variável diferença relativa em todas as concentrações, além da medida inicial na concentração de 15%. Para as situações com diferenças significativas se ressalta que: as médias da massa na avaliação final foram correspondentemente menos elevadas na solução PBS e mais elevadas na saliva artificial; na variável diferença relativa as médias aumentaram (valores negativos) na saliva artificial e na solução de PBS/Lisozima na concentração de 5%, e de perda nas outras duas situações com valores mais elevados na solução de PBS do que PBS/Lisozima em todas as concentrações.

Na medida final e na variável diferença relativa comprovou-se diferença significativa entre todos os três pares de soluções em todas as concentrações. Na medida inicial, na concentração de 15%, se comprova diferença significativa entre a saliva artificial e cada uma das outras soluções, sendo que no caso a média foi menos elevada na saliva artificial e iguais nas outras duas soluções.

Na solução de PBS, o Apêndice R demonstra que: em cada tempo de avaliação as médias da medida inicial variaram de 0,011 g a 0,017 g e as duas mais elevadas nas concentrações de 15% e 20%; na medida final, as médias variaram de 0,001 g a 0,009 g e oscilaram com a concentração; as médias das perdas relativas variaram de 0,304 g a 0,927 g. Diferenças significativas entre as concentrações foram verificadas na medida inicial em cada tempo de avaliação, na medida final na avaliação com 14 dias e na diferença relativa com 7 e com 14 dias. Para as variáveis com diferenças significativas verificou-se diferenças entre os pares de concentrações: 0%, 5% e 10% das concentrações de 15% e 20% na medida inicial; entre 0% de cada uma das outras concentrações na medida final com 14 dias; na diferença relativa entre 5% e 0%, 15% e 20% com 7 dias; entre 0% com todas as concentrações exceto com 15% e entre 5% e 10% com 15% e 20% com 14 dias.

Na solução de PBS /Lisozima, o Apêndice S mostra que: em cada tempo de avaliação, as médias da medida inicial variaram de 0,012 g a 0,018 g e foram mais elevadas nas concentrações de 15% e 20%; na avaliação final, as medidas variaram de 0,005 g a 0,014 g, sendo menos elevada na concentração 0%; a média da diferença relativa foi - 0,051 g (ganho) na concentração de 5% na avaliação com 21 dias e variou de 0,121 g a 0,580 g nas demais combinações, sendo correspondentemente mais elevada na concentração de 0% em cada uma das avaliações. Com exceção da diferença relativa, na avaliação com 21 dias, comprovou-se diferença significativa entre as concentrações nas demais situações e variáveis. Para as variáveis com diferença significativa entre os pares de concentrações: na medida inicial, as concentrações 0% e 10% diferem das outras três concentrações na avaliação com 7 dias, assim como há diferença entre as três primeiras concentrações com as duas últimas nas avaliações com 14 dias e com 21 dias. Na avaliação final, entre a concentração 0% com cada uma das outras concentrações com 7 dias e 14 dias e entre 0% e 10% com as outras três concentrações com 21 dias. Na diferença relativa entre: 0% com cada uma das

outras concentrações além de 10% com 20% com 7 dias de avaliação, entre 0% das outras concentrações e entre 5% e 10% das outras concentrações com 14 dias.

Na solução de saliva artificial (Apêndice T) ressalta-se que: em cada tempo de avaliação, as médias da medida inicial variaram de 0,012 g a 0,026 g e foram correspondentemente mais elevadas nas concentrações de 0% com 21 dias e nas concentrações de 15% e 20% nas avaliações com 7 dias e 14 dias. Na avaliação final, as medidas variaram de 0,04 g a 0,114 g, sendo mais elevada na concentração 0% com 7 dias e com 14 dias e na concentração com 20% na avaliação com 21 dias. As médias das diferenças relativas foram negativas, o que indica aumento entre a massa inicial e final, sofrendo variação de -1,636 g a -8,319 g, observando-se que nos tempos de 7 dias e 14 dias, os maiores valores ocorreram na concentração 0%; enquanto que, na avaliação com 21 dias, o maior valor absoluto ocorreu com 10%.

Diferenças entre as concentrações foram observadas em cada uma das três variáveis nas avaliações com 7 dias e 14 dias e para as variáveis com diferenças significativas observou-se que: na avaliação com 7 dias, com exceção de 5% com 10% e 15% com 20% comprovou-se diferenças significativas entre os demais pares de concentrações na medida inicial; na medida final, entre 10% com cada um das concentrações com 7 dias; na diferença relativa, entre 0%, 5% e 20% das concentrações 10% e 15%. Na avaliação com 14 dias entre 0% de 10%, 15% e 20% e entre 5% e 20% na medida inicial; já na medida final e na diferença relativa entre 0% e as demais concentrações.

De maneira geral, pode-se afirmar que o SQ sofreu maior processo de biodegradação, durante o período de avaliação entre 7 e 14 dias, sendo essa biodegradação maior quando em contato com a solução de PBS quando comparada com a solução de PBS/Lisozima. E que a saliva artificial não promoveu biodegradação às amostras analisadas durante os períodos de avaliação (7, 14 e 21), fazendo-se necessário aumentar esses dias para uma melhor avaliação do comportamento do material na presença das soluções.

CONCLUSÕES



5 CONCLUSÕES

- O processo utilizado para a obtenção dos filmes e *scaffolds* constituídos de uma matriz polimérica de quitosana e de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E Jarvis mostrou-se eficaz.

- A superfície dos filmes de quitosana e de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E Jarvis se apresentou de maneira uniforme, lisa e plana; enquanto os *scaffolds* apresentaram uma superfície irregular.

- O estudo químico realizado através do FTIR identificou todas as bandas características dos materiais estudados.

- De acordo com a análise do DRX verificou-se que, o grau de cristalinidade das amostras foi reduzido, à medida em que a droga vegetal foi incorporada.

- O estudo morfológico dos *scaffolds*, realizado por MEV e MO, revelou a formação de uma estrutura tridimensional com poros interconectados, além da presença de lamelas dispostas paralelamente na superfície de corte transversal.

- Através da técnica de EDS, pôde-se confirmar a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), próprios dos filmes de quitosana; além Magnésio (Mg) nos filmes e *scaffolds* de quitosana. Nos *scaffolds* ainda foi possível perceber a presença de Silício (Si) e Cálcio (Ca). O Mg, o Si e o Ca são elementos presentes na droga vegetal incorporada aos filmes e *scaffolds* de quitosana.

- O grau de intumescimento demonstrou que as médias das massas foram correspondentemente mais elevadas na forma intumescida do que na condição seca, tanto nos filmes quanto nos *scaffolds* produzidos e neutralizados com NaOH e NH₄OH. Nos *scaffolds*, o intumescimento foi maior quando as amostras foram imersas na solução de saliva artificial, quando comparado com a solução de PBS.

- O teste de molhabilidade demonstrou que todas as amostras apresentaram um perfil hidrofílico e que a presença da droga vegetal promoveu um aumento na hidrofiliabilidade dos *scaffolds*.

- No teste de compressão foi confirmado que a presença da droga vegetal tornou os *scaffolds* mais resistentes à deformação, o que pode estar relacionado à presença de partículas do extrato distribuídas ao longo da amostra.

- As análises de TG/DTG demonstraram que a presença da droga vegetal

nos *scaffolds*, aumentou a velocidade de degradação e diminuiu a estabilidade térmica dos mesmos. Os resultados da análise de DSC corroboraram com os de TG/DTG.

- O ensaio de biodegradação demonstrou que os *scaffolds* sofreram uma maior degradação em contato com a solução de PBS, quando comparada com a solução de PBS/Lisozima; e que a saliva artificial, nos períodos de avaliação, não promoveu biodegradação às estruturas.

- A incorporação da droga vegetal aos *scaffolds* foi confirmada por meio dos resultados obtidos nos ensaios de DRX, MEV, MO, Grau de intumescimento, testes de molhabilidade e de compressão, TG/DTG e DSC.

- Por fim, após todas as caracterizações, pode-se ainda concluir que os *scaffolds* compostos de quitosana com a droga vegetal incorporada na faixa entre 10 e 15% são os melhores a serem utilizados em testes *in vivo*. Isso por que essas amostras apresentaram os melhores resultados nas análises realizadas. Entretanto, dependendo da aplicabilidade dos *scaffolds*, o SQ20 não pode ser descartado.

*SUGESTÕES PARA
TRABALHOS FUTUROS*



6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho foram desenvolvidos *scaffolds* de quitosana com a incorporação da droga vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, na perspectiva da confecção de um sistema de liberação controlada de fármacos com administração da droga vegetal como opção terapêutica. Entretanto, faz-se necessário a realização de outros procedimentos experimentais a fim de alcançar a confecção do referido sistema e sua utilização, dentre eles:

- Realização de análises de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*;
- Realização de ensaios para estudo de liberação controlada do fitocomplexo por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), analisando-se os marcadores químicos e a cinética de liberação de fluxo contínuo e não estático, assemelhando-se à cavidade bucal;
 - Realização de testes empregando-se a saliva humana, a fim de melhor representar a situação clínica da droga vegetal em estudo;
 - Estudo da influência de diferentes métodos de esterilização dos *scaffolds* à base de quitosana, e com a incorporação da droga vegetal em diferentes concentrações;
 - Análise comparativa das características físicas, mecânicas e biológicas dos *scaffolds* quando do uso de diferentes tipos de quitosana (massa molar e grau de desacetilação) visando uma melhoria das características destes materiais.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care**, v. 23, p. 381-389, 2000.
- ADA. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, n. 26, p. 160-167, 2003a.
- ADA. American Diabetes Association. Economics costs of diabetes in US in 2002. **Diabetes Care**, v. 26, p. 917-932, 2003b.
- ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 27, p. S5-S10, 2004.
- ADA. Economic costs of diabetes in the USA in 2012. **Diabetes Care**, v. 36, p. 1033-1046, 2013.
- ALMEIDA, E. R. *et al.* Embriofetotoxic effect and offspring postnatal development exposed to hydroalcoholic fraction extract of *Cissus sicyoides* L. during wistar rats pregnancy. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 5, p. 109-112, dez. 2007.
- ALMEIDA, P. D. V. de; GREGIO, A. M.; MACHADO, M. A.; LIMA, A. A. de; AZEVEDO, L. R. Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract.**, v. 9, p. 72-80, 2008.
- ALVES, C. *et al.* Atendimento odontológico do paciente com diabetes melito: recomendações para a prática clínica. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 97-110, mai./ago., 2006.
- AROF, A. K.; OSMAN, Z. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochim. Acta**, v. 48, p. 993-999, 2003.
- ARREDONDO, A.; ZUÑIGA, A.; PARADA, I. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from Mexico. **Public Health**, v. 119, p. 711-720, 2005.
- 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: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AZEVEDO, V. C. C. *et al.* Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- AZEVEDO, J. R.; SIZILIO, R. H.; BRITO, M. B.; COSTA, A. M. B.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS, M. R. V.; LIRA, A. A. M.; NUNES, R. S. **Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-tpg contendo**

insulina. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimétrica - São Pedro - SP, 2010.

BAHIA, L. R.; ARAUJO, D. V.; SCHAAN, B. D.; DIB, S. A.; NEGRATO, C. A.; LEÃO, M. P. S. *et al.* The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian Public Health System. **Value in Health**, v. 14, p. 137-140, 2011.

BARATA, J. **Terapêuticas alternativas de origem botânica** - efeitos adversos e interações medicamentosas. Lisboa: Lidel edições, 2008.

BARBANTI, H. S.; ZAVAGLIA, C. Polímeros bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13, 2005.

BARBOSA, R. C. Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fístula ruminal. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 119 f, 2011.

BARBOSA, W. L. R. *et al.* Characterisation of flavonoid glycosides in pharmacopoeial preparation of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis using hplc-dad and hplc-ms. **IJPSR**, v. 4, n. 10, p. 3871-3876, 2013.

BARTELS, C. L. Xerostomia information for dentists-helping patients with dry mouth. **RD Online Dental Education**, p. 1-15, 2009.

BASKAR, D.; KUMAR, T. S. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p.767-772, 2009.

BAUMGARTNER, S. *et al.* Optimization of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, p. 125-135, 2000.

BELTRAME, F. L. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.

BELTRAME, F. L. *et al.* Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Braz Arch Biol Techn**, v. 45, p. 21-25, 2002.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 163-169, out./dez., 1999.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BONGAERTS, J. H.; ROSSETTI, D.; STOKES, J. R. The lubricating properties of human whole saliva. **Tribol Lett**, v. 27, p. 277-287, 2007.

BORG, W. P.; SHERWIN, R. S. Classification of diabetes mellitus. **Advances in Internal Medicine**, v. 45, p. 275-295, 2000.

BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p.12-20, 2008.

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas**: uma abordagem multidisciplinar. Niterói - Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Fluminense, 1996, 300p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n° 48** de 16/03/2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de Março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica. p. 60. Distrito Federal, 2006.

BRASIL, Resolução nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/>>. Acesso em: 20 Março de 2015.

BRUCE, P. K. **Química Orgânica**. Volume I e II. Editora Prentice Hall. 4. ed, 2006.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J. RINAUDO, M. An infrared investigation in reaction with chitin and chitosan characterization. **Polym.**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

BHUSAN, M. *et al.* An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, volume I, 2010.

CAMPANA FILHO *et al.* Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANO, J. H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 293-316, 2004.

CAPORALE, J. E.; CALVO, H.; GAGLIARDINO, J. J. Costos de atención médica de personas con diabetes anteriores y posteriores a su hospitalización en Argentina. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 20, n. 6, p. 361-368, 2006.

CARDOSO, M. J. B.; BARBOSA, R. C.; RIES, A.; FIDELIS, T.; FOOK, M. V. L. Ensaio físico-químico e mecânico de membranas de quitosana com cobre, zinco e magnésio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7.1, p. 1-6, 2012.

CARRANZA, F. A. *et al.* **Periodontia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap. 44, p. 657-660.

CARVALHO, L. A. C. *et al.* Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 2: Manifestações Sistêmicas e Oraís de Interesse para o Atendimento Odontológico. **RPG Revista de Pós-Graduação**, v. 10, n. 1, p. 53-58, jan./mar., 2003.

CARVALHO A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 86, n. 1, p. 11-16, 2005.

CHACRA, A. R.; MOISÉS, R. C. M. S. Diabetes Melito: Classificação e Diagnóstico. In: CORONHO V. *et al.* (Ed). **Tratado de Endocrinologia e Cirurgia Endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 924-926.

CHAMBERS, M. S., *et al.* Cevimeline for the treatment of postirradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **Int J Radiation Oncology Biol Phys**, v. 68, n. 4, p. 1102-1109, 2007.

CHEN, X.; ZHENG, L.; WANG, Z.; LEE, C.; PARK, H. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 5915-5918, 2002.

CHIAPPETTA, D. A. *et al.* Comprimidos Bioadhesivos Formulados con Excipientes Hidrofílicos para Uso Bucofaríngeo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 360-365, 2006.

CLEASEN, C.; WHILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

CORRELO, V. M., GOMES, M. E., TUZLAKOGLU, K., OLIVEIRA, J. M., MALAFAYA, P. B., MANO, J. F., NEVES, N. M.; REIS, L. R. Tissue engineering using natural polymers. In: **Byomedical Polymers**, Ed. Jenkins, M. Woodhead Publishing Ltda., Cambridge, 2007.

COSTA, C. C. *et al.* Estudo das manifestações bucais em crianças com diabetes e suas variáveis de correlação. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 374-378, 2004.

CUI, Z. *et al.* Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 111-116, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. Patente brasileira, **PI 9805480-5A**. 12/09/2000.

CRUZ, J. C. *et al.* Salivary characteristics and dental caries. **JADA**, v. 144, n. 5, p. 31-40, 2013.

CRUZ, J. B. Arcabouços de quitosana/agente antineoplásico: síntese, caracterização e aplicação. **Tese** (Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 114f, 2015.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. **Tese**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 194f, 2005.

DAMIAN, C. *et al.* Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, abr./jun., 2005.

DAVIDSON, H. B. **Diabetes Mellitus: diagnóstico e tratamento**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001, p. 289.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M., RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 5983-5990, 2005.

DIB, S. A.; CALLIARI, L. E. P. Diabetes Melito Tipo I. In: CORONHO V. *et al.* **Tratado de Endocrinologia e Cirurgia Endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 928-932.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. **Pharmaceutical Science & Technology**. Today 1 p. 246-253, 1998.

ERBERLY, L. E.; COHEN, J. D.; PRINEAS, R.; YANG, L. Impact of incident diabetes and incident nonfatal cardiovascular disease on 18-year mortality: the multiple risk factor intervention trial research group. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 848-854, 2003.

FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M.C. M. **Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico**. Quim. Nova, v. 32, n. 3, p.672-678, 2009.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. **Economic Impact of Diabetes**. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/content/background-papers-pdf>> Acesso em: 14 de Janeiro de 2015.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. **IDF Diabetes Atlas**. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 09 de Fevereiro de 2016.

FEIO, M.; SAPETA, P. Xerostomia em cuidados paliativos. **Acta Med Port**, v. 18, p. 459-466, 2005.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2007, cap. 2, p. 7-26.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Projeto de Graduação do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 63p, 2009.

FIDÉLES, T. B. Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial. **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 72p, 2010.

FLINK, H.; TEGELBERG, A., LAGERLOF, F. Influence of the time of measurement of unstimulated human hole saliva on the diagnosis of hyposalivation. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 553-559, 2005.

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

FOOK, A. C. B. M. Produção e caracterização de arcabouços compósitos HÁ/Biopolímero para engenharia de tecidos. 2012. **Tese** (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2012.

FRAGA, A. F. *et al.* **Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeitos da adição de hidróxido de sódio**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, Anais, Foz de Iguaçu: IPEN, 2006, p. 1715-1725.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 337-355, 2006.

FURTADO, G. T. F. S. Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma. **Dissertação**. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 79f. 2014.

GERSTEIN, H. Fasting versus postload glucose levels. Why the controversy? **Diabetes Care**, v. 24, p. 1853-1855, 2001.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química 100**, jan./mar., 2006.

GREGORI, C.; COSTA, A. A.; CAMPOS, A. C. O paciente com diabetes melito. **RPG Revista de Pós-Graduação**, v. 6, n. 2, p. 166-174, abr./jun., 1999.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities - **Science**, 295, p.1009, 2002.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 46, n. 1, Fevereiro, 2002.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochímica Acta**, v. 444, 2006, p. 128-133.

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

HOSSAIN, P.; KATAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world - a growing challenge. **N Engl J Med.**, v. 356, n. 63, p. 213-215, 2007.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, p. 162-169, 2001.

HSU, S. H.; WHU, S. W.; TSAI, C. L. *et al.* Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Journal of Polymer Research**, v. 11, p. 141-147, 2004.

IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; HAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. G. Effect of chitosan on a periodontal pathogen porphyromonasgingivalis. **Int. J. Pharm**, v. 235, p. 7-121, 2002.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. A Nomenclatura em Análise Térmica – Parte II. **Cerâmica**, v. 34, p. 163-164, 1988.

IONASHIRO, E. Y. *et al.* 2-methoxybenzylidenepyruvate with heavier trivalent lanthanides and yttrium(III): Synthesis and characterization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 92, n. 3, p. 953–959, 2008.

IMAGAWA, A. *et al.* A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 301-307, 2000.

ISER, B. P. M. *et al.* Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 305-314, abr./jun., 2015.

JUNIOR, A. P. D.; ALVES, T. V. G.; TAVARES, E. J. M.; MOURA, M. R.; OLIVEIRA, M. E. C.; COSTA, C. E. F.; COSTA, R. M. R.; JUNIOR, J. O. C. S. **Caracterização térmica de nanopartículas de quitosana**. ABRATEC - VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, p. 1-5, 2010.

KAHN, H. **Difração de Raios X**. Disponível em:
http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf.
Acesso em: 23 de Novembro de 2015.

KALLUF, L. J. H. **Fitoterapia funcional**: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos. 1. ed. São Paulo: VP Editora, 2008. 304p.

KAMIYAMA, K.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodisposition characteristics of n-succinyl-chitosan in normal and tumor-bearing mice. **Bio Pharm Bull**, v. 22, p. 179-186, 1999.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 497-508, 2008.

KASYAP, N. *et al.* Designe and evaluation of biodegradably, biosensitive in situ gelling system for pulsatile delivery of insulin. **Biomaterials**, v. 28, p. 2051-2060, 2007.

KAWANO, Y. **Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho**. Técnicas de caracterização de polímeros. Coordenação Sebastião V. Canevarolo JR. São Paulo: Artliber Editora, 2007, p. 17.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KONTAKIOTIS, E. G.; TZANETAKIS, G. N.; LOIZIDES, A. L. A comparative study of contact angles of four different root canal sealers. **J Endod.**, v. 33, p. 299-302, 2007.

KHAFAGY, EL-S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. Japan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.1521-1546, 2007.

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

KUMAR, M. N. V. R. *et al.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6017-6084, 2004.

LAUDA, P. A.; SILVEIRA, B. L.; GUIMARÃES, M. B. Manejo Odontológico do Paciente Diabético. **Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**, v. 2, n. 9, p. 81-87, 1998.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 6, p. 176-180.

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

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PEREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco ubí). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34, n. 2, p. 120-124, 2000.

LOMBA, M.; LOMBA, A. Objetivo Saúde. **Especialidades Médicas**. 2. ed., v. 1, 2005, cap. 6, p. 142-143.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 501p.

LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, p. 174 -183, 2008.

LUO, D.; SANG, L.; WANG, X.; XU, S. LI, X. Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. **Materials Letters**, v. 65, p. 2395-2397, 2011.

MACÊDO, M. O. C.; MACÊDO, H. R. A.; SANTOS, Z. M.; PEREIRA, M. R.; ALVES JR, C. Avaliação da modificação de membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio para aplicações biomédicas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 29, n. 1-2, p. 31-36, 2010.

MADSEN, K. D.; SANDER, C.; BALDURSDOTTIR, S.; PEDERSEN, A. M. L.; JACOBSEN, J. Development of an ex vivo retention model simulating bioadhesion in the oral cavity using human saliva and physiologically relevant irrigation media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, p. 373-381, 2013.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação controlada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, out./dez., 2002.

MARRECO, P. R.; MOREIRA, P. L.; GENARI, S. C.; MORAES, A. M. Effect of Different Sterilization Methods on the Morphology.Mechanical Properties, and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71A, p. 268-277, 2004.

MATHEUS, D. R.; AHMED, S.; VILAR, L. Tratamento Farmacológico do Diabetes Tipo 2. In: VILLAR L.; CASTELLAR, E.; MOURA, E.; LEAL, E.; MACHADO, A. C.; TEIXEIRA, L.; CAMPOS, R. **Endocrinologia Clínica**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001, p. 535-557.

MENDONÇA, R. H.; COSTA, M. F.; THIRÉ, R. M. S. M. **Produção de arcabouços tridimensionais bioativos para bioengenharia óssea**. COLAOB - Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999, 116p.

MIKICH, S. B.; SILVA, S. M. Composição Florística e Fenologia das Espécies Zoocóricas de Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual no Centro-Oeste do Paraná, BRASIL. **Acta Botânica Brasílica**, v. 15, n. 1, p. 89-113, 2001.

MINCHEVA, R. *et al.* Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials. **E-Polymers**, v. 58, p.1-11, 2004.

MOMM, F. *et al.* Different saliva substitutes for treatment of xerostomia following radiotherapy. **Strahlenther Onkol**, v. 181, n. 4, p. 231-236, 2005.

MOORE, H. *et al.* Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, 2004.

NASCIMENTO, I. V. S. R. Desenvolvimento de sistemas quitosana/piperina para liberação controlada de fármacos. **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 80f, 2014.

NEGRI, G. Diabetes Melito: plantas medicinais e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NEIVA, P. Diabetes: o início de uma revolução. **Revista VEJA**. São Paulo: Editora Abril, n. 39, set., 2005.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas Mediciniais**: guia para profissional de saúde. XIII-XXVII, São Paulo: Premier, 2002.

NEVILLE, B.W. *et al.* Manifestações orais e doenças sistêmicas. In: _____. **Patologia oral e maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 601, 2004.

NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds. **Materials**, v. 2, p. 374-398, 2009.

OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes: passado, presente e futuro**. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. Diabetes Mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento interdisciplinar. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 1-6.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, R. A.; FREITAS, P. A. B.; CARDOSO, M. J. B.; BARBOSA, R. C.; PINTO, M. R. O.; FOOK, M. V. L. **Síntese e caracterização de compósito quitosana com carbonato de cálcio extraído de casca de ovo para possíveis aplicações como curativo**. ENECT - Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia da UEPB, 2012.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade**: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde/ Organização Pan-Americana de Saúde. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em: 30 de Janeiro de 2013.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M. et al. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 237-247, 2000.

PALUSZKIEWICZ, C., STODOLAK, E.; HASIK, M.; BLAZEWICZ, M. Ft-Ir Study of Montmorillonite-Chitosan Nanocomposite Materials, **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, v. 79, n. 4, p. 784-788, 2011.

PARIZE, A. L.; SOUZA, T. C. R.; BRIGHENTE, I. M. C. **Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana contendo o corante de urucum.** Simpósio Brasileiro de Urucum. João Pessoa, p. 4, 2006.

PATEL, D.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 239-250, 2012.

PEPATO, M. T. *et al.* **Efeito da administração oral crônica de *Cissus sicyoides* no metabolismo de carboidratos.** Anais do XV Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Águas de Lindóia – SP, 1998.

PEPATO, M. T. *et al.* *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 15-20, 2003.

PINHEIRO, G. K. **Desenvolvimento de “scaffolds” a partir de compósitos contendo blendas poliméricas à base de quitosana para reconstituição tecidual.** Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2008.

PORTER, S. R.; SCULLY, C.; HEGARTY, A. M. An update of the etiology and management of xerostomia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 97, p. 28-46, 2004.

PRASHANTH, K. V. H.; KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 27- 33, 2002.

PREETHA, A.; BANERJEE, R. Comparison of artificial saliva substitutes. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 2, p. 178-186, 2005.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. **Rang and Dale's Pharmacology**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAVI KUMAR, N. M. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

RESS, T. D.; HALLMON, W. W. Modificadores sistêmicos. In: WILSON, T. G.; KENNETH, S. K. **Fundamentos de Periodontia**. 1. ed. São Paulo: Quintessence, 2001, p. 241-278.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm.**, USP, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

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

RIZVI, S.; MISHRA, N. Traditional Indian Medicines Used for the Management of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, p. 1-11, 2013.

RODRIGUES, I. R. Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a base de Quitosana com PVP e PVA para Aplicação na Liberação Controlada de Fármacos. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 107f, 2006.

RODRÍGUEZ, I. C. *et al.* Sistemas de liberación Bioadhesivos. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n.1, p.1-14, 2000.

ROGER, P.; DELETTRE, J.; BOUIX, M.; BE´AL, C. Characterization of Streptococcus salivarius growth and maintenance in artificial saliva. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 631-641, 2011.

ROSA, R.; BARCELOS, A.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

ROSENDO, R. A. Avaliação da eficácia da *Cissus verticillata* (L.), em portadores de diabetes melito tipo 2, através da concentração de glicose na saliva e no sangue. **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Odontologia), Universidade Federal da Paraíba/CCS, João Pessoa, 95f, 2009.

SALGADO J. A.; COUTINHO P. O.; REIS, L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Futures Trends. **Macromol. Biosci.**, v. 4, p. 743, 2004.

SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. **Tese** (Doutorado em Ciências - Área Química Analítica - Departamento de Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004, 124f.

SANTOS, H. B. Ensaio clínico de fase II com as folhas de *Cissus sicyoides* L. Vitaceae em indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos tipo 2. **Tese** (Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba/CCS, João Pessoa, 2007, 167p.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 327-334, 2012.

SAMPAIO, G. Y. H.; FOOK, A. C. B. M.; FIDÉLES, T. B.; FURTADO, G. T.; FOOK, M. V. L. **Arcabouços biodegradáveis de quitosana: efeito da reticulação com genipina**. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.

SARMENTO, B. *et al.* Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p.1-7, 2006.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4. ed. São Paulo: Manole, 2002, cap. 1, p. 1-38.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2014-2015/Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC Farmaceutica, p. 1-3, 2015.

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

SILVA, G. A. Estudo toxicológico e farmacológico dos extratos de *Cissus sicyoides* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 143-155, 1996.

SILVA, G. A.; AKISUE, G.; OGA, S. Ensaio Farmacológico de Ação Hipoglicemiante dos Extratos Fluidos de *Cissus sicyoides* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 144-155, 1996.

SILVA, M. E. R. Alergia à insulina. **Diabetes, Saúde & Cia**, v. 13, n. 3, p. 3, 2001.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêutica e avanços. **Química nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, J. A., *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p.125-131, 2010.

SILVERMAN Jr., S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 9, p. 84-92, 2004.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNDY, C. J.; WESS, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2004.

SONESSON, A. M.; ELIASSON, B. L.; MATSSON, A. L. Minor salivary gland secretion in children and adults. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 535-539, 2003.

SOUSA, W. J. B. Desenvolvimento de filmes híbridos de quitosana/ Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E. **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012, 98p.

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

SPITERI, M.; ATTARD, E.; SERRACINO-INGLOTT, A.; AZZOPARDI, L. Compilation of a herbal medicine formulary for herbal substances in Malta and its usefulness amongst healthcare professionals. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, p. 22-25, 2013.

TAKEUCHI, H. *et al.* Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **J Control Release**, v. 86, p. 235-242, 2003.

TEIXEIRA, L.; MACHADO, A. C. Diabetes Mellitus - Classificação e Diagnóstico. In: VILLAR, L.; CASTELLAR, E.; MOURA, E.; LEAL, E.; MACHADO, A. C.; TEIXEIRA, L.; CAMPOS, R. **Endocrinologia Clínica**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001, p. 511-523.

THEIN-HAM, W. W.; KITIYANANT, Y. Chitosan *scaffolds* for *in vitro* buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 92-101, 2007.

THEIN-HAM, W. W.; KITIYANANT, Y.; MISRA, R. D. K. Chitosan as scaffolds matrix for tissue in engineering. **Materials Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 1062-1075, 2008.

TIĞH, R. S.; KARAKEÇILI, A.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. In vitro characterization of chitosan *scaffolds*: influence of composition and deacetylation degree. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 18, p. 1665-1674, 2007.

TÓFOLI, G. R. *et al.* Tratamento odontológico em pacientes com diabetes mellitus. **R. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 59, p.306-310, 2005.

TOLEDO, M. *et al.* Antochyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides* L.). **Food Science**, v. 48, p. 1368-1369, 2003.

TOMAZ, V. G.; MORAES, A. M. **Incorporação de extrato de alecrim em membranas de alginato e quitosana**. COBEQIC – XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp, Campinas, São Paulo, 2015.

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

TRINDADE, C. G. N. Obtenção de membranas de quitosana modificadas e estudo das suas propriedades térmicas e permeabilidade. **Dissertação**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2001, cap. 2, p. 17-43.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. **Material Science of Chitin and Chitosan**, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C. *et al.* **Ensaio toxicológicos clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae).** Anais do X Encontro de Iniciação Científica da UFPB. Ciências da Vida, Pró-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - João Pessoa: Ed. Universitária, 2002, 99p.

VASCONCELOS, T. H. C. Ensaio toxicológicos pré-clínico e clínico com as folhas de *Cissus sicyoides* L. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba/CCS, João Pessoa, 2004, 178p.

VASCONCELOS, T. H. C. *et al.* Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 583-591, out./dez., 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* Plantas medicinais: cura segura? **Revista Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VIANA, G. S. B. *et al.* Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 9, p. 1-7, 2004.

VILLANOVA, J. C. O., *et al.* Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

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

WHITING, D.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C. E.; SHAW, J. Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Issue 94, p. 311-321, 2011.

WHO, (2012). **World Health Organization**. [Online] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>. Acesso em 02/12/2015.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p.185-192, 2005.

YANG, B.; LI, X.; SHI, S.; KONG, X.; GUO, G.; HUANG, M.; LUO, F.; WEI, Y.; ZHAO, X; QIAN, Z. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. **Carbohydrate polymers**, v. 80, p. 860-865, 2010.

YUAN, Q.; SHAH, J.; HEIN, S.; MISRA, R. D. K. Controlled and Extended Drug Release Behavior of Chitosan-Based Nanoparticle Carrier. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1140-1148, 2010.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal Treatment of Chitosan in Various Conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394-400, 2010.

APÊNDICES



APÊNDICE A – Análise de Massa: Estatísticas da massa segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e *scaffolds*.

Tipo	Concentração	Avaliação			Valor de p
		Antes Média ± DP (Mediana)	Depois Média ± DP (Mediana)	Diferença absoluta Média	
• Filme	5%	0,74 ± 0,01 (0,74) ^(A)	0,57 ± 0,00 (0,56) ^(A)	0,17	p ⁽¹⁾ = 0,250
	10%	0,79 ± 0,01 (0,79) ^(B)	0,59 ± 0,01 (0,60) ^(A)	0,20	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	0,90 ± 0,01 (0,90) ^(C)	0,69 ± 0,02 (0,69) ^(B)	0,21	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	0,99 ± 0,01 (0,99) ^(D)	0,74 ± 0,01 (0,74) ^(C)	0,25	p ⁽¹⁾ = 0,250
	Valor de p	p⁽²⁾ < 0,001*	p⁽²⁾ < 0,001*	p⁽²⁾ = 0,437	
• Scaffold	5%	0,79 ± 0,03 (0,77) ^(A)	0,68 ± 0,02 (0,67) ^(A)	0,11	p ⁽¹⁾ = 0,250
	10%	0,85 ± 0,03 (0,83) ^(B)	0,75 ± 0,03 (0,73) ^(B)	0,10	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	0,95 ± 0,03 (0,94) ^(C)	0,84 ± 0,03 (0,83) ^(C)	0,11	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	1,02 ± 0,01 (1,02) ^(D)	0,91 ± 0,01 (0,90) ^(D)	0,11	p ⁽¹⁾ = 0,250
	Valor de p	p⁽²⁾ < 0,001*	p⁽²⁾ < 0,001*	p⁽³⁾ = 0,072	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ = 0,100	p⁽³⁾ < 0,001*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados

(2): Através do teste Kruskal Wallis com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos Filme x Scaffold.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE B – Análise de volume: Estatísticas do volume segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e *scaffolds*.

Tipo	Concentração	Avaliação		Diferença absoluta Média	Valor de p
		Antes Média ± DP (Mediana)	Depois Média ± DP (Mediana)		
• Filme					
	5%	3316,32 ± 1176,95 (2983,68)	1865,37 ± 459,65 (1860,71)	1450,95	p ⁽¹⁾ = 0,250
	10%	3767,33 ± 606,19 (3507,75)	2018,12 ± 369,35 (2044,60)	1749,20	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	3946,24 ± 1174,80 (3813,47)	1990,92 ± 484,60 (2228,70)	1955,32	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	3628,70 ± 680,20 (3682,58)	2111,73 ± 412,38 (2067,42)	1516,96	p ⁽¹⁾ = 0,250
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,910	p⁽²⁾ = 0,887	p⁽²⁾ = 0,826	
• Scaffold					
	5%	16874,90 ± 1359,33 (17637,81)	9082,89 ± 534,39 (9333,78)	7792,01	p ⁽¹⁾ = 0,250
	10%	16689,10 ± 2182,36 (15977,29)	7795,40 ± 1107,73 (7847,27)	8893,70	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	17846,42 ± 1067,96 (17678,77)	8664,08 ± 753,39 (8885,27)	9182,35	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	16694,43 ± 1873,92 (16305,63)	8952,69 ± 449,67 (8727,23)	7741,75	p ⁽¹⁾ = 0,250
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,776	p⁽²⁾ = 0,400	p⁽²⁾ = 0,459	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados

(2): Através do teste Kruskal Wallis com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos Filme x Scaffold.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE C – Análise de densidade: Estatísticas da densidade segundo a incorporação da droga vegetal nos filmes e *scaffolds*.

Tipo	Concentração	Avaliação		Diferença absoluta Média	Valor de p
		Antes Média ± DP (Mediana)	Depois Média ± DP (Mediana)		
• Filme	5%	0,00024 ± 0,00008 (0,00025)	0,00032 ± 0,00008 (0,00031)	0,00008	p ⁽¹⁾ = 0,500
	10%	0,00021 ± 0,00003 (0,00022)	0,00030 ± 0,00006 (0,00029)	0,00009	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	0,00024 ± 0,00007 (0,00023)	0,00036 ± 0,00009 (0,00031)	0,00012	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	0,00028 ± 0,00006 (0,00027)	0,00036 ± 0,00007 (0,00036)	0,00008	p ⁽¹⁾ = 0,250
Valor de p		p⁽²⁾ = 0,599	p⁽²⁾ = 0,622	p⁽²⁾ = 0,963	
• Scaffold	5%	0,00005 ± 0,00000 (0,00005)	0,00008 ± 0,00000 (0,00008)	0,00003	p ⁽¹⁾ = 0,250
	10%	0,00005 ± 0,00001 (0,00006)	0,00010 ± 0,00001 (0,00010)	0,00005	p ⁽¹⁾ = 0,250
	15%	0,00005 ± 0,00000 (0,00005)	0,00010 ± 0,00001 (0,00010)	0,00004	p ⁽¹⁾ = 0,250
	20%	0,00006 ± 0,00001 (0,00006)	0,00010 ± 0,00000 (0,00010)	0,00004	p ⁽¹⁾ = 0,250
Valor de p		p⁽²⁾ = 0,157	p⁽²⁾ = 0,099	p⁽²⁾ = 0,082	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,513	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,513	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,050*	p⁽³⁾ = 0,513	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as avaliações antes e depois em cada tipo de densidade e concentração.

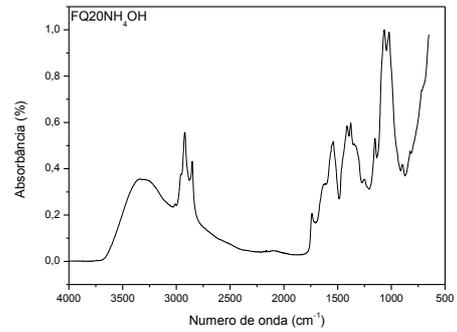
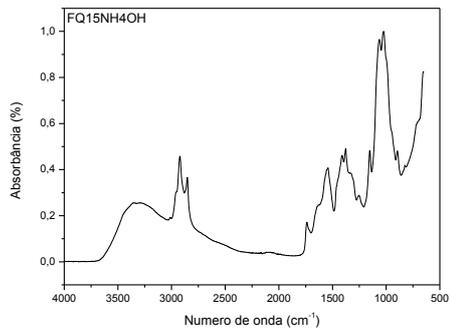
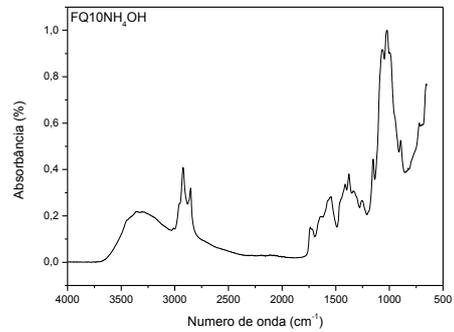
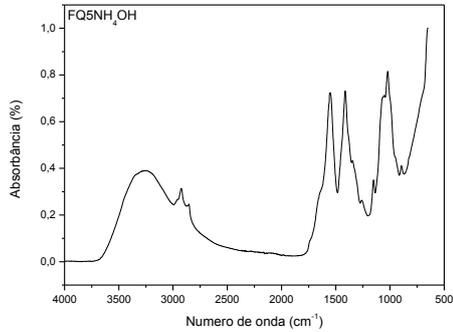
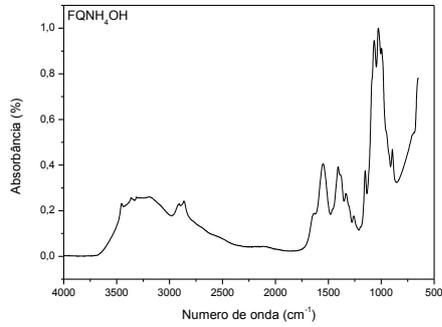
(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações em cada avaliação e na diferença com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos: Filme x Scaffold e cada concentração e avaliação e na diferença.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

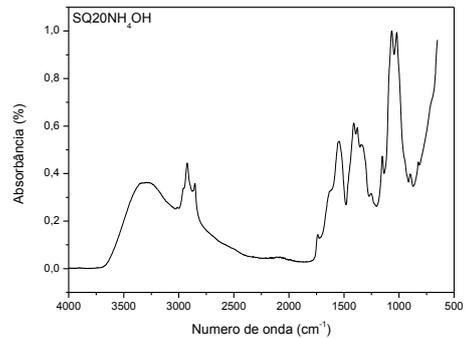
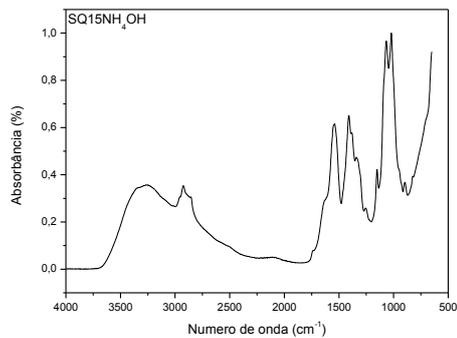
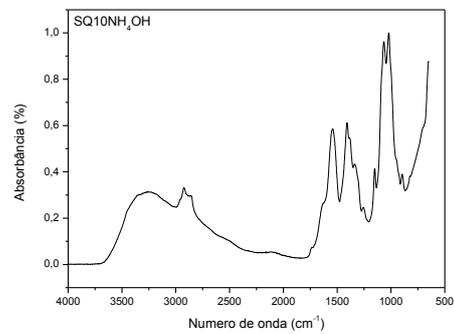
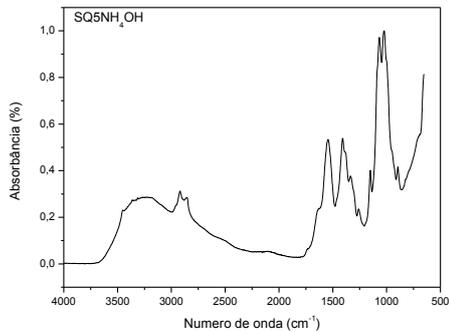
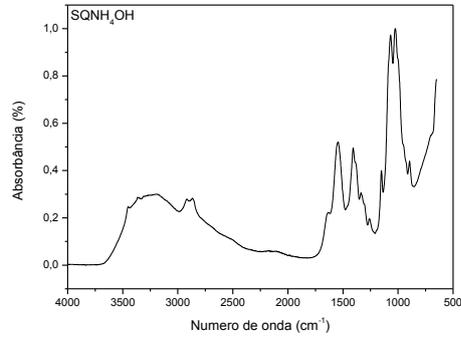
Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE D – Espectros de infravermelho dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NH_4OH .



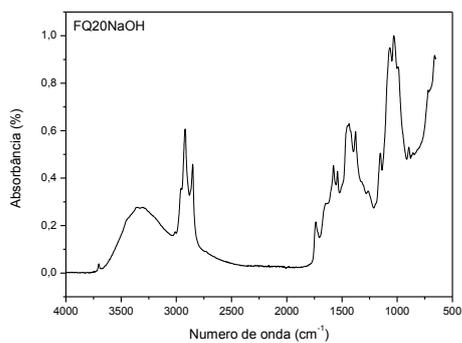
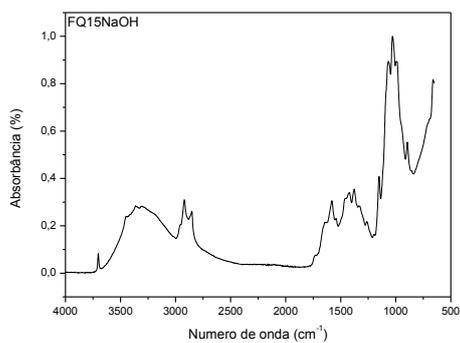
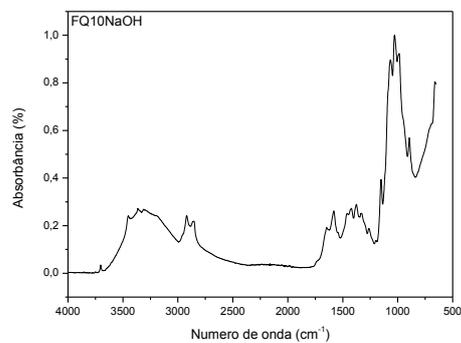
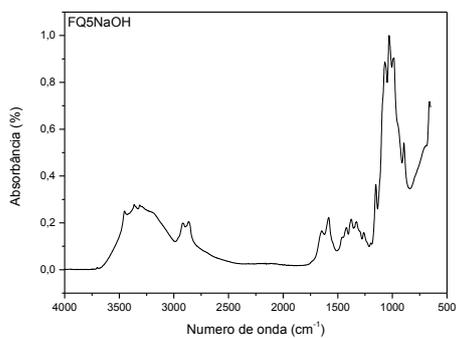
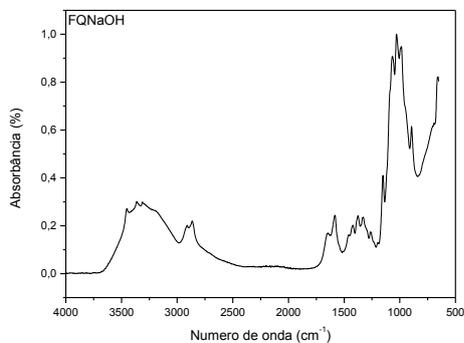
Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE E – Espectros de infravermelho dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, neutralizados com NH_4OH .



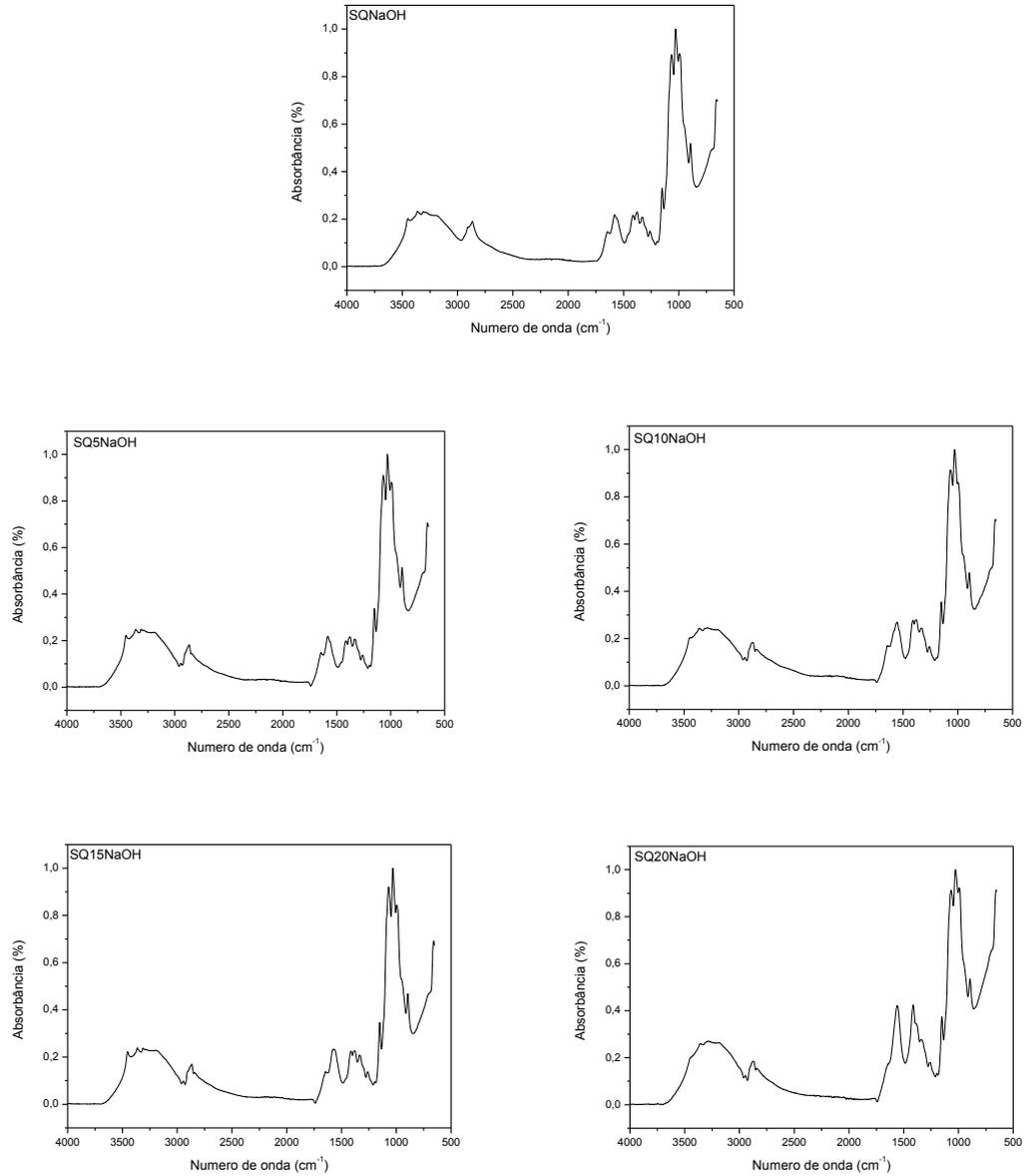
Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE F – Espectros de infravermelho dos FQ, FQ5, FQ10, FQ15 e FQ20, neutralizados com NaOH.



Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE G – Espectros de infravermelho dos SQ, SQ5, SQ10, SQ15 e SQ20, neutralizados com NaOH.



Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE H – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa por tipo, concentração e a forma na concentração, segundo a neutralização com NH₄OH.

Tipo	Concentração	Forma da Massa		Diferença absoluta Média	Valor de p
		Seca	Intumescida		
		Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)		
• Filme	0%	0,016 ± 0,003 (0,015) ^(A)	0,079 ± 0,031 (0,073) ^(A)	0,063 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,034 ± 0,004 (0,034) ^(B)	0,068 ± 0,008 (0,068) ^(A)	0,034 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,029 ± 0,001 (0,029) ^(C)	0,051 ± 0,003 (0,052) ^(B)	0,023 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,038 ± 0,003 (0,038) ^(BD)	0,071 ± 0,005 (0,071) ^(A)	0,033 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,055 ± 0,016 (0,066) ^(D)	0,097 ± 0,030 (0,114) ^(A)	0,043 ^(AB)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ < 0,001*	p⁽²⁾ = 0,037*	p⁽²⁾ = 0,005*	
• Scaffold	0%	0,008 ± 0,001 (0,008) ^(A)	0,107 ± 0,015 (0,104) ^(A)	0,099 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,012 ± 0,001 (0,011) ^(B)	0,123 ± 0,024 (0,124) ^(A)	0,112 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,015 ± 0,002 (0,015) ^(C)	0,153 ± 0,008 (0,148) ^(B)	0,138 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,017 ± 0,001 (0,017) ^(D)	0,156 ± 0,014 (0,154) ^(B)	0,140 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,015 ± 0,002 (0,015) ^(C)	0,118 ± 0,023 (0,128) ^(A)	0,103 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,003*	p⁽²⁾ = 0,004*	
Valor de p	0%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,0222*	p⁽³⁾ = 0,008*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as avaliações antes e depois em cada tipo de densidade e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações em cada avaliação e na diferença com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos: Filme x Scaffold e cada concentração e avaliação e na diferença.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE I – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa por tipo, concentração e a forma na concentração, segundo a neutralização com NaOH.

Tipo	Concentração	Forma da Massa		Diferença absoluta Média	Valor de p
		Seca Média ± DP (Mediana)	Intumescida Média ± DP (Mediana)		
• Filme	0%	0,020 ± 0,002 (0,020) ^(A)	0,040 ± 0,002 (0,040) ^(A)	0,019 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,034 ± 0,005 (0,031) ^(B)	0,064 ± 0,009 (0,060) ^(B)	0,031 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,036 ± 0,005 (0,037) ^(BD)	0,066 ± 0,009 (0,062) ^(B)	0,030 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,041 ± 0,004 (0,040) ^(CD)	0,078 ± 0,006 (0,075) ^(C)	0,038 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,048 ± 0,008 (0,047) ^(C)	0,094 ± 0,015 (0,091) ^(C)	0,046 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,001*	
• Scaffold	0%	0,008 ± 0,001 (0,008) ^(A)	0,093 ± 0,018 (0,092) ^(A)	0,085 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,009 ± 0,001 (0,009) ^(A)	0,117 ± 0,017 (0,105) ^(BC)	0,108 ^(BC)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,008 ± 0,001 (0,008) ^(A)	0,106 ± 0,009 (0,101) ^(AC)	0,098 ^(AC)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,012 ± 0,001 (0,012) ^(B)	0,136 ± 0,017 (0,136) ^(B)	0,124 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,011 ± 0,001 (0,012) ^(B)	0,108 ± 0,007 (0,106) ^(AC)	0,097 ^(AC)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,009*	p⁽²⁾ = 0,012*	
Valor de p	0%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,022*	p⁽³⁾ = 0,008*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as avaliações antes e depois em cada tipo de densidade e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações em cada avaliação e na diferença com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos: Filme x Scaffold e cada concentração e avaliação e na diferença.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE J – Análise de intumescimento em PBS: Estatísticas da massa seca, intumescida e diferença entre as soluções utilizadas no processo de neutralização e concentração da droga vegetal.

Tipo	Concentração	Solução	Forma da massa		Diferença Absoluta Média	
			Seca	Intumescida		
			Média ± DP (Mediana)	Média ± DP (Mediana)		
• Filme	0%	NaOH	0,020 ± 0,002 (0,020)	0,040 ± 0,002 (0,040)	0,019	
		NH ₄ OH	0,016 ± 0,003 (0,015)	0,079 ± 0,031 (0,073)	0,063	
		Valor de p	p^(t) = 0,056	p^(t) = 0,008*	p^(t) = 0,008*	
	5%	NaOH	0,034 ± 0,005 (0,031)	0,064 ± 0,009 (0,060)	0,031	
		NH ₄ OH	0,034 ± 0,004 (0,034)	0,068 ± 0,008 (0,068)	0,034	
		Valor de p	p^(t) = 0,690	p^(t) = 0,690	p^(t) = 0,341	
	10%	NaOH	0,036 ± 0,005 (0,037)	0,066 ± 0,009 (0,062)	0,030	
		NH ₄ OH	0,029 ± 0,001 (0,029)	0,051 ± 0,003 (0,052)	0,023	
		Valor de p	p^(t) = 0,016*	p^(t) = 0,008*	p^(t) = 0,048*	
	15%	NaOH	0,041 ± 0,004 (0,040)	0,078 ± 0,006 (0,075)	0,038	
		NH ₄ OH	0,038 ± 0,003 (0,038)	0,071 ± 0,005 (0,071)	0,033	
		Valor de p	p^(t) = 0,341	p^(t) = 0,056	p^(t) = 0,063	
	20%	NaOH	0,048 ± 0,008 (0,047)	0,094 ± 0,015 (0,091)	0,046	
		NH ₄ OH	0,055 ± 0,016 (0,066)	0,097 ± 0,030 (0,114)	0,043	
		Valor de p	p^(t) = 0,690	p^(t) = 0,690	p^(t) = 0,841	
	• Scaffold	0%	NaOH	0,008 ± 0,001 (0,008)	0,093 ± 0,018 (0,092)	0,085
			NH ₄ OH	0,008 ± 0,001 (0,008)	0,107 ± 0,015 (0,104)	0,099
			Valor de p	p^(t) = 0,579	p^(t) = 0,222	p^(t) = 0,222
5%		NaOH	0,009 ± 0,001 (0,009)	0,117 ± 0,017 (0,105)	0,108	
		NH ₄ OH	0,012 ± 0,001 (0,011)	0,123 ± 0,024 (0,124)	0,112	
		Valor de p	p^(t) = 0,008*	p^(t) = 0,548	p^(t) = 0,690	
10%		NaOH	0,008 ± 0,001 (0,008)	0,106 ± 0,009 (0,101)	0,098	

		NH ₄ OH	0,015 ± 0,002 (0,015)	0,153 ± 0,008 (0,148)	0,138
		Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,008*	p⁽¹⁾ = 0,008*	p⁽¹⁾ = 0,008*
15%		NaOH	0,012 ± 0,001 (0,012)	0,136 ± 0,017 (0,136)	0,124
		NH ₄ OH	0,017 ± 0,001 (0,017)	0,156 ± 0,014 (0,154)	0,140
		Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,008*	p⁽¹⁾ = 0,095	p⁽¹⁾ = 0,151
20%		NaOH	0,011 ± 0,001 (0,012)	0,108 ± 0,007 (0,106)	0,097
		NH ₄ OH	0,015 ± 0,002 (0,015)	0,118 ± 0,023 (0,128)	0,103
		Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,040*	p⁽¹⁾ = 0,310	p⁽¹⁾ = 0,310

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as avaliações antes e depois em cada tipo de densidade e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações em cada avaliação e na diferença com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre os tipos: Filme x *Scaffold* e cada concentração e avaliação e na diferença.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE K – Análise de intumescimento em PBS e saliva artificial: Estatísticas da massa por tipo de solução, concentração e a forma da massa.

Solução	Concentração	Forma da Massa		Diferença relativa Média	Valor de p
		Seca Média ± DP	Intumescida Média ± DP		
• PBS	0%	0,008 ± 0,001 ^(A)	0,107 ± 0,015 ^(A)	12,137 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,012 ± 0,001 ^(A)	0,123 ± 0,024 ^(A)	9,592 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,015 ± 0,002 ^(B)	0,153 ± 0,008 ^(B)	9,614 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,017 ± 0,001 ^(C)	0,156 ± 0,014 ^(B)	8,288 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,015 ± 0,002 ^(BD)	0,118 ± 0,023 ^(A)	6,955 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,003*	p⁽²⁾ = 0,001*	
• Saliva	0%	0,008 ± 0,001 ^(A)	0,198 ± 0,015 ^(A)	25,309	p ⁽¹⁾ = 0,063
	5%	0,012 ± 0,001 ^(B)	0,290 ± 0,051 ^(B)	23,648	p ⁽¹⁾ = 0,063
	10%	0,012 ± 0,002 ^(B)	0,295 ± 0,054 ^(BC)	22,651	p ⁽¹⁾ = 0,063
	15%	0,014 ± 0,001 ^(C)	0,316 ± 0,031 ^(BC)	21,772	p ⁽¹⁾ = 0,063
	20%	0,015 ± 0,001 ^(C)	0,346 ± 0,021 ^(C)	22,070	p ⁽¹⁾ = 0,063
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,005*	p⁽²⁾ = 0,396	
Valor de p	0%	p⁽³⁾ = 0,841	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	5%	p⁽³⁾ = 0,889	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	10%	p⁽³⁾ = 0,071	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	15%	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	
Valor de p	20%	p⁽³⁾ = 1,000	p⁽³⁾ = 0,008*	p⁽³⁾ = 0,008*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as formas seca e intumescida em cada solução e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações em cada forma e na diferença com comparações pareadas do referido teste.

(3): Através do teste Mann-Whitney entre as soluções em cada concentração e forma.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE L – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi empregada a solução de PBS.

Concentração	Dias de avaliação	Medida			Valor de p
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença relativa Média	
0%	7	0,011 ± 0,001	0,006 ± 0,001 (A)	0,445 ± 0,074 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,014 ± 0,003	0,001 ± 0,002 (B)	0,927 ± 0,159 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,012 ± 0,001	0,003 ± 0,001 (C)	0,707 ± 0,102 (C)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,172	p⁽²⁾ = 0,001*	p⁽²⁾ = 0,001*	
5%	7	0,013 ± 0,002	0,009 ± 0,002 (A)	0,304 ± 0,077 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,013 ± 0,002	0,006 ± 0,001 (B)	0,563 ± 0,037 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,001	0,008 ± 0,002 (A)	0,412 ± 0,196 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,664	p⁽²⁾ = 0,011*	p⁽²⁾ = 0,012*	
10%	7	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,002	0,422 ± 0,151	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,014 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,548 ± 0,040	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,014 ± 0,001	0,004 ± 0,004	0,695 ± 0,262	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,823	p⁽²⁾ = 0,221	p⁽²⁾ = 0,067	
15%	7	0,017 ± 0,003	0,009 ± 0,002 (A)	0,427 ± 0,091 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,017 ± 0,003	0,004 ± 0,003 (B)	0,794 ± 0,176 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,017 ± 0,001	0,004 ± 0,004 (B)	0,762 ± 0,222 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,619	p⁽²⁾ = 0,014*	p⁽²⁾ = 0,018*	
20%	7	0,016 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,520 ± 0,105 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,016 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,662 ± 0,062 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,016 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,686 ± 0,072 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,907	p⁽²⁾ = 0,113	p⁽²⁾ = 0,045*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as formas seca e intumescida em cada solução e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre os dias de avaliação em cada concentração e forma com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE M – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação, medida da massa quando foi empregada a solução de PBS/Lisozima.

Concentração	Dias de avaliação	Medida			Valor de p
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença Média	
0%	7	0,012 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,521 ± 0,024	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,012 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,580 ± 0,064	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,012 ± 0,002	0,009 ± 0,006	0,300 ± 0,435	p ⁽¹⁾ = 0,188
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,737	p⁽²⁾ = 0,399	p⁽²⁾ = 0,296	
5%	7	0,016 ± 0,001 (A)	0,011 ± 0,001 (A)	0,311 ± 0,032 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,013 ± 0,001 (B)	0,010 ± 0,001 (A)	0,204 ± 0,021 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,001 (B)	0,014 ± 0,003 (B)	-0,051 ± 0,191 (C)	p ⁽¹⁾ = 0,938
		p⁽²⁾ = 0,005*	p⁽²⁾ = 0,025*	p⁽²⁾ = 0,001*	
10%	7	0,014 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,275 ± 0,033	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,014 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,246 ± 0,086	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,173 ± 0,096	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,228	p⁽²⁾ = 0,660	p⁽²⁾ = 0,067	
15%	7	0,017 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,277 ± 0,070	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,002	0,311 ± 0,029	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,017 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,173 ± 0,214	p ⁽¹⁾ = 0,156
		p⁽²⁾ = 0,574	p⁽²⁾ = 0,076	p⁽²⁾ = 0,262	
20%	7	0,018 ± 0,001	0,012 ± 0,002 (A)	0,325 ± 0,043 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,016 ± 0,001	0,011 ± 0,001 (B)	0,355 ± 0,034 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,002 (A)	0,121 ± 0,153 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,156
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,089	p⁽²⁾ = 0,012*	p⁽²⁾ = 0,020*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as formas seca e intumescida em cada solução e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre os dias de avaliação em cada concentração e forma com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE N – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi empregada a solução de saliva artificial.

Concentração	Dias de avaliação	Medida			Valor de p
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença Média	
0%	7	0,012 ± 0,001	0,114 ± 0,074	-8,319 ± 5,976	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,013 ± 0,001	0,076 ± 0,017	-4,884 ± 0,928	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,026 ± 0,032	0,066 ± 0,026	-3,489 ± 2,528	p ⁽¹⁾ = 0,094
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,621	p⁽²⁾ = 0,385	p⁽²⁾ = 0,148	
5%	7	0,014 ± 0,001	0,074 ± 0,022	-4,134 ± 1,532	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,014 ± 0,002	0,045 ± 0,008	-2,132 ± 0,282	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,002	0,060 ± 0,022	-3,725 ± 1,258	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,243	p⁽²⁾ = 0,082	p⁽²⁾ = 0,076	
10%	7	0,014 ± 0,002	0,049 ± 0,016	-2,643 ± 1,131 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,015 ± 0,002	0,040 ± 0,014	-1,636 ± 0,698 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,002	0,062 ± 0,006	-3,976 ± 0,674 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,287	p⁽²⁾ = 0,058	p⁽²⁾ = 0,007*	
15%	7	0,017 ± 0,003 (A)	0,069 ± 0,015 (A)	-3,069 ± 0,465 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,015 ± 0,003 (AB)	0,048 ± 0,011 (B)	-2,102 ± 0,354 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,013 ± 0,001 (B)	0,049 ± 0,011 (B)	-2,723 ± 0,630 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
		p⁽²⁾ = 0,039*	p⁽²⁾ = 0,014*	p⁽²⁾ = 0,022*	
20%	7	0,016 ± 0,002	0,082 ± 0,016	-4,270 ± 0,611 (A)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	14	0,018 ± 0,002	0,050 ± 0,013	-1,754 ± 0,499 (B)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	21	0,016 ± 0,003	0,068 ± 0,040	-3,160 ± 1,891 (AB)	p ⁽¹⁾ = 0,031*
	Valor de p	p⁽²⁾ = 0,222	p⁽²⁾ = 0,090	p⁽²⁾ = 0,030*	

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste de Wilcoxon para dados pareados entre as formas seca e intumescida em cada solução e concentração.

(2): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre os dias de avaliação em cada concentração e forma com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE O – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 7 dias.

Concentração	Solução	Medida		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença relativa Média
0%	PBS	0,011 ± 0,001	0,006 ± 0,001 ^(A)	0,445 ± 0,074 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,012 ± 0,002	0,006 ± 0,001 ^(A)	0,521 ± 0,024 ^(B)
	Saliva	0,012 ± 0,001	0,114 ± 0,074 ^(B)	-8,319 ± 5,976 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,448	p⁽¹⁾ = 0,003*	p⁽¹⁾ = 0,001*
5%	PBS	0,013 ± 0,002	0,009 ± 0,002 ^(A)	0,304 ± 0,077 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,016 ± 0,001	0,011 ± 0,001 ^(A)	0,311 ± 0,032 ^(A)
	Saliva	0,014 ± 0,001	0,074 ± 0,022 ^(B)	-4,134 ± 1,532 ^(B)
		p⁽¹⁾ = 0,116	p⁽¹⁾ = 0,002*	p⁽¹⁾ = 0,003*
10%	PBS	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,002 ^(A)	0,422 ± 0,151 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,014 ± 0,001	0,010 ± 0,001 ^(B)	0,275 ± 0,033 ^(B)
	Saliva	0,014 ± 0,002	0,049 ± 0,016 ^(C)	-2,643 ± 1,131 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,676	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
15%	PBS	0,017 ± 0,003	0,009 ± 0,002 ^(A)	0,427 ± 0,091 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,017 ± 0,002	0,012 ± 0,001 ^(B)	0,277 ± 0,070 ^(B)
	Saliva	0,017 ± 0,003	0,069 ± 0,015 ^(C)	-3,069 ± 0,465 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,994	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
20%	PBS	0,016 ± 0,002	0,004 ± 0,002 ^(A)	0,520 ± 0,105 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,018 ± 0,001	0,012 ± 0,002 ^(B)	0,325 ± 0,043 ^(B)
	Saliva	0,016 ± 0,002	0,082 ± 0,016 ^(C)	-4,270 ± 0,611 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,065	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as soluções para cada concentração com 7 dias de avaliação com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE P – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 14 dias.

Concentração	Solução	Medida		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença Média
0%	PBS	0,014 ± 0,003	0,001 ± 0,002 ^(A)	0,927 ± 0,159 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,012 ± 0,002	0,005 ± 0,001 ^(B)	0,580 ± 0,064 ^(B)
	Saliva	0,013 ± 0,001	0,076 ± 0,017 ^(C)	-4,884 ± 0,928 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,475	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
5%	PBS	0,013 ± 0,002	0,006 ± 0,001 ^(A)	0,563 ± 0,037 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,013 ± 0,001	0,010 ± 0,001 ^(B)	0,204 ± 0,021 ^(B)
	Saliva	0,014 ± 0,002	0,045 ± 0,008 ^(C)	-2,132 ± 0,282 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,245	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
10%	PBS	0,014 ± 0,002	0,006 ± 0,001 ^(A)	0,548 ± 0,040 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,014 ± 0,001	0,011 ± 0,000 ^(B)	0,246 ± 0,086 ^(B)
	Saliva	0,015 ± 0,002	0,040 ± 0,014 ^(C)	-1,636 ± 0,698 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,675	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
15%	PBS	0,017 ± 0,003	0,004 ± 0,003 ^(A)	0,794 ± 0,176 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,002 ^(B)	0,311 ± 0,029 ^(B)
	Saliva	0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,002 ^(B)	0,311 ± 0,029 ^(B)
		p⁽¹⁾ = 0,482	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
20%	PBS	0,016 ± 0,001	0,005 ± 0,001 ^(A)	0,662 ± 0,062 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,016 ± 0,001	0,011 ± 0,001 ^(B)	0,355 ± 0,034 ^(B)
	Saliva	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,002 ^(A)	0,121 ± 0,153 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,308	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as soluções para cada concentração com 14 dias de avaliação com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE Q – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa com a solução para 21 dias.

Concentração	Solução	Avaliação		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença Média
0%	PBS	0,012 ± 0,001	0,003 ± 0,001 ^(A)	0,707 ± 0,102 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,012 ± 0,002	0,009 ± 0,006 ^(B)	0,300 ± 0,435 ^(B)
	Saliva	0,026 ± 0,032	0,066 ± 0,026 ^(C)	- 3,489 ± 2,528 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,273	p⁽¹⁾ = 0,002*	p⁽¹⁾ = 0,006*
5%	PBS	0,013 ± 0,001	0,008 ± 0,002 ^(A)	0,412 ± 0,196 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,003 ^(B)	-0,051 ± 0,191 ^(B)
	Saliva	0,013 ± 0,002	0,060 ± 0,022 ^(C)	-3,725 ± 1,258 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,823	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
10%	PBS	0,014 ± 0,001	0,004 ± 0,004 ^(A)	0,695 ± 0,262 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,013 ± 0,002	0,011 ± 0,001 ^(B)	0,173 ± 0,096 ^(B)
	Saliva	0,013 ± 0,002	0,062 ± 0,006 ^(C)	-3,976 ± 0,674 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,452	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
15%	PBS	0,017 ± 0,001 ^(A)	0,004 ± 0,004 ^(A)	0,762 ± 0,222 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,017 ± 0,002 ^(A)	0,014 ± 0,002 ^(B)	0,173 ± 0,214 ^(B)
	Saliva	0,013 ± 0,001 ^(B)	0,049 ± 0,011 ^(C)	-2,723 ± 0,630 ^(C)
		p⁽¹⁾ = 0,008*	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*
20%	PBS	0,016 ± 0,001	0,005 ± 0,001 ^(A)	0,686 ± 0,072 ^(A)
	PBS/LISOZIMA	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,002 ^(B)	0,121 ± 0,153 ^(B)
	Saliva	0,016 ± 0,003	0,068 ± 0,040 ^(C)	-3,160 ± 1,891 ^(C)
	Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,590	p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,001*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as soluções para cada concentração com 21 dias de avaliação com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE R – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de PBS.

Tempo Avaliação (dias)	Concentração	Medida		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença relativa Média
7	0%	0,011 ± 0,001 (A)	0,006 ± 0,001	0,445 ± 0,074 (A)
7	5%	0,013 ± 0,002 (A)	0,009 ± 0,002	0,304 ± 0,077 (B)
7	10%	0,013 ± 0,002 (A)	0,008 ± 0,002	0,422 ± 0,151 (AB)
7	15%	0,017 ± 0,003 (B)	0,009 ± 0,002	0,427 ± 0,091 (A)
7	20%	0,016 ± 0,002 (B)	0,004 ± 0,002	0,520 ± 0,105 (A)
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,003*	p⁽¹⁾ = 0,072	p⁽¹⁾ = 0,027*
14	0%	0,014 ± 0,003 (A)	0,001 ± 0,002 (A)	0,927 ± 0,159 (A)
14	5%	0,013 ± 0,002 (A)	0,006 ± 0,001 (B)	0,563 ± 0,037 (B)
14	10%	0,014 ± 0,002 (A)	0,006 ± 0,001 (B)	0,548 ± 0,04 (B)
14	15%	0,017 ± 0,003 (B)	0,004 ± 0,003 (B)	0,794 ± 0,176 (AC)
14	20%	0,016 ± 0,001 (B)	0,005 ± 0,001 (B)	0,662 ± 0,062 (C)
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,030*	p⁽¹⁾ = 0,006*	p⁽¹⁾ < 0,001*
21	0%	0,012 ± 0,001 (A)	0,003 ± 0,001	0,707 ± 0,102
21	5%	0,013 ± 0,001 (A)	0,008 ± 0,002	0,412 ± 0,196
21	10%	0,014 ± 0,001 (A)	0,004 ± 0,004	0,695 ± 0,262
21	15%	0,017 ± 0,001 (B)	0,004 ± 0,004	0,762 ± 0,222
21	20%	0,016 ± 0,001 (B)	0,005 ± 0,001	0,686 ± 0,072
Valor p		p⁽¹⁾ < 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,082	p⁽¹⁾ = 0,053

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE S – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de PBS/Lisozima.

Tempo Avaliação (dias)	Concentração	Medida		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença relativa Média
7	0%	0,012 ± 0,002 (A)	0,006 ± 0,001 (A)	0,521 ± 0,024 (A)
7	5%	0,016 ± 0,001 (B)	0,011 ± 0,001 (B)	0,311 ± 0,032 (BC)
7	10%	0,014 ± 0,001 (A)	0,010 ± 0,001 (B)	0,275 ± 0,033 (B)
7	15%	0,017 ± 0,002 (B)	0,012 ± 0,001 (B)	0,277 ± 0,070 (BC)
7	20%	0,018 ± 0,001 (B)	0,012 ± 0,002 (B)	0,325 ± 0,043 (C)
Valor p		p⁽¹⁾ < 0,001*	p⁽¹⁾ < 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,002*
14	0%	0,012 ± 0,002 (A)	0,005 ± 0,001 (A)	0,580 ± 0,064 (A)
14	5%	0,013 ± 0,001 (A)	0,010 ± 0,001 (B)	0,204 ± 0,021 (B)
14	10%	0,014 ± 0,001 (A)	0,011 ± 0,000 (B)	0,246 ± 0,086 (B)
14	15%	0,016 ± 0,002 (B)	0,011 ± 0,002 (B)	0,311 ± 0,029 (C)
14	20%	0,016 ± 0,001 (B)	0,011 ± 0,001 (B)	0,355 ± 0,034 (C)
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,001*	p⁽¹⁾ = 0,005*	p⁽¹⁾ < 0,001*
21	0%	0,012 ± 0,002 (A)	0,009 ± 0,006 (A)	0,300 ± 0,435
21	5%	0,013 ± 0,001 (A)	0,014 ± 0,003 (B)	-0,051 ± 0,191
21	10%	0,013 ± 0,002 (A)	0,011 ± 0,001 (A)	0,173 ± 0,096
21	15%	0,017 ± 0,002 (B)	0,014 ± 0,002 (B)	0,173 ± 0,214
21	20%	0,016 ± 0,003 (B)	0,014 ± 0,002 (B)	0,121 ± 0,153
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,003*	p⁽¹⁾ = 0,025*	p⁽¹⁾ = 0,292

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

APÊNDICE T – Análise de biodegradação: Estatísticas da massa por concentração, dias de avaliação e a medida da massa quando foi utilizado a solução de saliva artificial.

Tempo Avaliação (dias)	Concentração	Medida		
		Inicial Média ± DP	Final Média ± DP	Diferença relativa Média
7	0%	0,012 ± 0,001 (A)	0,114 ± 0,074 (A)	-8,319 ± 5,976 (A)
7	5%	0,014 ± 0,001 (B)	0,074 ± 0,022 (A)	-4,134 ± 1,532 (A)
7	10%	0,014 ± 0,002 (B)	0,049 ± 0,016 (B)	-2,643 ± 1,131 (B)
7	15%	0,017 ± 0,003 (C)	0,069 ± 0,015 (AB)	-3,069 ± 0,465 (B)
7	20%	0,016 ± 0,002 (C)	0,082 ± 0,016 (A)	-4,270 ± 0,611 (A)
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,010*	p⁽¹⁾ = 0,049*	p⁽¹⁾ = 0,005*
14	0%	0,013 ± 0,001 (A)	0,076 ± 0,017 (A)	-4,884 ± 0,928 (A)
14	5%	0,014 ± 0,002 (AB)	0,045 ± 0,008 (B)	-2,132 ± 0,282 (B)
14	10%	0,015 ± 0,002 (BC)	0,040 ± 0,014 (B)	-1,636 ± 0,698 (B)
14	15%	0,015 ± 0,003 (BC)	0,048 ± 0,011 (B)	-2,102 ± 0,354 (B)
14	20%	0,018 ± 0,002 (C)	0,050 ± 0,013 (B)	-1,754 ± 0,499 (B)
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,018*	p⁽¹⁾ = 0,016*	p⁽¹⁾ = 0,003*
21	0%	0,026 ± 0,032	0,066 ± 0,026	-3,489 ± 2,528
21	5%	0,013 ± 0,002	0,060 ± 0,022	-3,725 ± 1,258
21	10%	0,013 ± 0,002	0,062 ± 0,006	-3,976 ± 0,674
21	15%	0,013 ± 0,001	0,049 ± 0,011	-2,723 ± 0,630
21	20%	0,016 ± 0,003	0,068 ± 0,040	-3,160 ± 1,891
Valor p		p⁽¹⁾ = 0,469	p⁽¹⁾ = 0,575	p⁽¹⁾ = 0,246

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%

(1): Através do teste Kruskal Wallis para comparações entre as concentrações com comparações pareadas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as concentrações correspondentes.

Fonte: Autor, 2016.

ANEXOS



ANEXO A – Identificação Botânica da Planta



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA FLORESTAL
HERBÁRIO DA CAATINGA



DIAGNÓSTICO DE IDENTIFICAÇÃO

Responsável pelo envio do material:

Nº de Coleta 01	Determinador Lombardi, J	Nº de tombo CSTR 5170
Familia Vitaceae	Nome científico <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis	Data da determinação 29/III/2013
Observações		

Patos, 15 de setembro de 2014

Jair Moisés de Sousa
Biólogo – Herbario CSTR
Matricula Siape 1642440

ANEXO B – Screening Fitoquímico

SCREENING FITOQUÍMICO

NOME VULGAR: INSULINA VEGETAL

NOME BOTÂNICO: RYSSUS VERTICILLATA (L.) NICHOLSON & C.E. DAVIS

FAMÍLIA: VITACEAE

OBSERVAÇÕES: _____

	ALCALÓIDES			
	BOUCHARDAT	MAYER	DRAGENDORFF	ÁCIDO SÍLICO-TUNGSTICO
SEMENTE				
FRUTO				
FLOR				
FOLHA	-	-	-	-
CASCA				
CAULE				
RAIZ				

	ESTERÓIDES		
	0,12	0,25	0,50
SEMENTE			
FRUTO			
FLOR			
FOLHA	+	+	++
CASCA			
CAULE			
RAIZ			

	TANINOS					
	GELATINA 0,5%			FeCl ₃ 1%		
	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
SEMENTE						
FRUTO						
FLOR						
FOLHA	-	+	+	+	+	+
CASCA						
CAULE						
RAIZ						

	FLAVONÓIDES	
	FITA-MAGNÉSIO	FLUORESCÊNCIA
SEMENTE		
FRUTO		
FLOR		
FOLHA	+	++
CASCA		
CAULE		
RAIZ		

	SAPONINA	
	HEMOLÍTICO	ESPUMA
SEMENTE		
FRUTO		
FLOR		
FOLHA		+
CASCA		
CAULE		
RAIZ		