



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



Rosemberg Cardoso Barbosa

**COMPÓSITOS QUITOSANA/CARBONATO DE CÁLCIO PARA UTILIZAÇÃO EM
CÂNULAS DE FÍSTULA RUMINAL**

Campina Grande, 2011

Rossemberg Cardoso Barbosa

**COMPÓSITOS QUITOSANA/CARBONATO DE CÁLCIO PARA UTILIZAÇÃO EM
CÂNULAS DE FÍSTULA RUMINAL**

Trabalho de tese apresentado à banca examinadora do Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Polímeros, como exigência final para requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

B238c

Barbosa, Rossemberg Cardoso.

Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fistula ruminal / Rossemberg Cardoso Barbosa. — Campina Grande, 2011.

119 f. : il.

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

Referências.

Orientadores: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.

1. Quitosana. 2. Carbonato de Cálcio. 3. Biomaterial. 4. Cânula. 5.
Casca de Ovo. I. Título.

CDU-677.473(043)

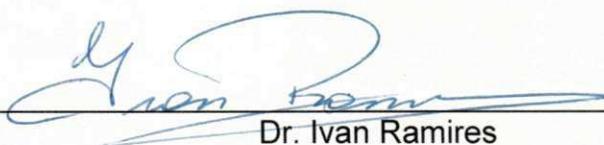
**COMPÓSITOS QUITOSANA/CARBONATO DE CÁLCIO PARA UTILIZAÇÃO
EM CÂNULAS DE FÍSTULA RUMINAL.**

Rossemberg Cardoso Barbosa

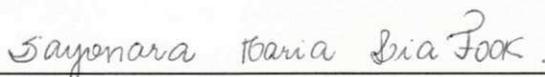
Tese Aprovada em 31/08/2011 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



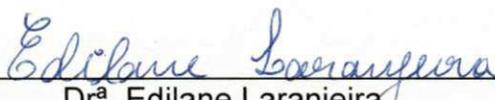
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



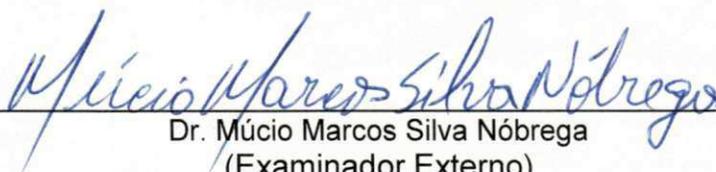
Dr. Ivan Ramires
(Examinador Externo)
UFGD



Dr.ª Sayonara Maria Lia Fook
(Examinadora Externa)
UEPB



Dr.ª Edilane Laranjeira
(Examinadora Externa)
UEPB



Dr. Múcio Marcos Silva Nóbrega
(Examinador Externo)
UFC

DEDICATÓRIA

**Dedico a Deus e a todas as pessoas
que contribuíram direto ou
indiretamente, para a realização
deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo que Ele representa na minha vida.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinícius Lia Fook** por todas as oportunidades que ele tem me dado e por ele ser um grande exemplo de honestidade e bom caráter.

Ao Professores Dr. **Franklin Riet Correa** e Dra. **Rosane Medeiros** aos quais serei sempre grato.

Aos meus pais **Dulce Cardoso** e **Miguel Vieira**, sem eles eu não existiria e a todos os meus irmãos e sobrinhos, em especial aos meus irmãos **Rossandro, Roberto, Suelene** e **Sueleide**.

À **CAPES**, pela bolsa cedida.

A minha tia **Terezinha Cardoso** e seus filhos, noras e netos pelo carinho.

Aos meus amigos **Rosemary** e **João Ponciano, Érick Macêdo, Maria do Carmo, Ítalo Nóbrega** e **Verônica Medeiros** por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos do Grupo de Biomateriais da UFCG, **Márcio José, Thiago Fidelis, Ana Carolina Brasil, Rosemary Cunha Lima, Waldênia, Adriana, Izabel, Carmen, Andreas, Vieira, Greyce, Glória, Wladimir, Katilaine, Lúcia Helena, Roberta, Eva, Ana Sílvia, Rita, Imarally, Chirlayne** e **João Paulo** pela participação neste trabalho.

À colega **Lidiane Correia**, pela colaboração.

Aos professores (**Profa. Dr^a. Sayonara Maria Lia Fook, Profa. Dr^a. Edilane Laranjeira, Prof. Dr. Múcio Marcos Silva Nóbrega** e o **Prof. Dr. Ivan Ramires**), membros da banca examinadora, pela disponibilidade, gentileza e valiosas contribuições.

À Professora Dr^a. **Iracilda Zeppone Carlos** e **Mariza**, pela ajuda e orientação nos testes de citotoxicidade e pela utilização do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular de Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara – SP.

À Professora Dr^a. **Roberta Pinto** pela sua grande colaboração neste trabalho e pela sua amizade.

Ao **corpo docente** de Engenharia de Materiais.

Aos funcionários de Engenharia de Materiais, em especial: **Márcia, Mila, Geraldo, Violeta, André e Kátia**.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã. Portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

RESUMO

A utilização de cânulas no sistema digestivo de ruminantes é frequentemente requisitada para estudos experimentais de digestibilidade. As cânulas utilizadas atualmente são fabricadas com polímeros sintéticos que apresentam mínima interação com o meio biológico, baixa biodegradabilidade e problemas de toxicidade relacionados aos aditivos. Por esta razão, a substituição dos polímeros sintéticos, por polímeros naturais, biodegradáveis, atóxicos e biocompatíveis como a quitosana poderá resultar na obtenção de um produto, que apresente melhor interação com o tecido animal. A quitosana, aplicada na Biomedicina, é um biomaterial que favorece a reconstituição fisiológica da pele e suas propriedades podem ser melhoradas pela adição de carbonato de cálcio de origem animal, extraído da casca do ovo de galinha, em preparações de compósitos quitosana/carbonato de cálcio (CaCO_3). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar membranas de quitosana e de compósitos quitosana/ (CaCO_3) para substituir, parcialmente, os polímeros sintéticos empregados atualmente em cânulas de fístula ruminal. Membranas de quitosana e compósito quitosana/ (CaCO_3) nas proporções de 1%, 5% e 10%, foram preparadas e caracterizadas por Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios X (DRX), Tensão Superficial por medidas do ângulo de contato (TS), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO), Ensaio de Biodegradação Enzimática, Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina, Estabilidade em Meio Ruminal, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos (MTT), Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO) e Ensaio Mecânico (ensaio de tração). Na análise de FTIR, TS e ensaio mecânico a presença de CaCO_3 nas proporções estudadas não demonstrou alterações significativas, quando comparadas as características da membrana de quitosana isoladamente. A técnica de DRX mostrou que, quanto maior a quantidade de CaCO_3 , maior é a cristalinidade do compósito. Quanto à topografia das amostras, a MO e a MEV revelaram que as partículas de carbonato de cálcio formaram aglomerados de tamanhos e formas variadas, porém bem distribuídas nas membranas. Pôde-se concluir com os resultados de DSC que o aumento da carga na membrana de quitosana proporcionou ao compósito maior estabilidade térmica, discretamente confirmada, pelo ensaio termogravimétrico (TG). Os ensaios de biodegradação apontaram que as membranas são biodegradáveis. A biocompatibilidade dos compósitos foi confirmada com os ensaios de MTT e NO, onde revelaram pouca ou nenhuma citotoxicidade. Baseado nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a membrana de quitosana com 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio extraído da casca do ovo de galinha apresenta viabilidade para ser aplicado como biomaterial, uma vez que otimiza a biocompatibilidade e a bioatividade do polímero sintético usado em cânulas e contribui para a redução da poluição ao meio ambiente.

Palavras - chave: 1. Quitosana. 2. Carbonato de cálcio. 3. Biomaterial. 4. Cânula. 5. Casca de ovo.

ABSTRACT

The use of cannulas in the digestive system of ruminants is often required for experimental studies of digestibility. The cannulas used today are made from synthetic polymers presenting minimal interaction with the biological environment, low biodegradability and toxicity problems due to additives. For that reason, the replacement of synthetic polymers used in the manufacture of these tubes, by a natural polymer, biodegradable, nontoxic and biocompatible such as chitosan may result in a product providing better interaction with the animal tissue. In Biomedicine, Chitosan is applied as biomaterial that favors the reconstitution of the skin and its physiological properties can be improved by the addition of calcium carbonate extracted from eggshells, leading to preparations of chitosan / calcium carbonate composites. Therefore, this paper proposes to develop and characterize chitosan membranes and chitosan / calcium carbonate composites to replace synthetic polymers currently used in these cannulas. Composite membranes of chitosan and chitosan / calcium carbonate with contents of 1%, 5% and 10% were prepared and characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), surface adhesion by contact angle measurements (TS), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TG), scanning electron microscopy (SEM), optical microscopy (OM), Enzymatic biodegradation test, stability against acidic and alkaline aqueous solutions, Ruminal medium stability, assessment of cell viability of macrophages (MTT), Determination of the Production of Nitric Oxide (NO) and mechanical testing (tensile test). Regarding the FTIR and TS results, the presence of calcium carbonate in the proportions of 1%, 5% and 10% did not change significantly the characteristics of the chitosan membrane. The XRD technique showed that the greater the amount of calcium carbonate, the higher was the crystallinity of the composite. Regarding the topography, by light microscopy and scanning electron microscopy it was observed that calcium carbonate particles formed clusters of various sizes and shapes, but were well distributed in the membranes. Through the DSC can be concluded that the increased load on the membrane of chitosan gave them a greater thermal stability, which was also slightly observed by the thermogravimetric analysis (TG). The biodegradation tests showed that the membranes are biodegradable. The MTT assays and NO confirmed that the composites are biocompatible with low or without any cytotoxicity. Based on data obtained in this work can be concluded that the chitosan membrane with 1%, 5% and 10% calcium carbonate derived from the chicken eggshell can be used as biomaterial and to improve the biocompatibility of synthetic polymers used in the cannulas, and this then contributes to the reduction of environmental pollution.

Keywords: Chitosan. Calcium carbonate. Biomaterial. Cannula. Eggshell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Bovino Fistulado, apresentando vazamento do conteúdo ruminal	19
Figura 2 Rumenostomia com colocação de cânula flexível de borracha em ovinos	20
Figura 3 Rumenostomia com colocação de cânula flexível de borracha em ovinos	21
Figura 4 Rumenostomia com colocação de cânula fixa de polipropileno em ovinos	22
Figura 5 Estrutura química da quitina e da quitosana	31
Figura 6 Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor	34
Figura 7 Representação esquemática da pele	48
Figura 8 Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases seqüenciais do processo de cicatrização	51
Figura 9 Sequência operacional de elaboração das membranas.	61
Figura 10 Difratoograma de raios X do carbonato de cálcio, extraído da casca do ovo, da quitosana e compósitos com 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio	70
Figura 11 Difratoograma de raios X da amostra de resíduo da casca do ovo	71
Figura 12 FTIR: Membrana de quitosana (a), Membranas de quitosana com 1% (b), 5% (c) e 10% (e) de carbonato de cálcio e o pó de carbonato de cálcio (e),	73
Figura 13 Medidas de ângulo de contato para as membranas de quitosana pura e com carbonato de cálcio. Desvio Padrão 0,4	75
Figura 14 Análise de DSC para as membranas: carbonato de cálcio (a); quitosana (b); quitosana + 1% de carbonato de cálcio (c), quitosana + 5% de carbonato de cálcio (d) e quitosana + 10% de carbonato de cálcio (e).	78
Figura 15 Análise de TG e respectiva derivada para as membranas: carbonato de cálcio (a); quitosana (b); quitosana + 1% de carbonato de cálcio (c), quitosana + 5% de carbonato de cálcio (d) e quitosana + 10% de carbonato de cálcio (e).	81

Figura 16 Curvas de TGA do carbonato de cálcio industrial obtidos em diferentes taxas de aquecimento sob atmosfera de nitrogênio dinâmico	83
Figura 17 Micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 5% (b) e 10% (c) de carbonato de cálcio. Imagem com aumento 1000x.	84
Figura 18 Microscopia ótica das membranas de quitosana com 1% (a), 5% (b) e 10% (c) de carbonato de cálcio. x400.	86
Figura 19 Membrana de quitosana com presença de fibras vegetais aderidas a mesma após ser submetida ao ensaio de biodegradação em conteúdo ruminal. X200.	91
Figura 20 Membrana de quitosana umedecida com água antes e após ser submetida a biodegradação com o conteúdo ruminal.	91
Figura 21 Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das membranas. A - quitosana 90%, B - quitosana com 1% CaCO ₃ , C - quitosana com 5% CaCO ₃ , D - quitosana com 10% CaCO ₃ , LPS – controle positivo, CN – controle negativo	92
Figura 22 Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença das membranas: A=quitosana GD 90%; B=quitosana+1% Carbonato de Cálcio; C=quitosana+5% Carbonato de Cálcio; D=quitosana+10% Carbonato de Cálcio; LPS=Controle positivo e CN=Controle negativo. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 5 animais.	93

SÍMBOLOS

Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH	Amina
OH	Hidroxila
°C	Graus Celcius
Ca	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
Da	Dalton
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Θ	Theta
L	Litro
C=O	Carboxila
Pa	Pascal
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídico

ABREVIACÖES

pH	Potencial de hidrogênio iônico
PVC	policloreto de vinila
TS	Tensão superficial
UAEm	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
ASTM	American Society for Testing and Materials
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
cm	Centímetro
Dema	Departamento de Engenharia de Materiais
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier
GD	Grau de desacetilação
h	Hora
t	Tonelada
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
m/v	Relação massa/volume
v/v	Relação volume/volume
PBS	Solução tampão fosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Fístula Ruminal	18
2.2	Biomaterial	23
2.3	Polímeros	26
2.4	Polímeros Biodegradáveis	27
2.5	Biopolímeros: Quitina e Quitosana	30
2.5.1	<i>Quitina</i>	33
2.5.2	<i>Quitosana</i>	36
2.5.2.1	<i>Propriedades Gerais</i>	36
2.5.2.2	<i>Grau de Desacetilação</i>	38
2.5.2.3	<i>Membranas de Quitosana</i>	39
2.6	Lisozima	43
2.7	Macrófagos	45
2.8	Epitelização	47
2.9	Cálcio	52
2.10	Carbonato de Cálcio	55
2.11	Casca de Ovo	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	Materiais	59
3.2	Métodos	59
3.2.1	Preparação das Membranas de Quitosana	59
3.2.2	Preparação das Membranas com Carbonato de Cálcio	60
3.3	Caracterização	62
3.3.1	Difração de raios X (DRX)	62
3.3.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
3.3.3	Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato	63

3.3.4	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	64
3.3.5	Análise Termogravimétrica (TG)	64
3.3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	64
3.3.7	Microscopia Ótica (MO)	65
3.3.8	Ensaio de Biodegradação Enzimática	65
3.3.9	Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina	66
3.3.10	Estabilidade em Meio Ruminal	66
3.3.11	Avaliação de Viabilidade Celular dos Macrófagos	67
3.3.12	Determinação da Produção de Óxido Nítrico	68
3.3.13	Ensaio Mecânico de Tração	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	Difração de raios X (DRX)	70
4.2	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	72
4.3	Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato	74
4.4	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	77
4.5	Análise Termogravimétrica (TG)	80
4.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	84
4.7	Microscopia Ótica (MO)	86
4.8	Ensaio de Biodegradação Enzimática	87
4.9	Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina	89
4.10	Estabilidade em Meio Ruminal	91
4.11	Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos	92
4.12	Determinação da Produção de Óxido Nítrico	93
4.13	Ensaio Mecânico	96
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	98
	GLOSSÁRIO	115

1 INTRODUÇÃO

A fistulação é uma técnica auxiliar no estudo da digestão dos alimentos consumidos pelos animais, principalmente os ruminantes. Simples e muito útil, atualmente é executada em diversas unidades de pesquisas e de ensino do país (ORTOLANI, 2007).

A complexidade da digestão nos ruminantes apresenta desafios para a quantificação dos processos digestivos. Portanto, o conhecimento da fisiologia digestiva destes animais é de fundamental importância. Desse modo, inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas para a determinação do fluxo de digestão nos diferentes segmentos do trato digestivo, destacando-se as fistulações de órgãos como rúmen e abomaso. Nos animais fistulados no rúmen, o conteúdo ruminal (alimento) é coletado para estudos de parâmetros ruminais, enquanto no abomaso, a coleta é realizada principalmente para determinação das digestibilidades parciais dos nutrientes (LEÃO et al., 2005).

As cânulas utilizadas atualmente em fístula ruminal são fabricadas com polímeros sintéticos. No estágio atual, são utilizados materiais sintéticos que apresentam mínima interação com o meio biológico, dificultando a cicatrização do mesmo. Isto tem causado problemas de extravasamento de conteúdo ruminal, que além do aspecto de higiene pode contribuir para debilitar o animal, e em alguns casos levá-lo à morte (ORTOLANI, 2007).

Atualmente, os biomateriais são concebidos para que haja uma efetiva interação com os tecidos, provocando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no sítio de implantação e não apenas para atuar como uma peça de reposição estática (SANTOS JÚNIOR; WADA, 2007). Por esta razão, a substituição parcial ou total dos polímeros sintéticos, empregados atualmente na fabricação das cânulas para fístula ruminal, por polímeros naturais e biocompatíveis, poderá resultar na obtenção de cânulas que apresentem melhor interação com o tecido animal. No caso de uma substituição parcial, seria realizada a modificação da superfície do material sintético, tornando-o compatível e bioativo, melhorando a interação com o organismo animal e acelerando o processo de cicatrização.

Dentre os polímeros naturais, a quitosana apresenta características que possibilita seu uso para modificação de superfície da borda de cânulas fixas, permitindo assim, ser suturada à pele do animal com sucesso.

A quitosana é um polissacarídeo natural, derivado da desacetilação da quitina, encontrada principalmente em carapaças de crustáceos, composta de resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glicosamina (SANTOS et al., 2006; HEJAZI; AMIJI, 2003;). Vários estudos avaliando potenciais aplicações da quitosana como revestimento curativo ou como suporte para crescimento de células e recuperação de tecido animal, foram publicados (KHAN; PEH, 2003).

Devido a todas as características até então conhecidas da quitosana, ela vem sendo utilizada na biomedicina, indústria de cosméticos, agricultura, como fibra têxtil e no tratamento de água. Aplicada na Biomedicina ela é um biomaterial que favorece a reconstituição fisiológica da pele (BIAGINI, et al., 1992) e auxilia na redução do processo inflamatório de feridas cirúrgicas infectadas (HELOU et al., 2008).

Na Medicina Veterinária, a quitosana é aplicada em ataduras, veículos de medicamentos, etc. (SENEL; McCLURE, 2004). Entretanto, algumas das suas propriedades, tais como estabilidade térmica e propriedade de barreira a gases não são boas o suficiente para que a quitosana seja capaz de competir com polímeros sintéticos, desta forma a preparação de membranas de quitosana com carbonato de cálcio extraído da casca de ovo pode ser uma alternativa para o melhoramento destas propriedades. Segundo Dupoirieux et al. (1995) o pó da casca de ovo possui biocompatibilidade, com ausência de risco de transmissão viral e de salmonelose, uma vez que pode ser autoclavado, possuindo também significativa estabilidade térmica.

Material produzido por substâncias originadas dos seres vivos (biomassa), tem sido uma grande fonte de interesse dos pesquisadores nos últimos anos e seu uso têm tido grande atenção pela importância em relação a fatores ecológicos, por serem de fontes renováveis e também pelo fato de que o descarte de algumas delas constituir fontes de poluição, causando muitos problemas ambientais (KUMAR, 2000). O desenvolvimento de polímeros derivados de biomassa é um dos mais importantes e urgentes assuntos do ponto de vista da preservação ambiental, considerando-se o fato de que a grande maioria dos polímeros utilizados para fins comerciais origina-se de monômeros derivados do petróleo. A poluição ambiental causada pela produção e o descarte de polímeros derivados do petróleo tem levantado um crescente interesse nas indústrias químicas na obtenção de produtos que minimizem esse problema (CHATTI et al., 2006).

Em defesa da manutenção das condições ambientais, vários segmentos da sociedade têm se manifestado, incluindo profissionais da área de engenharia de materiais, com a responsabilidade de evitar e prontamente agir para estabelecer as condições mais adequadas e para buscar e propor o uso de materiais que sejam aplicáveis em soluções dos problemas ambientais (AIROLDI, 2008).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver membranas de quitosana com carbonato de cálcio para revestimento parcial dos polímeros sintéticos empregados atualmente em cânulas de fístula ruminal.

1.1.2 Objetivos Específicos

- produzir membranas de quitosana sem e com carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10%;
- comparar as membranas quanto às suas propriedades químicas, morfológicas, térmicas e mecânicas;
- avaliar a biodegradabilidade das membranas na presença da lisozima, em meio aquoso ácido e alcalino e no conteúdo ruminal;
- avaliar a biocompatibilidade das membranas *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fístula Ruminal

A fístula é uma comunicação feita cirurgicamente entre dois órgãos, ou entre um órgão e o meio. A cânula é um tubo de plástico, borracha ou metal, de calibre variável, com formas e objetivos diversos, aberto em ambas as extremidades, destinada a ser introduzida no corpo (FERREIRA, 2000).

Existe uma grande variedade de cânulas ruminais, podendo ser preparadas com material rígido, como metal, plástico ou acrílico ou confeccionadas com material flexível, como borracha, silicone ou vinil. O aço inoxidável pode ser utilizado para cânulas rígidas, mas devido ao seu elevado peso pode causar necrose dentro do lúmen intestinal (HARMON; RICHARDS, 1997).

O estômago dos ruminantes é composto por quatro compartimentos morfológicamente distintos. Os três primeiros, rúmen, retículo e omaso, correspondem à parte aglandular, e o abomaso é o compartimento glandular. O epitélio que reveste os compartimentos aglandulares é formado por quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada, sendo a última voltada para o lúmen do órgão. A camada basal é a parte germinativa do epitélio, onde ocorre a proliferação celular para o crescimento e renovação do epitélio, expressa por alta atividade mitótica. A lâmina própria é de natureza conjuntiva e altamente vascularizada (PEREIRA, 1997).

A fistulação do rúmen e a implantação da cânula são realizadas mediante intervenção cirúrgica, que variam conforme o tipo de cânula utilizada. Esta implantação possibilita avaliar o metabolismo e a fisiologia do pré-estômago (DUFFIELD et al., 2004)

A colocação de cânula ruminal é uma tecnologia que serve, além de outras coisas, para observar os movimentos dos órgãos, a produção de gases, a velocidade da saída dos alimentos, etc. No entanto, a principal finalidade é o exame do líquido ruminal para análise da digestão e clínica do animal (ORTOLANI, 2007).

Nos experimentos com plantas tóxicas, além de estudar o efeito tóxico de várias plantas, o uso da fístula também tem servido para evitar desperdícios de material e diminuir o stress do animal, que ocorre com maior freqüência quando o material é colocado diretamente na boca do mesmo. Além disso, o tempo de

administração é menor e podem ser utilizadas quantidades maiores de plantas, principalmente daquelas pouco palatáveis (ALCALDE et al., 2001).

A obtenção do líquido ruminal também é possível através de sondas inseridas no rúmen. Entretanto, a coleta da amostra frequentemente torna-se comprometida em consequência da obstrução da sonda, além de não permitir a obtenção de grande quantidade do conteúdo fibroso, o que torna a implantação de fístula ruminal uma alternativa. Porém, algumas complicações podem ocorrer após a implantação de cânulas, tais como peritonite e vazamento de conteúdo ruminal (Figura 1) e o vazamento de grande quantidade de conteúdo do rúmen pode levar o animal à desidratação e desnutrição. Além de provocar lesões na pele, produz odor desagradável e favorece o aparecimento de miíases. Sendo assim, a fistulação ideal é aquela que forma uma vedação em torno da cânula, impedindo o vazamento no período experimental (MUZZI et al., 2009).

Figura 1 - Bovino Fistulado, apresentando vazamento do conteúdo ruminal.



Fonte: www.flickr.com/photos/vacuella/268621008/

A técnica *in situ*, para avaliação da degradação ruminal das principais frações que compõem os alimentos, tem sido muito utilizada nas pesquisas relacionadas com nutrição de ruminantes. Esta técnica permite um contato íntimo do alimento avaliado com o ambiente ruminal, sendo a melhor forma de simulação deste meio,

embora o alimento não esteja sujeito a todos os eventos digestivos, como mastigação, ruminação e passagem ao trato digestivo posterior (VAN SOEST, 1994).

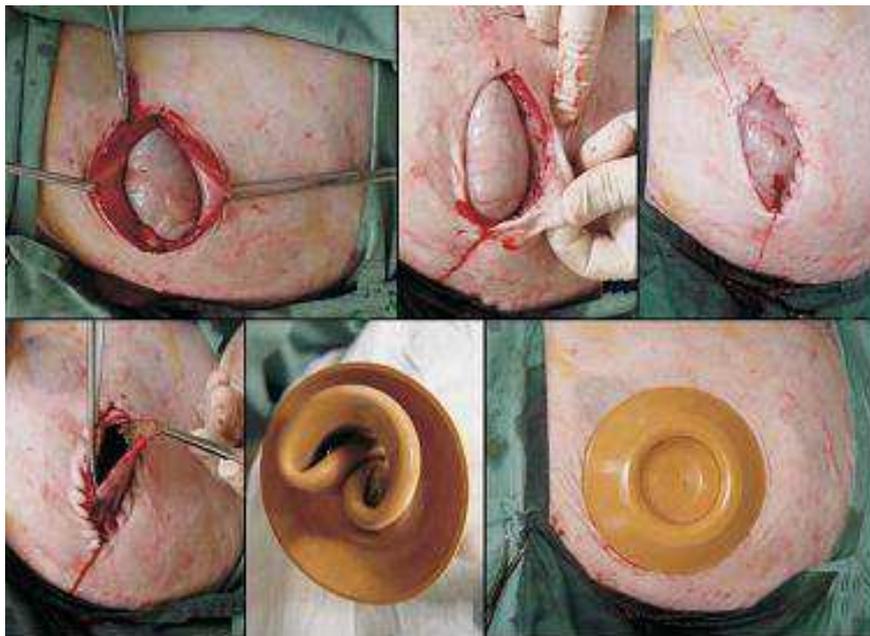
O rúmen caracteriza-se por ser um meio anaeróbio, com temperatura entre 38 a 40 °C, ideal para o desenvolvimento dos microrganismos, possuindo ainda, pH que pode variar de 5,5 a 7,0, sendo que os organismos celulolíticos crescem em pH 6,7 ideal. O pH é regulado pela absorção de saliva, a qual possui capacidade tampão, porém, tanto a composição química da dieta como o manejo alimentar estão relacionados com o valor do pH ruminal (COALHO, 2004).

Os animais fistulados podem ser mantidos por longos períodos nos ensaios experimentais, desde que sejam tomados os cuidados rotineiros de limpeza e higiene do local (SANTRA; KARIM, 2002).

Muzzi et al. (2009), afirma que as cânulas de borracha são funcionais por longo período de tempo, e permite a obtenção de quantidades suficientes de amostra.

A técnica utilizada para realização da fístula no rúmen é conhecida por rumenostomia, que é um procedimento cirúrgico no flanco do ruminante que estabelece um orifício artificial no rúmen. As Figuras 2 e 3 ilustram a colocação de cânulas que também são utilizadas para auxiliar no tratamento de afecções do trato digestório de ruminantes (MIGUEL et al., 2004).

Figura 2 - Rumenostomia com colocação de cânula flexível de borracha em ovinos



Fonte: STEDILE et al., 2008

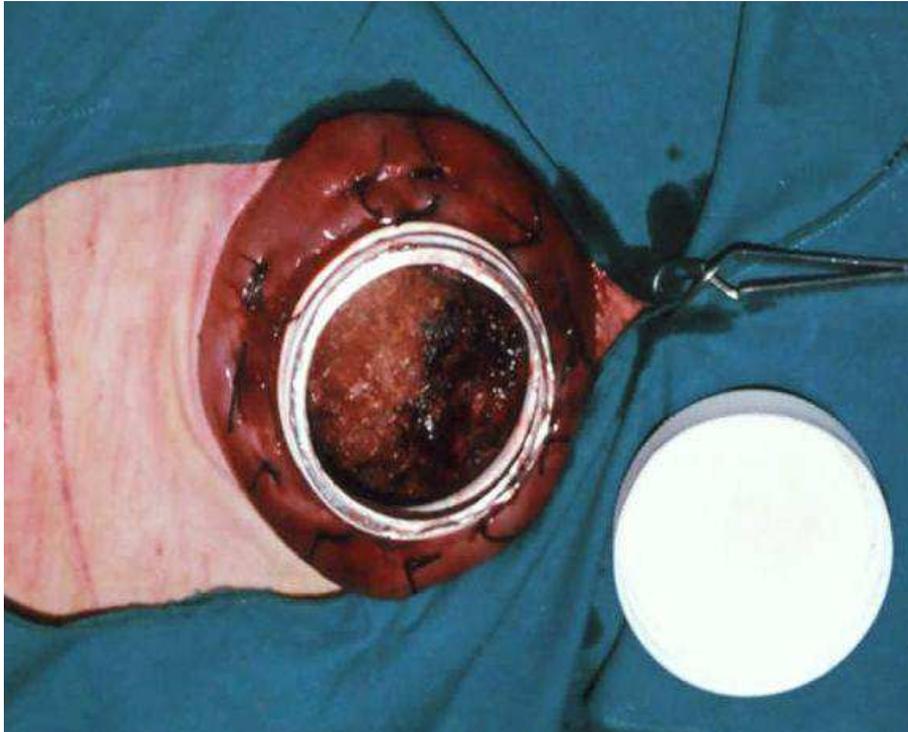
Figura 3 - Rumenostomia com colocação de cânula flexível de borracha em ovinos



Fonte: GOMES et. al., 2009

Para Stedile et al. (2008), a rumenostomia para implantação da cânula flexível é de fácil realização, ajuste anatômico, proporciona boa adaptação dos animais e é efetiva para coleta de material durante a experimentação sem grande comprometimento da qualidade de vida do animal. Segundo Aabd.el-Fattah et al., (2007) as cânulas obtidas a partir de garrafas de polipropileno (Figura 4) tem baixo custo, são duráveis e disponíveis, não causando dor mecânica e mantendo o ambiente ruminal normal. Podem ser implantadas através de técnica simples, fácil, com consumo mínimo de tempo, adequado para coleta de todo o conteúdo ruminal, não apresentando nenhum efeito adverso na condição geral de saúde, porém é aconselhado ser adotado apenas em pequenos ruminantes.

Figura 4 - Rumenostomia com colocação de cânula fixa de polipropileno em ovinos



Fonte: AABDEL-FATTAH et al., 2007

Antes de iniciar o experimento e conseqüentemente evitar problemas no período experimental com os animais fistulados, é importante selecionar um número maior de animais do que o necessário, em virtude do comprometimento da pesquisa em função da perda de animais ou queda de cânulas. Deve-se dar preferência a animais adultos para evitar perda de cânulas devido ao aumento e distensão de fibras musculares da borda fistular. Porém, recomenda-se utilizar, primeiramente, um padrão de cânula flexível menor que pode ser futuramente adaptada ou substituída com o decorrer do experimento e assim prolongar a vida útil dos animais e minimizar o extravasamento de líquido ruminal e as prováveis complicações na digestão e fermentação de alimentos. Existe, ainda, a possibilidade de queda da cânula por distensão das fibras musculares da borda fistular. Neste último caso, a solução seria a substituição por cânulas de borracha flexível com dimensões maiores, sendo esta substituição praticamente definitiva, em função do porte encontrado na maioria das raças ovinas e caprinas que limita o espaço necessário na fossa paralombar esquerda para fistulação com cânulas de diâmetro ainda maiores. Outro ponto seria a predisposição ao stress físico e comportamental dos animais com o uso de

cânulas de maior diâmetro, volume e peso com maior risco de perda por queda (GOMES et al., 2009).

Para evitar a perda das cânulas com o passar do tempo (principalmente no período pós-operatório), é recomendado o manejo em sistemas semi-intensivos com proteção de chuva e sol, limpeza diária e a presença de solários amplos que possibilitem exercícios regulares e a manutenção do estado de saúde dos animais. O contato dos animais fistulados com a vegetação (quando soltos no pasto), em especial da Caatinga pode, eventualmente, resultar na perda das cânulas. É necessário um cuidado semanal constante para realização de limpeza das cânulas com água e sabão e aplicação de repelente para evitar o aparecimento de miíase. Este tipo de acompanhamento deve ser realizado durante toda a vida do animal sendo estes uns dos fatores que contribuem para uma vida útil longa do biomaterial, neste caso, a cânula (GOMES et al., 2009).

2.2 Biomaterial

Biomaterial é um material desenvolvido com o propósito de interagir com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente. Deve apresentar características e propriedades tais como biocompatibilidade, biofuncionalidade e não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue (desnaturação de proteínas) (HENCH, 1998).

A definição de biomaterial pode ser encontrada com diferentes interpretações, tanto no campo das Ciências dos Materiais quanto na Medicina Clínica. Conforme a aplicação e as características requeridas, pode-se optar por um ou outro tipo de material, ou pela utilização conjugada de mais de um deles (URAGAMI; TOKURA, 2006; RATNER; BRYANT, 2004).

O desenvolvimento de novos materiais e aplicações para materiais já existentes surge como opção viável e importante para as mais diversas áreas do conhecimento. Na Ciência dos Materiais, é cada vez mais evidente a necessidade de se lidar com materiais que possibilitem a obtenção de produtos de necessidade humana, com a máxima qualidade e desempenho, ao menor custo possível (DOBRZÁNSKI, 2006). É importante ressaltar que, durante muito tempo, raramente

os biomateriais eram desenvolvidos para substituir ou tratar órgãos ou funções do corpo. Na verdade, a maioria desses materiais era estudada para aplicações tecnológicas tais como, estruturas, revestimentos e equipamentos, mas a aplicabilidade na medicina fez com que esses materiais fossem modificados ou otimizados para tais fins (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais são utilizados desde as civilizações mais antigas. Chineses e indianos já usavam ceras, resinas e tecidos para reconstruir partes perdidas ou defeitos do corpo. Ao longo dos séculos, avanços nos tipos de materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização vêm permitindo o uso de biomateriais em partes do corpo não visualizadas até então (SCHILLING et al., 2004). De acordo com a origem, eles são classificados em sintéticos e naturais. Estes últimos podem ainda ser classificados como autógenos, quando se realiza a retirada de um tecido para implante no próprio indivíduo (caso dos enxertos ósseos); homogêneos, quando o implante é dado por um órgão ou tecido de indivíduos diferentes, porém pertencendo à mesma espécie (caso do transplante de fígado e de coração) e heterogêneos, quando o implante é originário de uma espécie diferente (caso da utilização do pericárdio bovino em próteses cardíacas (VESELY, 2003).

Atualmente os biomateriais têm vastas aplicações como biosensores, implantes, liberação controlada de drogas, lentes intraoculares, etc. A cada ano são desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer outras opções de tratamento para diversas enfermidades. Porém, devido à mudança no conceito de desenvolvimento de biomateriais, a maioria dos novos materiais é voltada para regeneração tecidual. Eles também devem ser susceptíveis aos processos de esterilização, sem que o mesmo não altere as propriedades físico-químicas do material (SAN ROMÁN; REIS, 2004).

Dentre as diversas classes de biomateriais existentes, destaca-se a classe dos bioreabsorvíveis. A capacidade de reabsorção de um biomaterial está relacionada com a biocompatibilidade apresentada pelo mesmo. A biocompatibilidade é a capacidade do material apresentar resposta apropriada, quando aplicado, não causando reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade. Ela gira em torno da interação celular com o biomaterial. Sendo o material ideal para executar a função desejada, aquele que eventualmente desaparece (reabsorve), sendo substituído por tecido natural. Deste modo,

polímeros biodegradáveis são de grande interesse para a comunidade da engenharia biomédica (SANTOS JÚNIOR; WADA, 2007).

A evolução atual dos biomateriais depende dos avanços das diversas áreas, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais. O desenvolvimento destes envolve também profissionais de diferentes áreas da ciência, portanto, a multidisciplinaridade é fundamental neste processo (HENCH, 1998; RATNER et al., 1996).

Um dos desafios no campo de biomateriais é que todos os dispositivos de implantes substituem tecidos vivos cujas propriedades físicas são resultado de milhões de anos de otimização evolutiva, e que têm a capacidade de crescimento, regeneração e reparo. Assim, todos os biomateriais usados para reparo ou restauração do corpo representam um ajuste de características e de propriedades. (OREFICE et al., 2006).

A necessidade de se reduzir o número de cirurgias de revisão, destinadas a substituir implantes danificados, redução dos custos dos materiais envolvidos em implantes, enxertos e também a dependência de doadores para transplantes, que muitas vezes não são compatíveis, também tem incentivado o desenvolvimento de biomateriais com propriedades superiores e capazes de cumprir suas atividades por um tempo mais prolongado no organismo (SILVA JÚNIOR; ORÉFICE, 2001).

As células e mediadores do sistema imune são frequentemente notados no sítio de implantação dos biomateriais e, portanto, a interação de leucócitos com o biomaterial é tida como um fator crucial na determinação da biocompatibilidade. Em função desta interação, os leucócitos são hábeis para liberar ou estimular muitos dos mediadores responsáveis pela intensidade e duração da resposta inflamatória. Atribui-se ao macrófago a responsabilidade pela degradação de polímeros “*in vivo*”, pois os macrófagos, quando ativados, sofrem alterações morfofuncionais que potencializam suas funções quimiotáticas, fagocítica e secretora, e, conseqüentemente, sua capacitação para várias outras funções. A fagocitose é uma das atividades mais importantes dos macrófagos em um processo inflamatório, pois estas células têm grande capacidade de sintetizar e secretar substâncias intra e extracelulares, como enzimas que afetam as proteínas extracelulares, substâncias envolvidas no processo de defesa e fatores reguladores da atividade de outras células, especialmente as citocinas e fatores de crescimento (RATNER et al.; 1996).

A seleção do biomaterial desempenha a função chave no projeto de desenvolvimento de um produto obtido por engenharia de tecido. Apesar do clássico critério de seleção por um implante seguro, estável e inerte, tem se verificado que o mais importante é a resposta celular. Portanto, é amplamente aceito que o biomaterial deve interagir com o tecido em reparo, caso contrário, este agiria como um simples substituto inerte. Sendo assim, o mesmo deve ser mais que biocompatível, ele deve promover a resposta celular desejada. Conseqüentemente, o maior foco dos biomateriais para aplicação em engenharia de tecidos está baseado no controle da sua interação com as células (PANCHENCE; KOHN, 2000).

2.3 Polímeros

Os polímeros são constituídos de macromoléculas orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas de alta massa molar, que possuem unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominadas meros. São classificados em homopolímeros ou copolímeros (VISSER et al., 1996). Quimicamente, eles têm como base o carbono, hidrogênio e outros elementos não metálicos (CALLISTER, 2002). É uma das classes de materiais mais versáteis e têm mudado nosso cotidiano por várias décadas com importantes aplicações na área médica, agricultura e engenharia (LANGER et. al., 2003). Eles podem ser termoplásticos ou termorrígidos, o que depende das características moleculares e estruturais dos mesmos. Os termoplásticos têm cadeias individuais que se agrupam por forças relativamente fracas como Van der Waals e dipolo-dipolo, podendo ser dissolvidos em solvente e modelados para a formação de membranas ou outros materiais. Os termorrígidos, geralmente, são constituídos por ligações covalentes, introduzidas entre as cadeias através de reticulações. Uma vez submetido ao processo de reticulação, com formação de ligações covalentes, o polímero não pode ser dissolvido ou moldado nem seus fragmentos reciclados (BATICH; LEAMY, 2003).

Atualmente a maioria dos polímeros é de origem sintética, sua compatibilidade e degradabilidade são mais limitadas do que a dos polímeros naturais, como por exemplo, a celulose, quitina, quitosana e seus derivados (KUMAR, 2000).

Os polímeros biocompatíveis encontram-se subdivididos em bioinertes, bioativos, bioabsorvíveis e biodegradáveis, sendo estes classificados de tal forma por serem suscetíveis à decomposição, através de atividade vital do sistema biológico (HENCH; JONES, 2005; NICHOLSON, 2002).

O uso de compósitos de polímeros alia suas diferentes propriedades (mecânicas, térmicas e viscoelásticas) para obter o melhor resultado pretendido nas diversas aplicações (YUEHUEI et al., 1998).

Os biopolímeros apresentam uma série de propriedades e características funcionais próprias que possibilitam uma pluralidade de aplicações. Em sua forma original ou modificada apresentam boas propriedades mecânicas para aplicações como fibras, filmes, espessantes, hidrogéis, emulsificantes, carreadores e suporte para imobilização de drogas e enzimas, dentre outras aplicações (ORREGO et al., 2009; KHOR; LIM, 2003).

2.4 Polímeros Biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são aqueles no qual a degradação resulta da ação de microorganismos de ocorrência natural, tais como bactérias, fungos e algas (ASTM D 6400-99) e apresentam uma redução da sua massa molar ao entrar em contato com o ambiente biológico (OREFICE et al., 2006). Esses polímeros são considerados como uma nova classe de um campo de estudo que vêm se destacando devido ao crescimento da importância desses materiais no mercado mundial (DUARTE, 2004). Quando utilizados como biomaterial oferecem vantagens, como a não necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção da prótese após ter cumprido a função requerida, e tem a possibilidade de provocar e guiar regeneração tecidual via degradação do material (FAMBRI et al., 2002).

A biodegradabilidade é a capacidade que uma substância apresenta de ser decomposta pela ação de seres vivos. Os microrganismos, principais envolvidos neste processo, possuem enzimas extracelulares como: depolimerases e hidrolases. Elas catalisam a quebra do polímero em compostos solúveis em água, que podem ser aproveitados como nutrientes pelas células (KHANNA; SRIVASTAVA, 2004).

Os polímeros biodegradáveis tais como colágeno, elastina, ácido hialurônico, dextrana, celulose e quitina são moléculas de origem biológica, estrutura

macromolecular, são sempre biodegradáveis e muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos (ORÉFICE et al., 2006). Dentre estes polímeros, os que têm despertado maior interesse é a celulose; que provém de várias fontes, e a quitina que, quando sofre o processo de desacetilação dá origem à quitosana. Do ponto de vista reacional, a quitosana é muito mais atrativa, por conter um grupo amino, propiciar a modificação química da estrutura polimérica original e poder reagir com várias moléculas, tendo a finalidade de tornar o polímero com maior disponibilidade de grupos pendentes para exercer outras atividades (TORRES et al., 2006; LIMA et al., 2006; CRINI, 2005).

Nos últimos anos, os polímeros biodegradáveis têm sido propostos como alternativas aos biomateriais atualmente usados em aplicações biomédicas. Uma das vantagens destes materiais é seu baixo custo como resultado da disponibilidade da matéria-prima (DUMITRIU et al., 1996). As suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos físicos e químicos, o que permite a seleção de propriedades importantes tais como capacidade de absorção de água, cinéticas de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas e determinadas aplicações (KAPLAN, 1998).

Polímeros biodegradáveis do tipo polissacarídeos têm sua origem em plantas, animais invertebrados, fungos e microrganismos, embora também estejam presentes em mamíferos, porém, em menor proporção. Estes são constituídos por carboidratos, em geral, de alto peso molecular. São complexos coloidais que se hidrolisam em monossacarídeos contendo cinco ou seis átomos de carbono. Considera-se que os polissacarídeos são polímeros nos quais os monômeros foram unidos por ligações glicosídicas com eliminação da água. Suas cadeias podem conter cargas ou serem neutras, sendo denominados de polieletrólitos, no primeiro caso, termo que se refere a polímeros que em solvente polar adequado apresentam cargas positivas e negativas, como positivas na quitosana e negativas em carboximetilcelulose, ou cargas positivas e negativas na carboximetilquitosana (ORREGO et al., 2009; ABREU; CAMPANA FILHO, 2005).

Como base para a composição de um novo tecido, os polímeros biodegradáveis que são bioreabsorvíveis vêm sendo amplamente estudados para uma melhor compreensão dos fatores que influenciam sua biodegradação, bioreabsorção e a forma com que interagem com os elementos biológicos. Os produtos e técnicas já desenvolvidas servirão como um dos alicerces desta

complexa área de conhecimento, de modo que o tecido formado seja o desejado, que a função original seja restabelecida e que o procedimento seja reprodutível e de baixo custo (BARBANTI, 2005).

Segundo Vert et al. (1992), biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo. Bioreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, isto é, materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo, dissolvendo-se em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, processo que ocorre na lenta dissolução de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Um polímero bioabsorvível pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas.

Os polímeros biodegradáveis têm larga aplicação em engenharia de tecidos, pois os artefatos desenvolvidos com estes polímeros geralmente requerem um tempo curto de duração e não é necessária uma cirurgia para sua retirada (KOHN; LANGER, 1996).

Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis (ex: quitina e quitosana), entre eles: local de implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química/esterioisometria, cristalinidade e morfologia; envolvendo o tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade, energia livre e carga da superfície, pH, presença de aditivos e outros (MIDDLETON; TIPTON, 2000).

2.5 Biopolímeros: Quitina e Quitosana

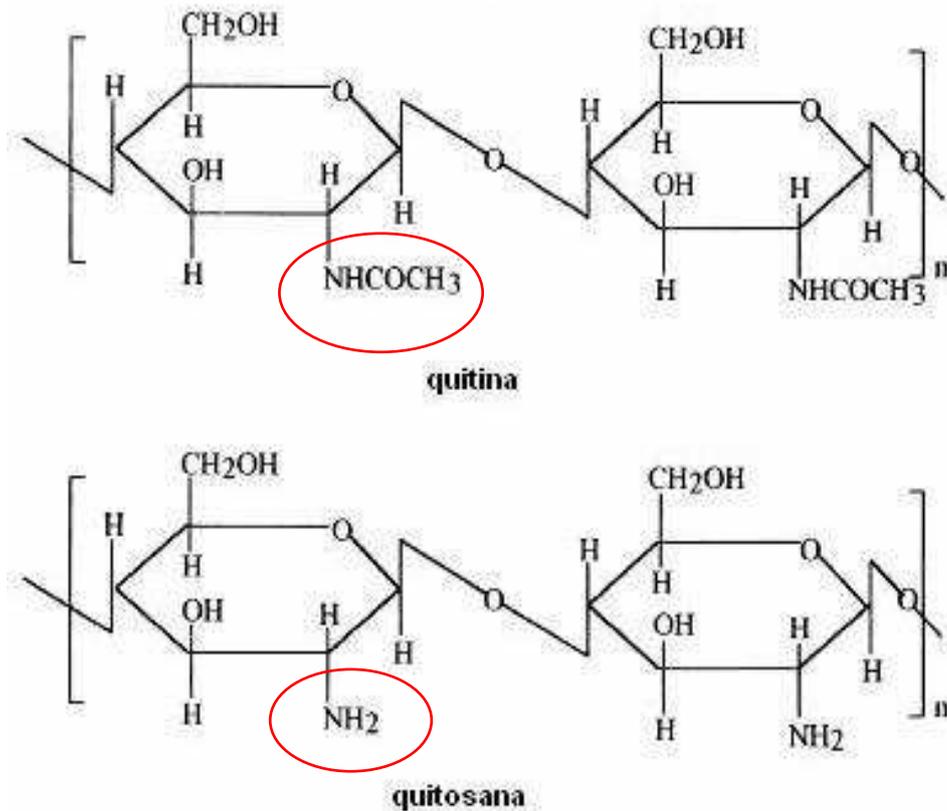
Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (ROBERTS, 1992). São formadas pelas moléculas dos açúcares glicosamina e acetilglicosamina. A glicosamina existe como metabólito natural nos animais vertebrados e está presente de forma significativa na matriz extracelular do tecido conjuntivo, compondo o que denominamos de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (URAGAMI; TOKURA, 2006).

A desacetilação da quitina leva à obtenção de quitosana, seu mais importante derivado, cuja estrutura primária é idêntica à da quitina a não ser pelo fato que em quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. De fato, a completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (ABRAM HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992).

A quitosana, que é um polímero natural, vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (MUZZARELLI et al., 1997). A quitina é um polissacarídeo encontrado na natureza em grande escala, pois é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera, sendo superada apenas pela celulose, mas supera esta última em termos de taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior que a da celulose. Quitina e celulose possuem características estruturais semelhantes e atuam como invólucros protetores e materiais de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem (ABRAM; HIGUERA, 2004).

As estruturas moleculares da quitina e da quitosana estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química da quitina e da quitosana



Fonte: MAJETI e KUMAR, 2000

Quitina e quitosana são produzidas comercialmente na Índia, Japão, Polônia, Noruega, Austrália e China. O interesse comercial nas aplicações de quitosana e derivados aumentaram muito nas últimas três décadas, o que pode ser constatado pelo depósito de patentes no Japão, Europa, China, Coreia e, principalmente nos Estados Unidos.

Em 1990 a produção mundial de quitina e quitosana foi estimada em 10 mil t e já se aproximava de 30 mil t em 2004, correspondente ao processamento de aproximadamente 1.440.000 t de rejeitos ricos em quitina gerados naquele ano, em nível mundial, pela indústria pesqueira (ABRAM; HIGUERA, 2004).

A quitosana exibe atividade antimicrobiana e devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade também apresenta grande potencial para aplicações na agricultura, em medicina e odontologia (ABRAM; HIGUERA, 2004; KHOR; LIM, 2003; ROBERTS, 1992). Ela tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas, principalmente a médica e a farmacêutica, que tem

observado na quitosana um biomaterial com grande potencial (ROBERTS, 1992). É uma substância que tem a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbico e aniônico (BIAGINI et al., 1992), sendo produzida industrialmente pela primeira vez em 1971, no Japão. Em 1986, o Japão já possuía quinze indústrias envolvidas na produção de quitina e quitosana em escala comercial (HIRANO, 1989). Como biomaterial, é aplicada em lentes de contato, membranas artificiais, tratamento de lesões de pele, cicatrizante, agente hemostático, bactericida e fungicida (DALLAN, 2005).

Essa versatilidade da quitosana permite sua conformação em formas tão variadas quanto sua aplicabilidade como fibras, glóbulos, membranas, etc. Por ela não ser hidrolisada pelas enzimas digestivas no homem e a sua estrutura química ser similar a da celulose, ela pode ser usada como um novo tipo de fibra dietética. Entretanto, por conter um par de elétrons livres no nitrogênio tem capacidade de formar complexos com polímeros e metais (JING et al., 1997).

O uso industrial e em larga escala de quitina ainda são muito menos importantes que os de celulose, mas alguns importantes segmentos do mercado já são ocupados por derivados de quitina. Seus oligômeros são totalmente absorvíveis pelo organismo sendo metabolizados por enzimas humanas e por esta razão é considerado um material biodegradável. Outra propriedade que a quitosana possui é a bioadesividade, isso se deve aos seus grupos (NH_2 e OH) sofrerem protonação em certos valores de pH fisiológico e, interagirem eletrostaticamente com cargas negativas na mucosa ou superfícies celulares (LIMA, 2006).

A quitosana é um polissacarídeo e como se sabe, estimula o sistema imune *in vitro* e *in vivo* a favorecer o processo cicatricial e também vêm sendo utilizado com fins terapêuticos em Medicina Veterinária, pois atua como agente cicatrizante, antimicrobiano e hemostático, além de possuir efeito analgésico (SENEL; McCLURE, 2004). Isso ocorre devido à ativação dos macrófagos pelos oligômeros de baixa massa molecular, que leva o mesmo a liberar interleucina-1 e estimular a proliferação de fibroblastos que influenciará na estrutura do colágeno (SANDFORD, 1989). Os polissacarídeos apresentam características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, propriedades básicas para serem utilizados como biomateriais. As aplicações destes têm crescido devido ao recente desenvolvimento de novas técnicas de aperfeiçoamento e pesquisas relacionadas à Engenharia de Tecidos, juntamente com a necessidade de criação de materiais que apresentem um controle

de atividade biológica e biodegradabilidade específicas para cada aplicação requerida (DUMITRIU, 2002).

Dentre a variedade de aplicações da quitosana descrita acima, ainda pode ser maior quando são incluídos os vários derivados de quitosana obtidos por meio de reações químicas em que são inseridos diferentes grupos funcionais às suas moléculas, conferindo diferentes propriedades e aplicações (KUMAR, 2000).

2.5.1 Quitina

A quitina representa a mais abundante fonte de nitrogênio encontrada nos oceanos e o segundo material com conteúdo de nitrogênio encontrado no planeta. A extração não causa problemas ao ecossistema e ainda tem todas as vantagens dos polissacarídeos, sendo o biopolímero compatível com tecidos animais e baixa toxidez (CRINI, 2005; KURITA, 2001).

O termo quitina, deriva da palavra grega *chiton*, significando um revestimento protetor para invertebrados. As principais matérias primas para produção industrial de quitina são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar (ABRAM; HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992). A quitina constitui a maior fração dos exoesqueletos dos insetos e crustáceos tais como caranguejo, camarão e lagosta e também da parede celular de alguns fungos (KUMAR et al., 2004; RATHKE; HUDSON, 1993). As cascas secas de crustáceos possuem 15-20% de quitina, 25-40% de proteína e 40-55% de carbonato de cálcio, além de pigmentos e lipídeos em pequena quantidade. A partir dessa matéria prima, refugo abundante e relativamente barato da indústria de alimentos marinhos, é produzida a α -quitina (KURITA et al., 1993).

As polimorfos de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos como mostra a Figura 6. A α -quitina corresponde a um empacotamento denso resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas em diferentes lamelas ou folhas, o que favorece a existência de numerosas ligações hidrogênio inter e intracadeias da mesma lamela e de lamelas vizinhas. No caso de β -quitina as cadeias pertencentes a diferentes lamelas dispõem-se paralelamente, o que dificulta o estabelecimento de ligações hidrogênio

intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotado. Em γ -quitina parece ocorrer uma combinação dos dois arranjos anteriormente descritos, pois as cadeias de duas lamelas em disposição paralela são intercaladas por lamela em que as cadeias se dispõem antiparalelamente. Essa estrutura é a menos estudada e conhecida e sugere-se que possa ser uma distorção das duas estruturas anteriores (CAMPANA FILHO et al, 2007).

Figura 6 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor



Fonte: CAMPANA FILHO et al., 2007.

As indústrias de processamento de crustáceos geram toneladas de resíduos diariamente no meio ambiente. Estes resíduos são biodegradáveis, por isso não provocam acúmulo excessivo na natureza, apesar de causarem grande problema de ordem social por serem desagradáveis no cheiro e atraírem insetos, podendo acarretar danos a saúde humana. A geração de resíduos da indústria de pescado é um grande desafio para os empresários do setor que precisam destinar esses resíduos e não poluírem o ambiente (ASSIS; STAMFORD, 2008; OLIVEIRA et al., 2002).

A produção de quitina, a partir de cascas de crustáceos, obtidas do descarte da indústria pesqueira é interessante se incluirmos a recuperação de carotenóides. As cascas contêm quantidades consideráveis de astaxantina, um carotenóide que não é sintetizado e é comercializado com alto valor agregado como um aditivo de alimentos provindos do mar, especialmente o salmão (KUMAR, 2000).

A quitina foi isolada por Braconnot em 1881, trinta anos antes do isolamento da celulose, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou severamente suas aplicações industriais até o início dos

anos 70 (ROBERTS, 1992). Quitina é um polímero semicristalino e a acessibilidade aos sítios reativos contidos nos domínios cristalinos é limitada (CAMPANA FILHO et al., 2007). A cristalinidade das amostras depende de vários fatores, tais como a natureza do organismo do qual a quitina foi extraída e as condições empregadas na extração do polímero (SAITO et al., 2000).

A extração de quitina a partir da biomassa, a exemplo de que acontece com a extração de celulose de fibras vegetais, envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. A α -quitina ocorre na endocutícula associada a pigmentos, carbonatos e proteínas e, assim, sua extração a partir de exoesqueletos de crustáceos envolve, geralmente, a seqüência desmineralização, desproteínização e despigmentação (ABRAM; HIGUERA, 2004).

O processamento das cascas de crustáceos envolve basicamente a remoção da proteína e a solubilização do carbonato de cálcio que está presente nas cascas em alta concentração. A purificação com hidróxido de sódio concentrado (50%) remove a proteína e desacetila a quitina simultaneamente, enquanto o carbonato de cálcio é removido com soluções de ácido clorídrico. O tratamento da quitina com solução aquosa hidróxido de sódio (50%) à temperatura de aproximadamente 120 °C por 1 a 3 horas dá origem a quitosana aproximadamente 70 % desacetilada (KUMAR, 2000; CHIRACHANCHAI et al., 2001).

Independentemente da origem da quitina, comercial ou extraída da biomassa em laboratório de pesquisa, α ou β quitina, é importante determinar suas características básicas e sua pureza, principalmente se o objetivo é empregá-la em aplicações na medicina, área farmacêutica e indústria alimentícia (LAVALL et al., 2004). A quitina é insolúvel em solução aquosa e em solventes orgânicos devido a sua alta cristalinidade. Entretanto a solubilidade, a reatividade e o processamento da quitina aumentam consideravelmente com modificações químicas (LAPASIN; PRICL, 1995). A α -quitina é a forma mais abundante e é também considerada a mais estável, visto que a conversão da β e γ -quitina em α -quitina é irreversível (ROBERTS, 1992).

A Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier permite distinguir as estruturas polimórficas da quitina, porém as diferenças são sutis e a distinção não é tão simples, pois as mesmas bandas características ocorrem nos espectros de α e β quitina (FOCHER et al., 1992).

2.5.2 Quitosana

2.5.2.1 Propriedades Gerais

A quitosana, como descrito, possui os grupos funcionais: N-acetil, amino, hidroxila primária e secundária. Modificações químicas envolvendo esses grupos têm recebido atenção especial com relação a características específicas tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade com tecidos animais e humanos e interações químicas e físicas (CHIRACHANCHAI et al., 2001).

A quitosana varia seu comportamento eletrônico entre positivo e negativo dependendo do pH da solução, alternando portanto, sua afinidade iônica. Sua solubilidade é explicada pela protonação do grupo livre das unidades desacetiladas, característico na quitosana *in natura*, que passa de NH_2 a NH_3^+ conferindo-lhe propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais. A protonação dos grupos amino em soluções ácidas é responsável pela atração eletrostática de ânions. Em altos valores de pH os grupos amino da quitosana são desprotonados e seu par de elétrons reage com aldeídos, ácidos, anidridos, epóxidos que são reagentes eletrofílicos (CHAO et al., 2004).

As propriedades físicas da quitosana tais como cristalinidade, energia superficial e degradação também variam com o grau de desacetilação da mesma. Ela destaca-se ainda por ser de baixo custo, renovável, de grande importância econômica e ambiental (MAJETI; KUMAR, 2000).

O grau de desacetilação e o peso molecular da quitosana são os parâmetros mais importantes a serem estudados, pois são características de grande importância para as propriedades físico-químicas da mesma e conseqüentemente, possui um maior efeito nas propriedades biológicas. Em comparação com a quitina, a quitosana torna-se mais fácil de ser trabalhada devido a sua maior solubilidade em ácidos diluídos, dando assim, uma maior utilização para reações químicas (SANTOS et al., 2006; KHOR; LIM, 2003; HEJAZI; AMIJI, 2003).

A aplicabilidade da quitosana está vinculada com sua massa molar, ou seja, dependendo deste parâmetro é atribuído um diferente uso para a quitosana, e, quanto a esse parâmetro, ainda pode ser classificada como de baixa massa molecular (>100 kDa), de média massa molecular (100 a 300kDa), e de alta massa molecular(<300kDa) (KIM; RAJAPAKSE, 2005).

A massa molar das cadeias poliméricas da quitosana, com grau de desacetilação em torno de 85%, foi determinada utilizando o método de Cromatografia de Permeação em Gel de Alta Eficiência (CPGAE) por Vieira (2004). Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação são tempo de reação e concentração da solução de álcali (CAMPANA FILHO; SIGNINI, 2001).

A presença de numerosas pontes de hidrogênio, intermoleculares e intramoleculares nas moléculas de quitosana contribuem para o caráter semicristalino do polímero. Além disso, faz com que ela não apresente nenhum ponto de fusão, sendo solúvel apenas em pH na faixa ácida (RINAUDO, 2006).

A razão de glicosamina/N-acetil glicosamina é um fator dependente da origem da quitosana, bem como do método de preparação e pode variar desde 30% até quase 100% (SANTOS et al., 2006; KHOR; LIM, 2003; HEJAZI; AMIJI, 2003;).

A quitosana é mais atrativa por conter um grupo amino livre, o qual é responsável pela maioria de suas características (AIROLDI, 2008). Este biopolímero possui três grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2, e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (FURUSAKI et al., 1996).

Para tornar a quitosana quimicamente mais inerte ou resistente ao meio, costuma-se bloquear os seus grupos funcionais, adicionando-se um agente modificador. A reação pode ocorrer de forma homogênea (adicionando o agente modificador na própria solução de quitosana) ou heterogênea (adicionando o agente modificador na quitosana já moldada) (TORRES, 2006).

A quitosana, por se tratar de um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução, quebrando as ligações do complexo polimérico e os componentes da água (H e OH) são incorporados aos fragmentos resultantes. Outra via de degradação da quitosana no organismo ocorre pela ação da lisozima (TOMIHATA; IKADA, 1997), que é uma enzima que auxilia o sistema imunológico, pois dissolve a parede mucopolissacarídea das bactérias pela hidrólise das ligações $\beta - (1 \rightarrow 4)$ (BERSCHT et al., 1995). Esta enzima é encontrada livremente dissolvida em grande parte dos tecidos, porém sua concentração tecidual aumenta numa reação inflamatória, pois esta é sintetizada pelos macrófagos, que secretam os lisossomos, auxiliando na remoção de restos celulares e bacterianos do local da infecção (MARTINI, 1995).

Devido a sua flexibilidade e resistência a tensão, a quitosana é usada em curativos como, por exemplo, de queimaduras. Por ser um componente

hipoalergênico auxilia na cicatrização, pois acelera a reposição celular, recuperando com maior rapidez tecidos lesados. Apresenta propriedades antimicrobianas, atua na separação e recuperação de microrganismos de suspensões celulares, por meio de forças eletrostáticas que ocorrem entre as moléculas da superfície celular, de caráter negativo e as partículas de quitosana (HIROUYUKI et al., 1998).

Devido ao divulgado efeito antiolesterolêmico da quitosana, sua aplicação em produtos dietéticos teve um aumento explosivo nos últimos anos em todo o mundo, porém a U.S. Food and Drug Administration (FDA) não reconhece a relação estrutura/funcionalidade divulgada pelos fabricantes de alguns produtos que contém quitosana (CAMPANA FILHO et al., 2007).

2.5.2.2 Grau de Desacetilação

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases bem como sua baixa produtividade. Quando o processo é químico, pode ser promovida por meio de reação alcalina com hidróxido de sódio ou potássio a quente por um período superior à 1 hora, para obtenção de diferentes tipos de quitosana, sendo que a temperatura, o tempo de exposição da quitina ao álcali e a concentração deste influencia no grau de desacetilação (MATHUR; NARANG, 1990).

As quitosanas comerciais possuem, geralmente, grau de desacetilação variando de 70 a 95%, com massa molecular na faixa de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹ (REGE et al., 2003).

A fim de definir o grau de desacetilação da quitosana muitos métodos analíticos têm sido propostos, como titulometria com ninhidrina (hidrato de tricetoidrindeno), espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear (MELLO et al., 2006).

A maioria dos trabalhos publicados sobre a determinação do grau de desacetilação da quitosana utiliza a técnica de espectroscopia de infravermelho, cujos dados são ajustados em equações relacionadas às bandas associadas aos grupos carbonila (C=O) do N-acetil e hidroxila (OH) presentes na quitina e quitosana. Geralmente as equações propostas utilizam os valores de absorvância das bandas

em 1655 e 3450 cm^{-1} , associadas à carbonila e hidroxila, respectivamente. A primeira banda varia conforme o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para quitosana, portanto, não sofre alteração (MELLO et al., 2006).

No caso de desacetilação da quitina, normalmente em meio básico, se produz a quitosana com o grupo amino livre, como mostra a Equação 1, podendo reagir com várias moléculas com a finalidade de tornar o biopolímero com maior disponibilidade de grupos pendentes, para exercer outras atividades e são ainda amplamente empregadas tanto nas formas de pó, esferas ou filmes (CRINI, 2005; KURITA, 2001).

$$GC=100 - \{(A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1,33\} \quad (1)$$

O fator 1,33 corresponde a constante que representa a razão (A_{1655}/A_{3450}) para quitinas completamente acetiladas. É assumido valor igual a zero para quitosanas completamente desacetiladas (KHAN et al., 2002).

Os valores obtidos em absorvância relativos a estes dois comprimentos de onda são utilizados para o cálculo do grau de desacetilação da amostra segundo equação proposta por Domszy e Roberts (1985) apresentada acima.

2.5.2.3 Membranas de Quitosana

Há algum tempo, membranas de quitosana têm sido submetidas à avaliação prática, sobretudo em decorrência de suas características físico-químicas, que resultam em propriedades como fácil formação de géis (ASSIS; SILVA, 2003).

As membranas utilizadas para procedimentos regenerativos devem apresentar biocompatibilidade, exclusão celular, manutenção de espaço, integração nos tecidos, manuseio clínico satisfatório e também atividade biológica (TATAKIS et al. 1999). A membrana também deve permitir ou facilitar a integração dos tecidos, o que resulta na estabilização da ferida (HARDWICK et al., 1995). A biocompatibilidade destas membranas vai depender também de fatores inerentes ao organismo, como a espécie, a herança genética e o local de implantação ou ação (SCHELLINI et al., 1999).

A técnica mais simples para a preparação das membranas de quitosana é através da evaporação de solvente em uma solução de quitosana que produz membranas resistentes e transparentes, com elevada capacidade de absorver água e lenta degradação enzimática pela lisozima, presente em tecidos e fluidos corporais de mamíferos (SCHELLINI et al., 1999).

As membranas de quitosana têm permeabilidade molecular seletiva, sendo afetada por sua espessura, grau de desacetilação, massa molar e grau de molhabilidade (CHEN et al., 2002). Devido às aplicações e características da quitosana dependerem fundamentalmente do grau de desacetilação, é exigido um rígido controle das condições reacionais, as quais são essenciais para o processo em escala industrial, considerando a necessidade de obtenção de um polímero de cadeia longa, com grau de desacetilação na faixa desejada (DALLAN, 2005).

Quando utilizada em ferimentos, a quitosana, sendo um material altamente hidrofílico em função do alto número de grupos amino (NH) e hidroxilas (OH) em sua estrutura, que por serem polares, favorece a migração de moléculas de água ao redor do mesmo. Essa absorção de água induz o intumescimento da membrana, isso ocorre devido à separação das cadeias que permite a respiração no local da ferida (ASSIS; SILVA, 2003).

A quitosana é umectante e adere melhor à ferida que o ácido hialurônico (SANDFORD, 1989), sua propriedade cicatrizante favorece a reconstituição fisiológica da pele (BIAGINI et al., 1992). O papel da quitosana na aceleração da cicatrização de lesões é devido à propriedade imunomoduladora tanto em ativar quase que exclusivamente o macrófago, como também na biodegradabilidade desse polímero no organismo (OLSEN et al., 1989).

Os efeitos benéficos do meio úmido no ferimento incluem a prevenção de desidratação do tecido e morte celular, angiogênese acelerada, desbridamento autolítico, pois ele retém as enzimas e água que ajudam na fibrinólise, e redução da dor, atribuída a proteção que o meio úmido fornece as terminações nervosas do ressecamento e exposição. Tais coberturas mantêm as células viáveis e permitem que elas liberem fatores de crescimento estimulando sua proliferação (FIELD; KERSTEIN, 1994).

Películas densas de quitosana têm sido recentemente testadas como “pele” temporária e material apropriado para reestruturação de cartilagens, em aplicações tópicas para regeneração e cicatrização de injúrias animais (NETTLES, 2001). O

processo cicatricial envolve uma complexa sequência de eventos celulares e bioquímicos caracterizados pela homeostase, inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular (PARK; BARBUL, 2004).

A reparação do tecido epitelial é dependente da idade, da nutrição e do uso de medicações. Este processo se divide em inflamação, proliferação e remodelamento para construção da matriz celular. Qualquer interferência nesse processo pode levar à formação de cicatrizes de má qualidade, sendo assim, a regeneração envolve a restituição dos componentes teciduais idênticos àqueles removidos ou destruídos (GLINARDELLO et al., 2009). Ao contrário, a cicatrização é uma resposta fibroproliferativa que "remenda" em vez de restaurar um tecido (LOPES, 2008).

Acredita-se que a eficácia da quitosana na cicatrização possa ser atribuída à estimulação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que auxiliam no processo de reparação tecidual, melhorando, aparentemente, a qualidade das feridas (UENO et al., 2001).

Compostos com 5% de quitosana mostraram-se eficazes no tratamento de feridas cirúrgicas em bovinos, favorecendo o processo cicatricial e auxiliando na redução do processo inflamatório (HELOU et al., 2008).

A quitosana e seus derivados têm sido utilizados com sucesso como agentes de revestimento para lipossomas com diâmetros na ordem de nanômetros criando um sistema híbrido denominado de quitossoma. Lipossomas com carga de superfície negativa são capazes de adsorver fortemente a quitosana solúvel por incubação, mudando significativamente as propriedades de superfície da partícula e a estabilidade da suspensão (MERTINS et al., 2006).

Diferentes polímeros vêm sendo usados como promotores da penetração através de pele e mucosas. Sais de quitosana e trimetilquitosana são capazes de aumentar a permeabilidade paracelular do epitélio de mucosas como a mucosa intestinal, nasal e bucal por abertura das *tight junctions*, desta forma, aumentando a absorção paracelular de fármacos macromoleculares e hidrofílicos. Nos últimos anos provou-se que as *tight junctions* também ocorrem na camada granular da epiderme sendo possível, portanto, que a quitosana também promova penetração percutânea pelo mesmo mecanismo (VALENTA; AUNER, 2004).

Segundo Assis et al., (2007) a quitosana resultou em um material transparente, flexível e com considerável resposta de biocompatibilidade e exerce uma influência benéfica nas diversas etapas da recuperação de injúrias cutâneas de ratos. Na

comparação com produto farmacêutico convencional (colóidio associado a antibiótico), a quitosana apresentou resultados similares, o que reforça seu potencial de aplicação médica, além de ser consideravelmente mais barato que o similar comercial.

Okamoto et al. (2003) mostraram que a quitina e a quitosana também reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana mais eficaz que a quitina, sob a mesma concentração de 0,1 mg/mL, embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas que a quitosana. A quitosana apresenta capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago. Isto explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade do mesmo no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Promovem também a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória (MUZZARELLI, 1992).

A resposta inflamatória é uma reação imunológica às bactérias cujo papel é oferecer moléculas e células aos sítios de inflamação para ajudar os macrófagos na defesa do organismo, proporcionar barreira física para prevenir a propagação da infecção e promover reparo dos tecidos danificados (JANEWAY et al., 2002).

A inflamação é classificada como aguda e crônica, sendo a aguda caracterizada como uma resposta que dura de minutos a dias, relativamente uniforme, como aumento de fluidos nos tecidos, proteínas plasmáticas e neutrófilos, onde participam ainda linfócitos, plaquetas, células endoteliais e outras células. A inflamação crônica se caracteriza como uma resposta de duração longa, dela participa macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais vasculares (ROSENBERG; GALLIN, 1999).

Para Deuel e Kawahara (1991) na cura normal de uma ferida observa-se a migração direta e sequencial de neutrófilos, monócitos e fibroblastos (de zero a sete dias), a ativação de macrófagos e fibroblastos, nova matriz extracelular e proliferação de fibroblastos (entre 14 e 21 dias) e a remodelação (de duas semanas

a um ano), e destacaram ainda que as plaquetas são importantes no ferimento de fatores quimiotáticos para leucócitos e macrófagos.

A N-acetilglicosamina é o maior componente do epitélio e sua presença é essencial na reparação tecidual das feridas. Quitina e quitosana são facilmente despolimerizadas pela lisozima, presente naturalmente no fluido da lesão, e funcionam como fontes de liberação retardada de monômeros N-acetilglicosamina no processo de cicatrização. Além disso, feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa (HELOU et al., 2008).

2.6 Lisozima

A lisozima é uma enzima encontrada nas lágrimas, na secreção nasal, na saliva, na mucosa intestinal (mucos intestinais), na pele, nos leucócitos, nos grânulos lisossomais dos fagócitos, na clara do ovo, no soro e no leite. É produzida principalmente pela célula monócito-macrófago e, parcialmente, pelos granulócitos, onde permanece na bagagem enzimática destas células até ser secretada nos variados líquidos orgânicos (soro, lágrima, saliva, mucos) (TIZARD, 2002).

Foi descoberta por Alexander Fleming em 1922 durante a realização de pesquisas com o intuito de descobrir novos antibióticos. Durante anos ele manipulou uma série de substâncias com objetivo de inibir o crescimento de culturas de bactérias; acidentalmente, durante uma gripe, percebeu que a contaminação do seu próprio muco tinha funcionado no combate às bactérias. A lisozima é responsável pela quebra ou clivagem hidrolítica de polissacarídeos complexos presentes na parede celular de algumas famílias de bactérias. É uma proteína globular, compactamente enrolada e que tem a maioria de seus grupos R hidrofóbicos voltados para o interior da macromolécula, protegidos da água, e a maioria dos seus grupos hidrofílicos voltados para a superfície de contato com o exterior. Sua estrutura primária é formada por uma cadeia peptídica de 129 aminoácidos. Sua estrutura tridimensional globular de 26 x 45 Å é bem menor comparativamente ao tamanho da proteína BSA (QASBA; KUMAR, 1997).

Sua estrutura terciária possui próximo de 40 % dos seus 129 resíduos de aminoácidos e estão em segmentos na forma de α -hélice e delimitam uma longa fenda em um dos lados da molécula. Esta fenda é o sítio catalítico da enzima (DUARTE et al., 1999).

As enzimas são biocatalizadores de origem protéica que apresentam a capacidade de reagir com substratos, formando complexos ou formando compostos através de ligações do tipo covalente, iônicas, entre outras. A especificidade de ligação da enzima a um substrato é quem caracteriza sua atividade biológica particular. Além de apresentarem alta especificidade pelo substrato, as enzimas apresentam atividade máxima quando em condições de temperatura, pH e estequiometria ideais para cada enzima (MARZZOCO; TORRES, 2007).

As enzimas apresentam um leque de possibilidades de aplicações químicas, biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas. A capacidade de ligação e especificidade enzimática ao substrato determina suas possíveis aplicações industriais e biotecnológicas. Atualmente, são utilizadas em diferentes processos como biossensores em bioengenharia, clinicamente em agentes terapêuticos, em modernos kits de diagnósticos e como catalisadores em reações químicas e bioquímicas (ALTUN; CETINUS, 2007).

A lisozima dissolve certas bactérias por clivagem hidrolítica do componente poliosídico de suas paredes. A função da parede nas bactérias é a de lhes conferir apoio mecânico. Uma célula bacteriana sem a parede geralmente se rompe devido à alta pressão osmótica dentro da célula. O alvo da lisozima é a porção glicídica das paredes. O poliosídeo da parede é constituído de dois tipos de oses: a N-acetilglicosamina e o N-acetilmuramato, ambos são derivados da glicosamina, nos quais a amina é acetilada. O poliosídeo da parede é um polímero de radicais alternados de N-acetilglicosamina e o N-acetilmuramato, reunidos por ligações β (1 \rightarrow 4)-glicosídicas. A lisozima é uma glicosidase que hidrolisa a ligação glicosídica entre C-1 do N-acetilmuramato e o C-4 do N-acetilglicosamina. A lisozima obtida da clara do ovo de galinha, altamente estável, é interligada por quatro pontes dissulfeto (TIZARD, 2002).

O pH ideal para a atividade lisozímica, embora seja um pouco baixo (pH de 3 a 6), é facilmente obtido nos locais inflamatórios, bem como dentro dos fagossomos. A lisozima também é uma opsonina potente, liberada por macrófagos, facilitando a

fagocitose na ausência de anticorpos específicos e sob condições nas quais a sua atividade enzimática possa ser ineficaz (TIZARD, 2002).

2.7 Macrófagos

Os macrófagos são células gigantes que derivam da medula óssea, a partir da célula precursora de macrófago e neutrófilo, a CFU-GM (unidade formadora de colônia de granulócito e macrófago), que dará origem ao monoblasto o qual se diferenciara a pró-monócito. Ao se dividirem, os pró-monócitos dão origem aos monócitos, que se dirigem para a corrente sanguínea e aí permanecem por várias horas, na forma de monócitos circulantes (LEE et al., 1996). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função (TACKE; RANDOLPH, 2006). A migração envolve aderência ao endotélio, transmigração entre as células endoteliais e, subseqüentemente, passagem através de estruturas subendoteliais, processo este dependente de moléculas de adesão. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos, tais como, espécies reativas de oxigênio, lisozima e proteinases neutras e ácidas, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (TAKEMURA; WERB, 1984).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea, assim como redução do tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (GRABHER et al., 2007). No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação, tornando-se apto a desempenhar funções complexas como quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e capacidade de morte tumoral. Esta ativação envolve dois estágios distintos: um em que os macrófagos inflamatórios apresentam elevada capacidade secretória, de espraiamento e de fagocitose; e outro estágio em que macrófagos ativados apresentam baixa atividade secretória, porém com marcada capacidade de produção de metabólitos reativos de oxigênio e

de óxido nítrico, importantes para sua função microbicida e tumoricida (JORENS et al., 1995).

A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do óxido nítrico consiste na sua reação com metais presentes nas enzimas, principalmente o ferro. Desta forma, enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia transportadora de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular são inativadas. A ação citotóxica indireta do óxido nítrico consiste, principalmente, da sua reação com os intermediários reativos do oxigênio, como a reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido que resulta na formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas. Há indícios de a produção de óxido nítrico seja o mecanismo antimicrobiano mais acentuado de macrófagos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

Os macrófagos podem ser descritos como formas evolutivas dos monócitos circulantes que saíram do sangue e fixaram residência nos tecidos. Seu papel relaciona-se a destruição dos fatores etiológicos da inflamação ou complementar a função dos neutrófilos na resposta aguda através da produção de citocinas. Entretanto, sua ação principal fica evidente nas inflamações crônicas atuando como células apresentadoras de antígeno (APCs) aos linfócitos T na imunidade específica. Uma vez ativados, os macrófagos liberam uma variedade de citocinas que possuem funções importantes na imunidade inata e ao mesmo tempo na preparação do cenário para que a resposta imune adaptativa se desenvolva (TERUI et al., 2000).

O processo de migração leucocitária pode ser dividido em quatro etapas distintas: marginação, processo onde os leucócitos assumem posição periférica em relação às células endoteliais e é influenciado pela modificação das condições hemodinâmicas; captura e rolamento, onde ocorre adesão transitória de leucócitos ao endotélio; adesão, firme união ao endotélio e; diapedese, onde ocorre a passagem de leucócitos entre as células endoteliais em direção ao tecido inflamado/lesionado (MULLER, 2003).

Durante o processo inflamatório ocorre influxo de células, acúmulo de mediadores inflamatórios, como as citocinas, e aumento na deposição da matriz extracelular. Citocinas regulam tanto a iniciação quanto a manutenção ou resolução da resposta imune inflamatória, além disso, elas direcionam o tipo de resposta imune e os mecanismos efetores que medeiam à resistência a patógenos. Entretanto,

algumas citocinas quando produzidas em excesso, podem induzir alterações em decorrência da liberação demasiada de substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio (HOMEY et al., 2006).

Os monócitos recrutados para o local lesado transformam-se em macrófagos fagocíticos, população de células predominantes na fase mais tardia da infecção. Macrófagos são considerados a mais importante célula reguladora na reação inflamatória; eles fagocitam, digerem e matam organismos patogênicos, além de destruir neutrófilos remanescentes (LI et al., 2007).

A fagocitose inicia-se com o espraiamento, caracterizado pela alteração da forma e redistribuição das organelas citoplasmáticas. As alterações na forma da célula aumentam a área de contato da membrana plasmática do fagócito com o substrato. Durante a aderência, ocorre a ativação de receptores de membrana para moléculas de adesão, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular. O fagossomo formado rapidamente se desenvolve em organelas microbicidas. Após migração do macrófago para o sítio de infecção, ocorre o reconhecimento do substrato e então se inicia um processo denominado fagocitose. A ligação aos receptores de membrana desencadeia a polimerização de filamentos de actina com conseqüente formação do fagossoma. Sua formação é seguida por eventos de fusão que levam à formação do fagolisossoma (AMER; SWANSON, 2002).

O macrófago é uma célula muito importante no processo de epitelização, pois com a ativação de macrófagos na região lesada e a produção de fatores de crescimento específicos, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (GUIDUGLI-NETO, 1992).

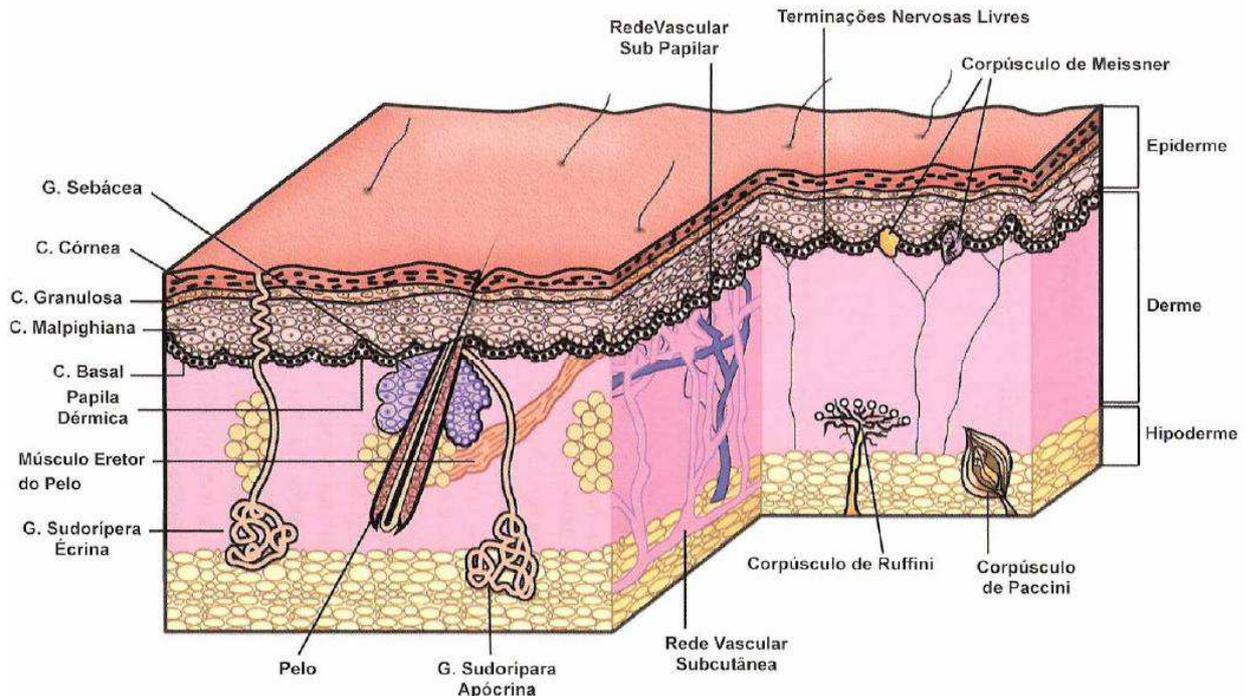
2.8 Epitelização

A epitelização é a regeneração da epiderme à volta da superfície da ferida. O exame dos bordos da ferida pode revelar se a ferida é aguda ou crônica e pode fornecer pistas para a sua etiologia (BARANOSKI; AYELLO, 2004).

A pele, representada na Figura 7, é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16 % do peso total corporal podendo representar nos adultos de 1,2 a 2,3 m² da superfície externa. É composta por duas camadas principais, sendo elas: a epiderme, de origem ectodérmica, e a derme, de

origem mesodérmica. Há ainda a hipoderme ou tecido subcutâneo, um tecido conjuntivo frouxo que contém um preenchimento de células adiposas, e o panículo adiposo, que atua como ligante da pele aos tecidos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Figura 7. Representação esquemática da pele.



Fonte: SAMPAIO e RIVITTI, 2001.

A epiderme consiste em cinco camadas, onde a camada córnea é a mais superficial e é uma camada fina de células escamosas mortas, comprimidas, que contêm queratina, uma proteína fibrosa que dá a cor à pele e são facilmente removidas durante o banho. A camada lúcida é uma linha agrupada de células translúcidas, que não são observáveis em pele fina, mas encontram-se apenas na planta das mãos e dos pés. A camada granulosa contém duas a cinco camadas de células de Langerhans. A camada espinhosa contém oito a dez camadas de células de Langerhans. A camada mais interna é camada basal, esta dá oportunidade às novas células de renovarem a célula mais externa, a qual tem falta de vasos sanguíneos e está constantemente a ser substituída. A derme ou cório está ligada à epiderme pela camada basal, que é composta por grupos de fibras de colágeno que apóiam a epiderme. A derme divide-se em duas camadas: a camada papilar é composta por colágeno e fibras reticulares, seu padrão distinto e único permite a

impressão digital de cada indivíduo e contêm capilares para receptores de manutenção cutânea e sinais de dor; a camada reticular é composta por feixes de colágeno que unem a pele ao tecido subcutâneo. Podem encontrar-se nesta camada glândulas sebáceas (que segregam o sebo, uma substância rica em óleo que lubrifica a pele), folículos pilosos, nervos e vasos sanguíneos (PHIPPS et al., 2003).

Dentre suas diversas funções, a pele atua como uma eficiente barreira física, secretando substâncias microbidas contra agentes agressores, ela reage aos estímulos antigênicos disparando o processo inflamatório e uma potente resposta de células T (LARREGINA; FALO, 2001).

A capacidade auto-regenerativa do tecido é um fenômeno universal nos organismos vivos. Clark (1993) dividiu o reparo em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelação. Segundo ele, estas não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas.

Macrófagos começam a se acumular localmente entre o segundo e o quinto dia após a lesão, sendo suas funções primárias auxiliar os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, debris teciduais e remover neutrófilos senis. No entanto, a sua participação mais relevante na inflamação e reparo tissular é a produção e liberação local de diversos fatores de crescimento e citocinas, cruciais na maturação da reação inflamatória e na iniciação do processo de cura da ferida. Os monócitos, ao transmigrarem pelas fenestrações entre as células endoteliais, são ativados assumindo fenótipo de macrófagos derivados de monócitos. Uma vez fora do leito capilar, estas células são também conduzidas ao local da lesão orientada por um gradiente de mediadores químicos com ação quimioatraente (ASSOIAN et al., 1983).

O reparo tissular é um processo complexo, que envolve a interação entre células estromais e circulatórias que são ativadas por uma plêiade de mediadores de natureza química diversificada, fragmentos de células e matriz extracelular, microorganismos e por alterações físico-químicas no microambiente da lesão e das áreas a ela circunjacentes (BALBINO et al., 2005).

Considerando a pele como um órgão extremamente susceptível a infecções de etiologias diversas, a produção de óxido nítrico (NO) parece ser um elemento chave particularmente no controle *in situ* de patógenos intracelulares (BOGDAN, 2001).

Além da resposta inespecífica da defesa do hospedeiro, a síntese de NO na pele é responsável por um papel chave na modulação da resposta a estímulos externos tais como calor, raios ultravioletas, resposta a infecção através de citocinas e cicatrização, bem como no desenvolvimento de certas condições patológicas (CALSGRIERSON; ORMEROD, 2004).

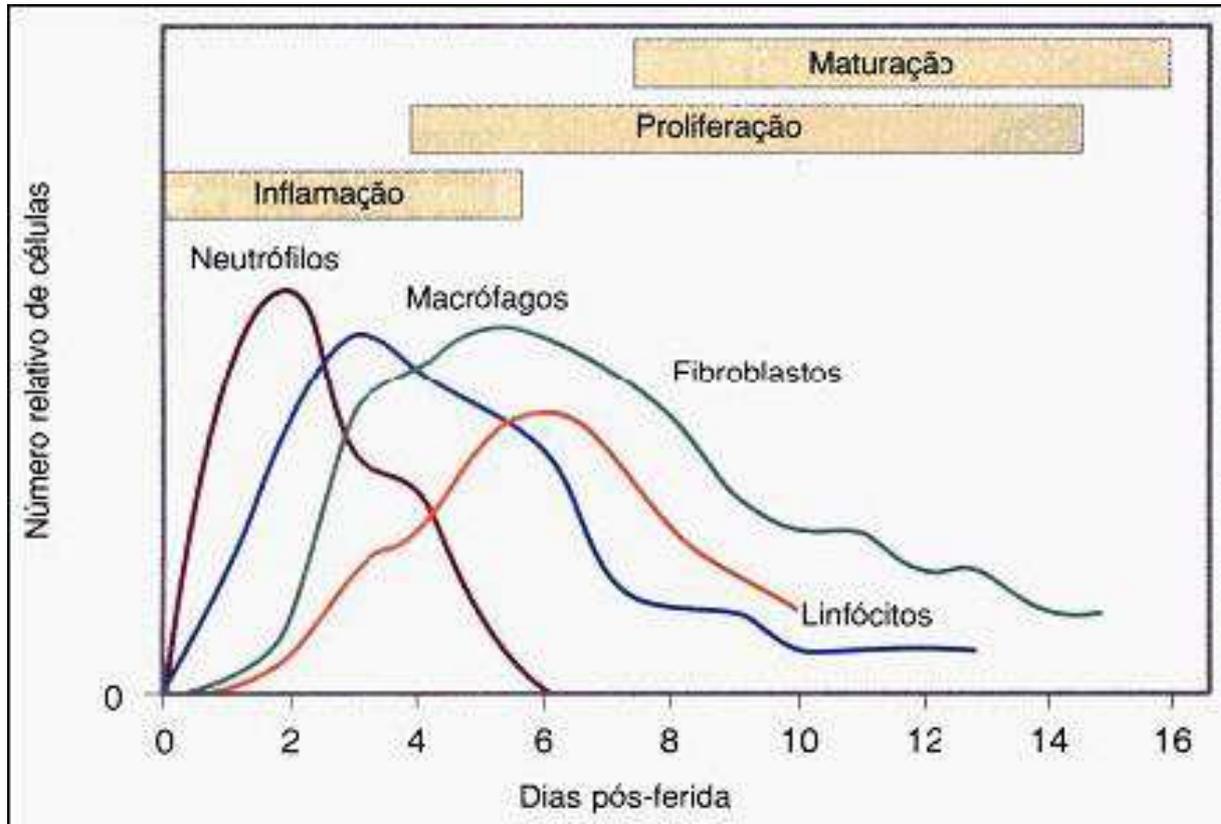
O NO é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra), altamente reativa e difusível. Esta molécula é sintetizada pela enzima NOs (óxido nítrico sintase) em dois passos de oxidação do aminoácido L-arginina produzindo em partes iguais Lcitrulina e NO (MIRANDA et al., 2000).

Com a lesão tecidual, há liberação local de histamina, serotonina e bradicinina que causam vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo no local e, conseqüentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor (TAZIMA et al., 2008).

A resposta inflamatória, que perdura cerca de três dias, e na qual ocorre a migração sequencial das células para a ferida é facilitada por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, favorecendo a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da ferida (TAZIMA et al., 2008).

Os primeiros elementos celulares a alcançar o local da ferida são os neutrófilos como observado na Figura 8, e os monócitos, com a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas antigênicas e corpos estranhos. O pico de atividade dos polimorfonucleares ocorre nas primeiras 24-48 horas após o trauma, seguindo-se de um maior aporte de macrófagos durante os dois a três dias seguintes. O macrófago, também ativa os elementos celulares das fases subseqüentes da cicatrização tais como fibroblastos e células endoteliais (TAZIMA et al., 2008).

Figura 8- Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases seqüenciais do processo de cicatrização



Fonte: TAZIMA et al., 2008.

Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio. Na pele os ceratinócitos são capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização das feridas cutâneas. As células epiteliais migram, a partir das bordas, sobre a área cruenta, da ferida e dos folículos pilosos próximos, induzindo a contração e a neopitelização da ferida e, assim, reduzindo a sua superfície. Os ceratinócitos, localizados na camada basal da epiderme residual ou na profundidade de apêndices dérmicos, revestidos de epitélio, migram para recobrir a ferida. As células epiteliais movem-se, aos saltos e desordenadamente, até as bordas, aproximando-as. A epitelização envolve uma seqüência de alterações nos ceratinócitos da ferida: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação. A matriz extracelular, também conhecida como substância fundamental, substitui rapidamente o coágulo depositado-se no leito da ferida logo após o trauma. A principal função da matriz é a restauração da continuidade do tecido lesado, funcionando como um arcabouço para a migração celular (TAZIMA et al., 2008).

O cálcio também é importante no processo de epitelização, pois, quando circulante na corrente sanguínea ajuda a transportar os nutrientes através das membranas celulares e também participa na produção de hormônios e enzimas que regulam a digestão e o metabolismo, sendo necessário para cicatrização de feridas e para contração muscular (MAGNONI; CUKIER, 2004).

2.9 Cálcio

O cálcio é um nutriente importante pelo papel que desempenha em diversos mecanismos intra e extracelulares. A nível intracelular constitui um importante segundo mensageiro e um co-fator para proteínas e enzimas regulando processos celulares essencial como neurotransmissão, mobilidade, secreção hormonal ou proliferação celular. A nível extracelular funciona como co-fator na adesão de moléculas, fatores de coagulação e outras proteínas regulam a excitabilidade neuronal e é uma parte essencial da fase mineral do osso (BROWN, 2000). É o elemento mais abundante no organismo humano. Como também é o principal elemento da casca do ovo, o que se justifica uma abordagem acerca das propriedades químicas e funcionais deste elemento, importância nutritiva, biodisponibilidade, valorização da casca de ovo como fonte de carbonato de cálcio, podendo, também ser uma alternativa para preencher defeitos ósseos (AGRIPINO, 2009).

O cálcio apresenta-se ligado a proteína em 45 a 50%, sendo que 80% liga-se a albumina e 20% a globulina. Outros 45 a 50% circulam em forma iônica e 8% estão complexados ao citrato, fosfato e sulfato. O cálcio iônico é fisiologicamente ativo e, conforme as necessidades orgânicas, passa para as células dos tecidos excitáveis e ao tecido ósseo. O organismo preserva o cálcio plasmático, assim, cerca de 90% é reabsorvido nos túbulos proximais, nas alças de Henle e na porção inicial dos túbulos distais. Quando baixa, esta reabsorção é grande, de modo que quase nenhum cálcio é perdido na urina (GUYTON; HALL, 1997).

A excreção diária de cálcio é principalmente urinária (150-250 mg) e fecal (100-150 mg) havendo menores perdas pelo suor (15 mg), bile, suco pancreático e saliva (menor que 1%) (MAGNONI; CUKIER, 2004).

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, encontrando-se na composição do esqueleto adulto em cerca de 99%. Além de ter um papel estrutural em vegetais e animais, desempenha um papel essencial em numerosos processos bioquímicos e fisiológicos como na fotossíntese, fosforilação oxidativa, coagulação sanguínea, contração muscular, divisão celular, transmissão de impulsos nervosos, atividade enzimática, função da membrana celular e na secreção hormonal, tendo como característica principal a mineralização de ossos e dentes. É o mineral mais ativo, sendo essencial para uma série de funções metabólicas, principalmente no desenvolvimento da ave (FENNEMA, 2000).

O suprimento adequado de cálcio está diretamente relacionado à formação do osso, principalmente durante a infância e adolescência, sendo um dos fatores que auxiliam a maximização da massa óssea, contribuindo para a prevenção de riscos de desenvolvimento de osteoporose e de fraturas na vida adulta e terceira idade (WAITZBERG, 2000). Se as quantidades fornecidas pela dieta forem inadequadas, o cálcio será mobilizado dos ossos para a corrente sanguínea, reduzindo assim, seu conteúdo nos ossos e aumentando a fragilidade deles (CASHMANN, 2002).

Uma alimentação deficiente em cálcio compromete a formação do tecido ósseo e induz à perda da densidade óssea, levando à osteoporose. Essa enfermidade não está restrita aos idosos, mas é também comum entre adolescentes com amenorréia, e representa um grave problema de saúde pública quer pela incapacidade física dos pacientes quer pelo tratamento prolongado das fraturas decorrentes da doença (GURR, 1999).

Está bem documentado na literatura o fato de que a dieta de populações de diferentes países é deficiente em cálcio, fornecendo quantidades de cálcio que em geral não ultrapassam 50 % das quotas recomendadas de ingestão do mineral. Isso ocorre porque o consumo de leite e produtos derivados (principais fontes alimentares de cálcio) não é, na maioria das vezes, suficiente para atingir o aporte adequado de cálcio, especialmente no caso de adolescentes e idosos (LERNER et al., 2000; GURR, 1999).

Diversos estudos mostram que a otimização da massa óssea ocorre na infância e adolescência. No adulto a massa óssea permanece constante, porém a partir dos 40 anos de idade, em ambos os sexos, há uma perda progressiva de 0,5% a 1% ao ano, e esta perda é aumentada em mulheres após menopausa (BRYANT et al., 1999). Admite-se, que menos de 25% da população adulta

apresente consumo adequado de cálcio. A maioria das mulheres recebe menos de 500 mg de cálcio através da dieta, quantidade esta abaixo das recomendações nutricionais de 1-1,5 g para mulheres na pré e pós-menopausa (FERNANDES, 1998).

As atuais recomendações dietéticas para cálcio são de 210 mg para bebês de 0-6 meses e 270 mg para bebês de 7-12 meses, 500 mg para crianças de 1 a 3 anos, 800 mg para crianças de 4 a 8 anos, 1300 mg para adolescentes de 9 a 18 anos, 1000 mg para adultos com idade de 19 a 50 anos e 1200 mg para adultos com idade de 51 anos ou mais. De acordo com a Academia Nacional de Ciências (NAS) o nível máximo tolerável deverá ser de 2.500 mg de cálcio por dia (DAWSON-HUGHES et al., 1990).

O cálcio que se encontra em forma ligada nos alimentos e sua biodisponibilidade é baixa dependendo da composição do alimento ou da comida. Por isso, a deficiência deste mineral é o resultado da combinação de uma biodisponibilidade pobre e uma ingestão insuficiente. A deficiência do cálcio pode levar a osteopenia e osteoporose e aumenta o risco de fraturas, especialmente nos ossos mais porosos. Também sua deficiência pode causar: agitação, unhas quebradiças, propensão à cárie, depressão, hipertensão, insônia, irritabilidade, entre outras. No entanto, o excesso pode ocasionar as conhecidas “pedras” nos rins, que são na verdade pequenos aglomerados de substância conhecida como oxalato de cálcio. Este tipo de formação é mais comum em decorrência da ingestão de cálcio de origem mineral (presente no solo e conseqüentemente na água de determinadas regiões) e também em alguns suplementos alimentares, já que este tipo de cálcio não é muito bem absorvido pelo organismo (FENNEMA, 2000).

Adultos com mais de 70 anos de idade tendem a diminuir a atividade física, a ingestão alimentar e a exposição à luz solar e nestes casos para se obter a quantidade de cálcio ideal é necessária a utilização de suplementos, em doses não maiores que 500 mg, tomados com as refeições (carbonato de cálcio ou fosfato), ou com o estômago vazio (citrato de cálcio) (ATKINSON; WARD, 2001).

A absorção do cálcio dos alimentos está determinada pela concentração de cálcio do alimento e a presença de inibidores ou potenciadores da absorção de cálcio. Os principais inibidores da dieta na absorção do cálcio são os oxalatos e fitatos, sendo o oxalato o mais potente dos dois (WEAVER; PLAWECKI, 1994).

O consumo de uma quantidade adequada de cálcio ou alimentos lácteos ricos em cálcio tem demonstrado reduzir os riscos de osteoporose (DAWSON-HUGHES et al., 1990).

O cálcio está presente na casca de ovo na forma de carbonato de cálcio e na proporção de cerca de 40% do produto em pó. Além do aspecto econômico, o cálcio da casca de ovo apresenta vantagens nutricionais, pois não está associado a elevadas quantidades de proteína e sódio (como acontece, por exemplo, nos queijos), que podem induzir a um aumento da excreção renal de cálcio (WEINSIER e KRUMDIECK, 2000).

Todo o cálcio intra e extracelular provém da dieta e o crescente reconhecimento da importância desta como fonte única para a miríade de funções biológicas que desempenha, levou a que o denominassem “super estrela dos nutrientes” (BRODY, 1998).

2.10 Carbonato de Cálcio

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um mineral vastamente encontrado na natureza em conchas marinhas, casca de ovos e, no corpo humano. É o quinto mineral em abundância e possui uma estrutura molecular tetraédrica. Tem aparência de um pó branco, com densidade de $2,83 \text{ g/cm}^3$, ponto de fusão de 850°C , sendo insolúvel em água. Pode ser obtido pelo resultado da reação do óxido de cálcio com dióxido de carbono (Equação 2) e é encontrado em três formas cristalinas: calcita (mais estável), vaterita (menos estável) e aragonita (LAKSHMINARAYANAN et al., 2006; SARIKAYA et al., 2003).



O estudo com carbonato de cálcio retirado de organismos vivos é de grande interesse na área de biologia estrutural, medicina, ciência do estado sólido e tecnologia de materiais. Como aplicações, a longo prazo, pode-se destacar a confecção de próteses, filtros, compreensão da formação de dentes, osso, cálculos renais, síntese controlada de insumos de eletrônica e catálise, matérias primas para engenharia e mineração marinha (MANN; PERRY, 1991).

O carbonato de cálcio retirado da casca do ovo é um cristal que ocorre naturalmente na forma de calcita (cristais hexagonais), apresentando baixa solubilidade em água (NEVES, 1998). É um dos materiais mais absorventes que existem na natureza. Apresenta baixa biodisponibilidade, porém quando transformado em citrato de cálcio, pode ser utilizado em dietas como um suplemento que apresenta maior absorção (MURAKAMI, 2006). Tais características sugerem que este material possa ser utilizado para o desenvolvimento de novos produtos (OLIVEIRA et al., 2009), além de ter a vantagem de não conter elementos tóxicos (MURAKAMI, 2006).

Nos materiais originários de sistemas vivos, como osso e conchas, que consistem em macromoléculas orgânicas (colágeno e quitina), impregnados de cristais inorgânicos (fosfato e carbonato de cálcio, respectivamente), o controle da formação de cristais com orientação preferencial é bastante comum, assim como a composição e morfologia dos mesmos é diferente das encontradas em precipitados de origem não biológica. Tal especificidade é explicada pela presença das macromoléculas, que, ao nível molecular, controlam a nucleação, o hábito e o ordenamento dos cristais. Além disso, estas macromoléculas exercem importante influência nas propriedades biomecânicas nestes materiais (FALINI et al., 1996).

Em sistemas vivos, a escolha dos elementos constituintes é regida por quatro fatores: abundância, eficiência, conveniência e aumento da eficiência/especificidade evolutiva. Levando em consideração todos esses fatores, os compostos de cálcio são os mais adequados para funções estruturais e de proteção, com boas propriedades de resistências a impacto, flexão e leveza; além de serem sintetizados a pressão e temperatura ambiente (WEINER; ADDADI, 1997).

Dentre os compostos de cálcio encontrados em seres vivos, este estudo se limitará apenas ao carbonato de cálcio. Segundo Freire e Holanda (2007), o carbonato da casca de ovo de galinha é uma matéria prima alternativa de baixo custo, para fabricação de revestimento cerâmico poroso. Um dos maiores problemas no processamento da casca de ovo é separar completamente o carbonato da membrana de forma econômica e ambientalmente correta (HSIEH, 2005).

Segundo Cordeiro, et al., (2008) o carbonato de cálcio, extraído da casca do ovo, apresenta indicativo que o mesmo funciona como material osteoindutor. Esta característica pode permitir que o carbonato de cálcio possa ser utilizado como enxerto ósseo.

Alguns minerais entram na formação dos ossos e da casca do ovo, outros são necessários aos processos metabólicos, hormonais e enzimáticos. Os minerais também são importantes na manutenção do balanço ácido-básico (pH) do sangue, na pressão osmótica e balanço da água corporal, na excitação dos nervos e músculos no transporte de nutrientes através de membranas e na regulação da permeabilidade das membranas de vários tecidos, além de fazerem parte da composição de várias enzimas (McDOWELL, 1999).

O tecido ósseo está constantemente sendo reformulado por células especializadas, de acordo com as necessidades do organismo e também de estresses mecânicos sobre os ossos. Mas em algumas situações pode ocorrer um equilíbrio negativo de cálcio, e a retirada pode exceder os depósitos (WILLIAMS, 1997).

Para Neves (2003), o pó da casca de ovo, quando preparado de forma adequada, constitui uma fonte de cálcio de alto valor nutritivo e que pode contribuir de forma significativa para o aporte diário de cálcio, sobretudo das populações de baixa renda.

2.11 Casca de Ovo

A casca de ovo é uma rica fonte de sais minerais servindo como base para desenvolvimento de produtos na indústria cosmética, suplementos alimentares, biocerâmicas, fertilizantes, implantes ósseos e dentários e como agentes anti-tártaro em cremes dentais (MURAKAMI, 2006), composta por várias camadas porosas, sendo permeável à água e aos gases, o que permite a respiração do embrião. A porção cerâmica tem a função de proteger o conteúdo do ovo e garantir o cálcio necessário a formação do esqueleto do feto. Sua camada calcária é composta por uma rede de fibras protéicas, entre as quais se inserem cristais de carbono de cálcio (96% do peso da casca), carbonato de magnésio (1%) e fosfato de cálcio (1%) (NEVES, 1998).

A indústria alimentícia brasileira anualmente consome enormes quantidades de ovos galináceos para produção de massas, pães, doces, maionese, entre outros. Esta atividade, no entanto, é acompanhada pela geração de grande quantidade de

resíduo na forma de casca de ovo. São gerados no Brasil cerca de 172.000 toneladas de casca de ovo por ano (NOVELLI et al., 2005).

Em geral a maioria do resíduo de casca de ovo gerado no Brasil tem sido descartado no meio ambiente. Embora o resíduo de casca de ovo não seja considerado perigoso, ele não pode ser simplesmente descartado em aterros sanitários e lixões. Isto se deve ao fato de atrair ratos e vermes causando problema ambiental e de saúde pública (FREIRE; HOLANDA, 2007).

Dupoirieux, et al., (1995) transformaram a casca de ovo em partículas e testaram a sua resposta no tecido muscular e no osso mandibular de rato. Para o experimento I, introduziram 50 mg de pó da casca de ovo no músculo da coxa direita; para o experimento II, foram criados defeitos de 0,5 mm nos dois lados do ramo da mandíbula (lado direito experimental), onde foram introduzidos \pm 200 mg de pó da casca de ovo. Os animais foram sacrificados oito semanas depois do ato cirúrgico e as peças processadas e coradas por hematoxilina–eosina. Os resultados do experimento I mostraram que, histologicamente, as partículas da casca de ovo estavam envolvidas por uma fina camada fibrosa, com pouca ou nenhuma reação inflamatória dentro do músculo, registrando-se ocasional presença de células gigantes e desprovidas de formação de osso. No experimento II, mostrou partículas da casca de ovo rodeadas por finas camadas de tecido conjuntivo, livre de formação ou indução de osso ou cartilagem; no grupo controle, os orifícios foram preenchidos por tecido conjuntivo fibroso.

A quitosana, derivada da quitina, e o carbonato de cálcio, derivado da casca do ovo, são considerados materiais em abundância na natureza e apresentam propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade que atribui aos mesmos, grandes potenciais para uso como biomaterial, podendo ressaltar, ainda, seu baixo custo (LAKSHMINARAYANAN et al., 2006; SARIKAYA et al., 2003; MAJETI; KUMAR, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A quitosana (CS) foi adquirida na forma de pó pela Polymar – Fortaleza/CE com grau de desacetilação de 90% e utilizada sem purificação.

O carbonato de cálcio foi extraído da casca de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*).

O ácido acético glacial P.A., fornecido pela Vetec, foi usado para extração do carbonato de cálcio da casca do ovo e como solvente para a quitosana.

O hidróxido de sódio P.A., também fornecido pela Vetec, foi usado para neutralizar o pH das membranas.

Camudongos machos *Swis*, procedentes do CEMIB (Centros Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), São Paulo. Todos os procedimentos que utilizaram células vivas foram conduzidos conforme normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratórios) e que obtiveram parecer do Comitê de Ética local (parecer nº08/2009 CEP/FCF/CAr).

A lisozima e o tampão PBS foram adquiridos do fornecedor Sigma Aldrich.

3.2 Métodos

3.2.1 *Preparação das Membranas de Quitosana*

A preparação das membranas de quitosana foi conduzida de acordo com a técnica de evaporação de solvente. Uma solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial sob agitação magnética a 45 °C por 2 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de petri com diâmetros de 115 mm e acondicionado em estufa a 50 °C por 24 h para evaporação do ácido e formação da membrana. Após a secagem das membranas, as mesmas foram retiradas da estufa e, em seguida, foi adicionado

50 mL de solução de hidróxido de sódio 1 Mol/L sobre a membrana permanecendo por 2 h a fim de assegurar a completa neutralização. Em seguida, as membranas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso da solução de hidróxido de sódio e posteriormente submersas em recipiente contendo água destilada na proporção de 500 mL de água destilada para cada membrana por 1 h. Após esse período, as membranas foram novamente submersas em água destilada por mais meia hora para que a neutralização das membranas fosse atingida. Depois da neutralização, as membranas foram secas por 24 h a temperatura ambiente e caracterizadas.

3.2.2 Preparação das Membranas com Carbonato de Cálcio

Para obtenção das membranas com carbonato de cálcio, o procedimento de preparação foi realizado em duas etapas:

1ª Etapa: Extração do carbonato de cálcio da casca do ovo

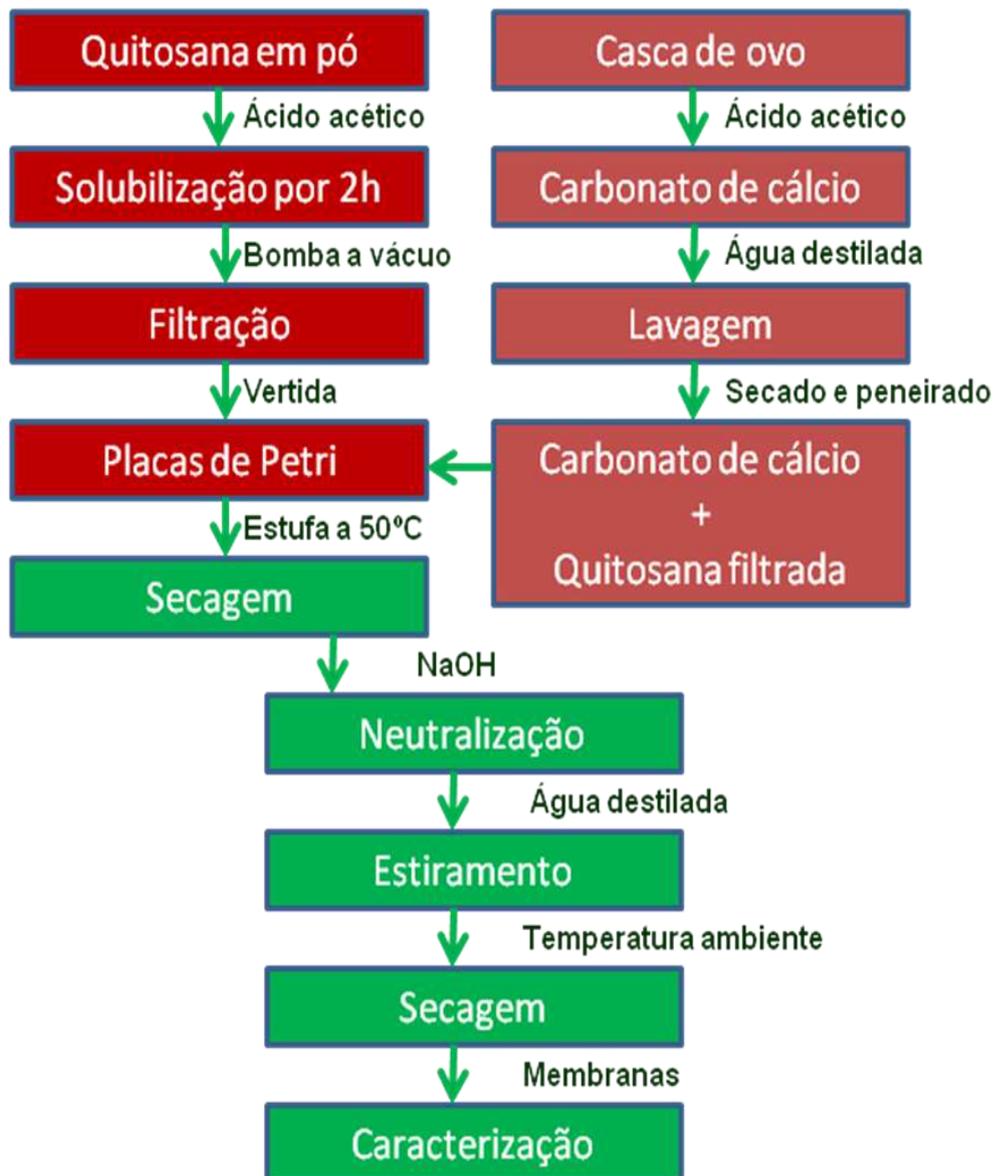
Cascas de ovos de galinhas foram coletadas em ambiente doméstico, lavadas, secadas ao sol e colocadas dentro de um recipiente com solução a 2% de ácido acético glacial (v/v) por 72 h. Após esse período, o sedimentado de carbonato de cálcio foi separado da solução de ácido acético. Após a retirada do ácido, foi colocada água destilada sobre o carbonato de cálcio para lavagem e retirada do excesso de ácido acético. Este procedimento foi repetido três vezes. Depois da última lavagem, o carbonato de cálcio foi colocado para secar por 24 h a 110 °C. Em seguida, o pó foi triturado em almofariz e passado em peneira malha 325 (abertura da malha 45 microns) para ser usado neste experimento.

2ª Etapa: Preparação das Membranas de Quitosana com Carbonato de Cálcio

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1g de quitosana em 100 mL de ácido acético glacial 1% (v/v) sob agitação magnética a

aproximadamente 45°C por 2 h. Obtida a solução polimérica, foram preparadas dispersões de carbonato de cálcio, colocando-as na solução de quitosana sob temperatura ambiente e agitação magnética por 2 h. Passado este tempo, as dispersões, nas proporções de 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio em solução de quitosana foram vertidas em placas de petri, com 115 mm de diâmetro e acondicionadas em estufa, a 50°C, por 24 h para obtenção das membranas. As membranas passaram pelo mesmo método de neutralização descrito para as membranas de quitosana. Todas as membranas foram secas por 2 h, a 50°C antes de serem caracterizadas. A sequência operacional de elaboração das membranas é observada na Figura 9.

Figura 9 - Seqüência operacional de elaboração das membranas.



3.3 Caracterização

O pó de carbonato de cálcio foi caracterizado por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TG).

As membranas de quitosana pura e com diferentes proporções de carbonato de cálcio foram caracterizados por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Tensão Superficial por medidas do ângulo de contato (TS), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO), Ensaio de Biodegradação Enzimática, Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina, Estabilidade em Meio Ruminal, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos, Determinação da Produção de Óxido Nítrico e Ensaio Mecânico (ensaio de tração).

Com exceção da Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e Determinação da Produção de Óxido Nítrico, que foi realizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara, as demais análises foram realizadas no Laboratório de Referência em Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais da Região Nordeste do Brasil.

3.3.1 Difração de raios X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. O pó extraído da casca do ovo e as membranas de quitosana e de quitosana com carbonato de cálcio foram examinados em um intervalo de 2θ entre 5,0 e 70,0 graus a uma velocidade de 1°/min.

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

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do pó de carbonato de cálcio e das membranas foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} .

Esta técnica tem grande valor para a análise orgânica qualitativa e compreende a faixa do espectro eletromagnético que vai do limite superior da faixa de microondas até o começo da região visível, com comprimento de onda entre 14000 cm^{-1} e 20 cm^{-1} , porém considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais da molécula (FOOK, 2005, LOPES; FASCIO, 2004).

Considerando que a frequência da radiação infravermelha e que, quando radiação infravermelha incide em uma substância, a radiação de mesma frequência que as frequências vibracionais das ligações são absorvidas, é possível deduzir as frequências de vibração de uma molécula, observando as frequências que são seletivamente removidas de vibração infravermelho.

3.3.3 Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada na análise do formato da gota. 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 fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG e encontra-se instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais da Unidade Acadêmica de Ciências e Engenharia de Materiais, da mesma Universidade.

3.3.4 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi empregada para examinar possíveis interações entre a matriz polimérica e a carga (carbonato de cálcio) e observar o comportamento e a estabilidade térmica de cada amostra. A análise foi realizada em um equipamento DSCQ20 (TA Instruments, EUA). As curvas foram analisadas em atmosfera de dinâmica de nitrogênio (50mL min^{-1}) usando amostras de 2 mg e razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As amostras foram pesadas com precisão ($\pm 0,1\text{mg}$) e prensadas em placas de alumínio. A calibração do equipamento foi feita com metal índio (99,9%) em relação à temperatura e entalpia. As curvas de DSC foram registradas de 0 a 400°C .

3.3.5 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em um aparelho modelo SDT Q600, (TA Instruments, EUA), com uma quantidade de material de aproximadamente 5,0 mg. O carbonato de cálcio, as membranas de quitosana e de quitosana com carbonato de cálcio foram aquecidos a uma razão de aquecimento de 10°C/min , sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL min^{-1} . As curvas de TG foram registradas de 35 a 900°C .

3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram retirados fragmentos de aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$ de cada membrana. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

3.3.7 Microscopia Ótica (MO)

Para avaliação morfológica e distribuição das partículas de carbonato de cálcio na membrana foi utilizado um microscópio ótico Leica DMLM com aumento de 400x.

3.3.8 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Para este ensaio empregou-se como base as normas ASTM F1635-04 *Standard teste 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). As membranas secas foram cortadas na dimensão de 2,0 cm², pesadas em balança analítica e esterilizadas com álcool a 70%. Em seguida as membranas foram isoladas em placas de Petri. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS com concentração de 1mg/mL, o segundo apenas com a solução de PBS para controle.

Foram utilizadas cinco amostras da membrana de quitosana e cinco amostras de cada membrana composta de quitosana/carbonato, tanto para a solução de lisozima como para o tampão PBS, em dois lotes, resultando em 40 amostras. As membranas foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37 °C, sendo retiradas da estufa após 30 dias, seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 48 horas em estufa a 50 °C e pesagem em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas, observados a partir da média de ensaios repetidos em cinco amostras.

3.3.9 Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina

Neste ensaio foram considerados quatro grupos de membranas: G1–membranas de quitosana; G2–membranas compostas de quitosana mais 1% de carbonato de cálcio; G3–membranas compostas de quitosana mais 5% de carbonato de cálcio e o G4–membranas compostas de quitosana mais 10% de carbonato de cálcio. Cada grupo constou de seis membranas, sendo três imersas em solução de hidróxido de sódio com o pH ajustado entre 8 e 9 e três imersas em solução de ácido acético com pH entre 5,5°C - 6,5°C em temperatura de 38°C – 40°C. As membranas foram imersas por sete dias. Antes do ensaio, as membranas foram secas em estufa a temperatura de 50°C por 48 h, em seguida pesadas cinco vezes até a estabilidade do valor em balança digital e após os sete dias as mesmas foram lavadas em água destiladas e novamente secadas em estufa a 50 °C por 48 h, as mesmas foram novamente pesadas. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas. Foram feitas cinco medidas e retirada à média. As membranas foram observadas diariamente para observação de possíveis alterações das mesmas dentro das soluções.

3.3.10 Estabilidade em Meio Ruminal

Para este ensaio foram formados grupos de membranas de acordo com o ensaio anterior. As membranas foram colocadas em sacos de papel filtro, identificadas e colocadas dentro de recipiente contendo suco ruminal obtido de ovino logo após ser abatido. Este ensaio teve a finalidade de observar a possível degradação das membranas quando em contato com o alimento do rumem no período de sete dias. A coleta do suco ruminal foi obtida em um matadouro de caprinos e ovinos na cidade de Campina Grande – PB. O procedimento para observação da degradação das membranas foi semelhante ao realizado no ensaio anterior, onde todas as membranas foram pesadas antes e após serem submetidas ao referido ensaio.

A avaliação da degradação dos alimentos, diretamente no rúmen de ovinos fistulados, utilizando sacos de material sintético, foi proposta por Quin et al. (1938) e

posteriormente, inúmeros pesquisadores têm melhorado e adaptado esta técnica, tornando-a bastante utilizada, devido a sua rapidez, facilidade de execução, baixos custos e precisão (OLIVEIRA et al., 2003)

3.3.11 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Com o objetivo de atender a norma ISO 0993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficarão em contato com a pele, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. De uma forma geral, neste teste realizam-se ensaios quantitativos para avaliar a interrupção da atividade mitocondrial pela quantificação da formação de cristais de formazana, a partir da redução do tetrazólio MTT. Ou seja, avalia-se a viabilidade celular partindo do princípio que as células viáveis, uma vez em contato com o MTT, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas, havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, que pode ser detectado pela leitura da absorbância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm.

Para a concretização desta etapa, fez-se necessário a obtenção das células do exsudato peritoneal que foi realizada a partir do procedimento descrito a seguir.

Para obtenção das células do exsudato peritoneal foram utilizados 5 camundongos Swiss, previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco Lab. LTDA) a 3,0 %, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO₂. Os macrófagos do exsudato peritoneal foram coletados para preparo da suspensão celular. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de $5 \cdot 10^6$ células em meio RPMI-1640-C.

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por poços das suspensões de células do exsudato peritoneal de camundongos, em seguida foi adicionado um disco, confeccionado a partir das membranas de quitosana e quitosana/carbonato de cálcio, com diferentes

concentrações. Foram utilizados 5 discos de cada composição de membrana para cada animal.

Em outras cavidades da referida placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionadas 100 µL de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, adquirido da Sigma Aldrich a uma concentração de 10 µL, ou apenas meio de cultura (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados, sendo retirados inclusive as membranas de quitosana e quitosana/carbonato de cálcio em diferentes preparações e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland*) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade.

3.3.12 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1 % de N-1-naftil-etilenodiamina, 1 % de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5 %, utilizando NaNO₂ como padrão (GREEN et al, 1982).

As células obtidas do exsudado peritoneal foram ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL, em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos, de 96 poços. A cada poço foram adicionados 100 µL dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C, por 60 min, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂ (Thermo electron Hepa Class 100). Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C, divididos em dois volumes iguais de 50 µL, sendo que entre eles, foi adicionado um disco, confeccionado a partir de membranas de quitosana e quitosana/carbonato de

cálcio, em três composições diferentes ou ainda 100 µL de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 µg/mL, como controle positivo, ou somente de RPMI-1640-C, como controle negativo. Estas placas foram novamente incubadas a 37 °C, em estufa com tensão constante de 5 % de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100), por 24 horas. Então, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células, não estéril, contendo 96 poços de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas, a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em µmols de nitrito.

A análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t-Student* na versão de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer* para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad InStat 3.00* (*GraphPad software*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

3.3.13 Ensaio Mecânico de Tração

Para o ensaio de tração foram utilizadas 5 amostras de cada condição de preparação de membranas e as médias de todas as amostras para maior representatividade dos dados obtidos. Os ensaios de tração foram realizados de acordo com a norma ASTM D882-91 (ASTM, 1991) e teve o objetivo de avaliar o efeito das partículas de carbonato de cálcio na resistência a tração das membranas de quitosana.

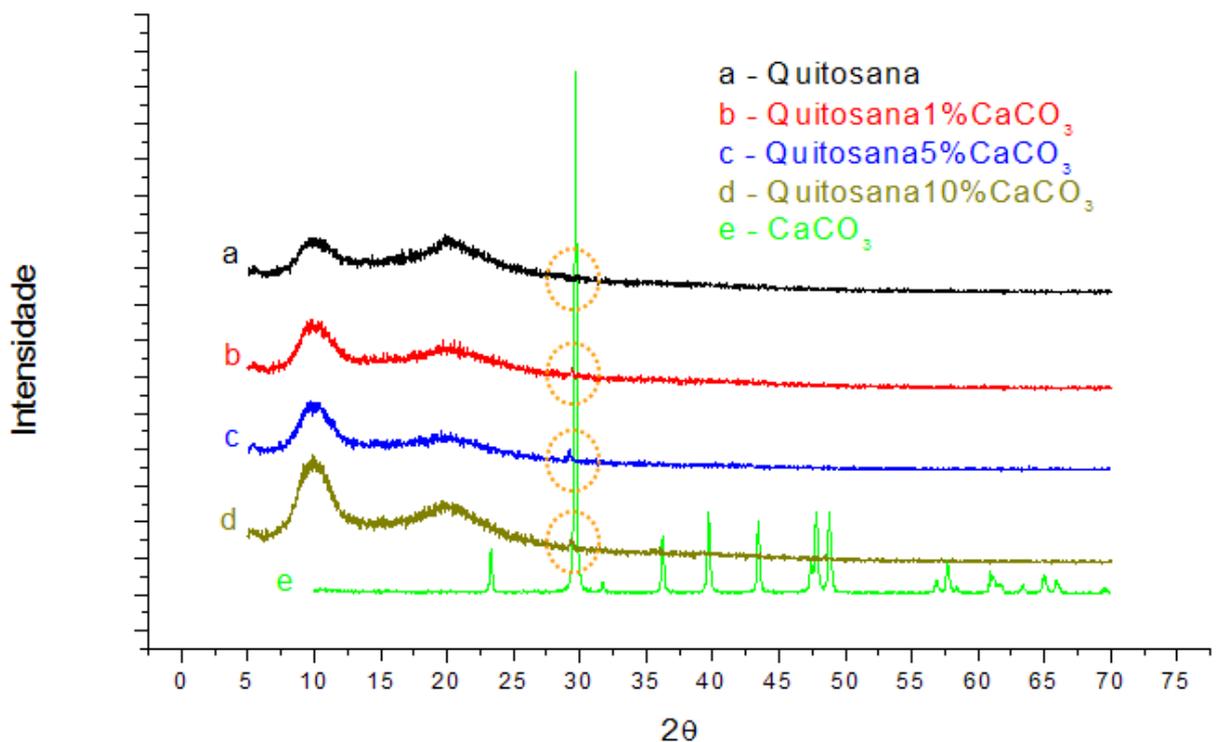
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de raios X (DRX)

O pó de carbonato de cálcio e todas as membranas foram caracterizados por difração de raios X com a finalidade de observar a influência do carbonato de cálcio na cristalinidade e conseqüentemente nas propriedades das membranas.

Os difratogramas da membrana de quitosana, do carbonato de cálcio e dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio (1%, 5% e 10%) estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Difratograma de raios X do carbonato de cálcio, extraído da casca do ovo, da quitosana e compósitos com 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio



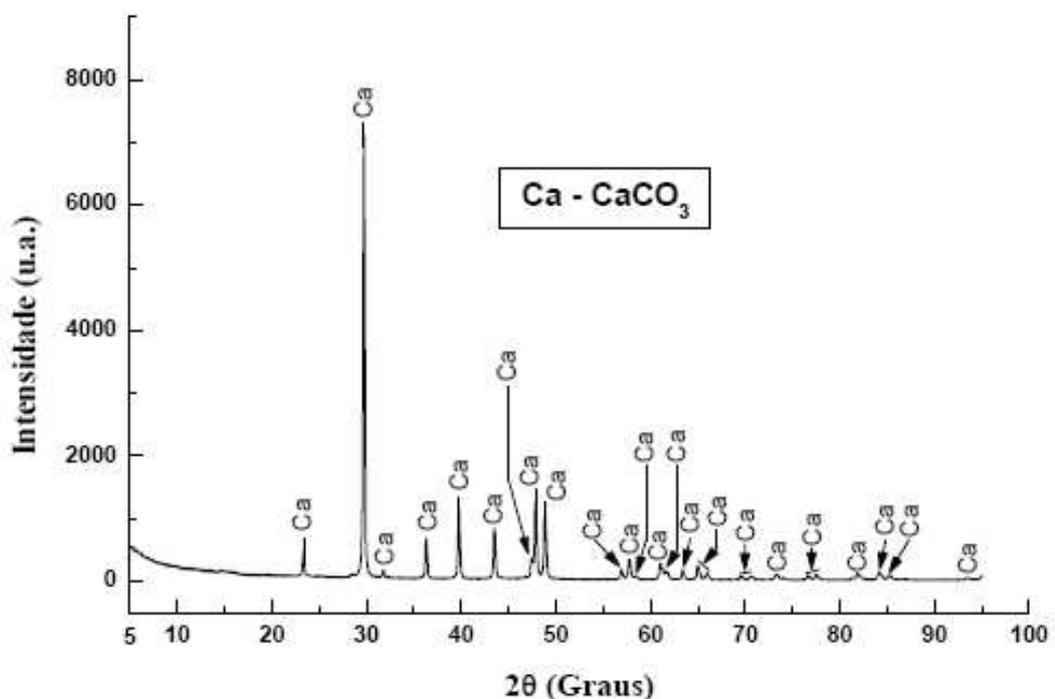
O difratograma da membrana de quitosana apresentou picos típicos de material semicristalinos, com base larga em torno de $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$ e corrobora com Luo et al., (2011), Aimoli, (2007), Fidèles, (2010) e Lima (2010). A quitosana possui um perfil semicristalino devido às fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool,

amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAMI; TOKURA, 2006).

De acordo com o reportado por Ogawa et al., (1992) os picos em torno de 10° e 20° estão relacionados ao cristal (1) e ao cristal (2), respectivamente. As células unitárias dos cristais (1) e (2) apresentam os seguintes parâmetros: $a = 7,76$, $b = 10,91$, $c = 10,30 \text{ \AA}$ e $\beta = 90^\circ$ e $a = 4,4$, $b = 10,0$, $c = 10,30 \text{ \AA}$ e $\beta = 90^\circ$, respectivamente.

O difratograma do pó de carbonato de cálcio mostra somente picos característicos do carbonato de cálcio na forma de calcita e corrobora com difratograma realizado por Freire e Holanda (2007), pois os cristais de calcita exibem morfologia romboédrica, típica para esta forma cristalina, orientadas predominantemente na direção cristalográfica $\langle 104 \rangle$ como mostra o pico intenso em $2\theta = 29,4^\circ$ na Figura 11.

Figura 11 – Difratograma de raios X da amostra de resíduo da casca do ovo



Fonte: FREIRE; HOLANDA, 2007,

Já os difratogramas dos compostos quitosana/carbonato de cálcio mostram que, quanto maior a quantidade de carbonato de cálcio na membrana maior a cristalinidade do compósito, confirmado através do estreitamento e intensificação dos picos dos compósitos e ainda, com o aparecimento de um pequeno pico em 30° nos compósitos como observado na Figura 9. Esses resultados indicam que ocorreu interação física entre os constituintes da membrana, formando um compósito.

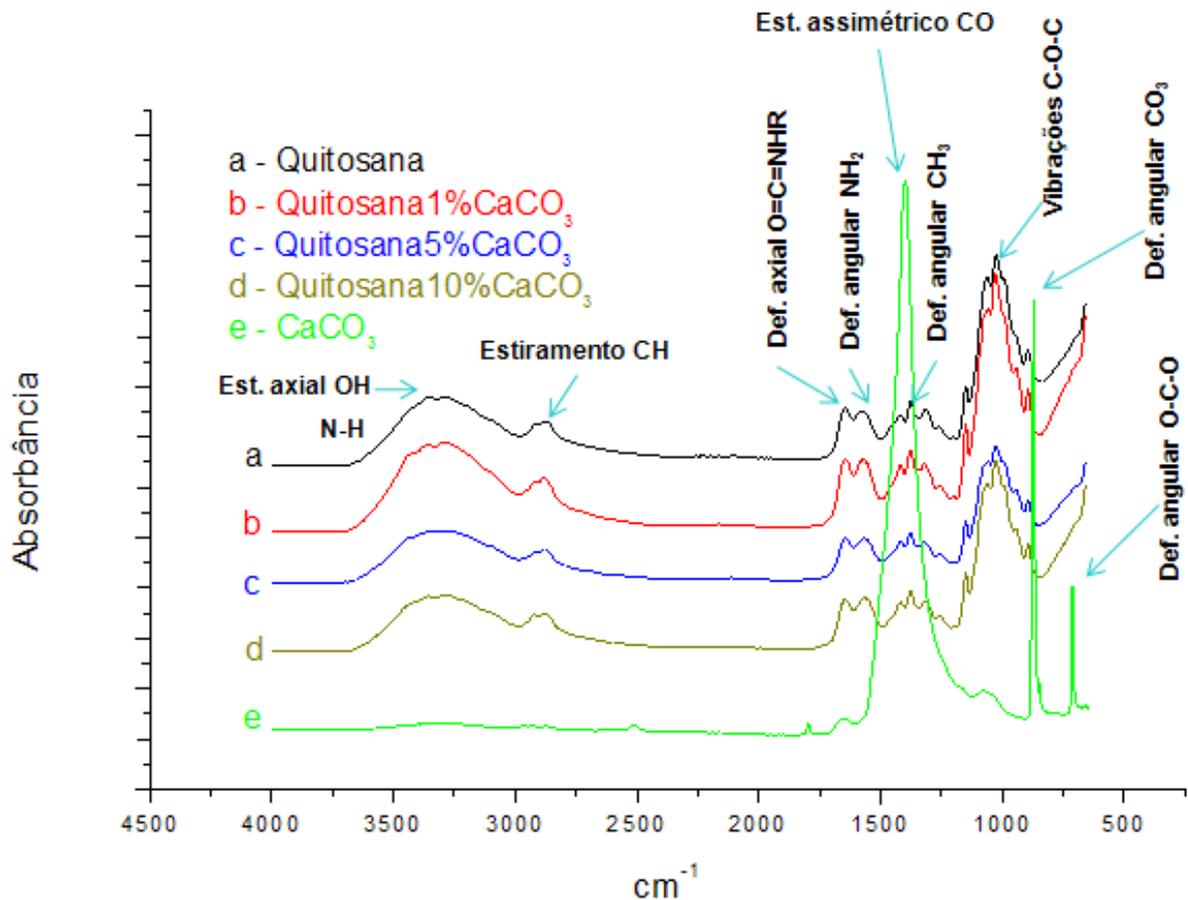
A adição de carbonato de cálcio pode influenciar em propriedade, como tempo de degradação das membranas, já que, quanto maior a cristalinidade do material, maior dificuldade terá para a água entrar nesses sítios, pois segundo Dallon, (2005), o solvente de uma determinada solução é suficiente para degradação de membranas de quitosana.

Na difração de raios X, as partículas de carbonato de cálcio obtido da casca de ovo apresentaram aspectos de cristalinidade semelhantes a do carbonato de cálcio de origem industrial, porém, para Murakami et al., (2007), as partículas obtidas da casca do ovo apresentam tamanho maior, e isso pode estar relacionado à maior estabilidade térmica.

4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de demonstrar os espectros (bandas características dos grupos funcionais) obtidos do pó de carbonato de cálcio, extraído da casca do ovo, das membranas de quitosana (CS) e dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio. De acordo com a Figura 12, pode-se afirmar que a adição de carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10% nas membranas de quitosana não alteraram os grupos funcionais característicos da quitosana, indicando que não houve modificação na superfície das mesmas. Este fato não, necessariamente, implica que não tenha ocorrido interação química entre os constituintes do compósito, pois a análise de infravermelho é um método de análise de superfície (AIMOLI, 2007) e as partículas de carbonato de cálcio estão recobertas pela matriz quitosana. No entanto, a interação química ocorrida entre os constituintes desta pesquisa foi confirmada pelo ensaio de DRX.

Figura 12 - FTIR: Membrana de quitosana (a), Membranas de quitosana com 1% (b), 5% (c) e 10% (d) de carbonato de cálcio e o pó de carbonato de cálcio (e)



A banda em torno de 3379 cm^{-1} é referente ao estiramento axial de OH, sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda em 2893 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo C-H. A banda em 1652 cm^{-1} está associada à deformação axial C=O da amida primária. A banda em 1587 cm^{-1} é referente a deformação vibracional do grupo amina protonado (NH_3^+). A banda em 1375 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial -CN de grupos amino. A banda intensa em 1050 cm^{-1} está associada ao estiramento C-O-C dos anéis piranosídicos.

O espectro característico da quitosana está de acordo com Fidèles, (2010), Ponciano, (2010) (Tabela 1) e Lima, (2010), pois apresentam todas as absorções relativas à quitosana e ainda de acordo com o espectro resultado da membrana de quitosana, pode-se afirmar que a mesma não é 100% desacetilada, pois encontra-se na região de 1658 cm^{-1} , uma banda característica da amida I (O=C-NHR).

Tabela 1. Bandas de absorção no FTIR dos pós das quitosanas com GD de 90%

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3334	Deformação axial de O-H e N-H do grupo NH_2
2928 e 2873	Deformação axial de C-H de grupos CH_2 e CH_3
1652	Deformação axial de RHN-C=O (amida)
1586	Deformação angular N-H do grupo NH_2 (amina)
1423 e 1319	Deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico
1377	Deformação angular do C-H de CH_3
1150,1062 e 1020	Deformação axial do C-O-C da ligação éter

Fonte: Ponciano, 2010.

As bandas observadas no espectro do carbonato de cálcio estão de acordo com Bessler e Rodrigues, (2008) como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Vibrações fundamentais do ânion carbonato observadas nos espectros no infravermelho de calcita (valores em cm^{-1})

Denominação das vibrações	Calcita
Deformação angular fora do plano $\gamma(\text{CO}_3)$	876
Estiramento anti-simétrico $\nu_{\text{as}}(\text{CO})$	1420
Deformação angular no plano $\delta_{\text{d}}(\text{OCO})$	712

Fonte: Bessler; Rodrigues, 2008.

4.3 Tensão Superficial por Medidas do Ângulo de Contato

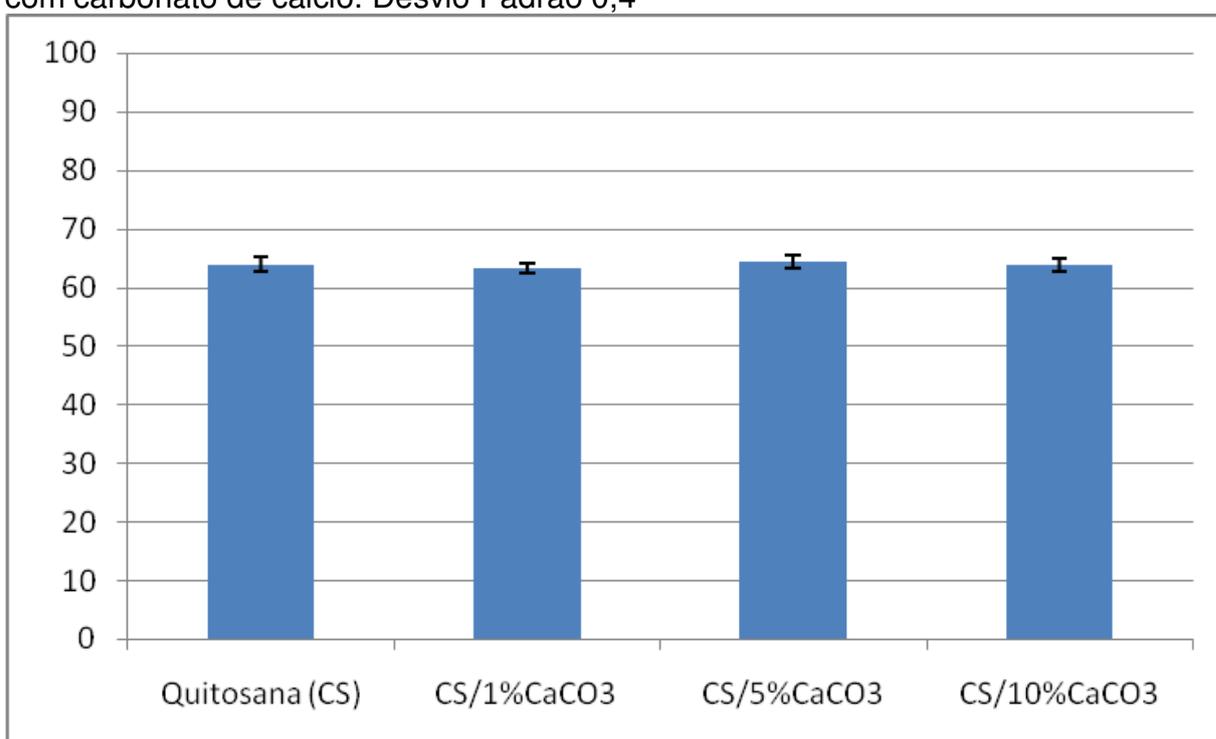
Com o desenvolvimento de novas técnicas de modificação de superfícies, ampliou-se o uso de materiais para os mais diversos setores industriais, principalmente no setor biomédico, pois é grande a contribuição que essas técnicas trazem na modificação de propriedades superficiais como molhabilidade, biocompatibilidade, adesão celular, diferenciação celular, etc. Todas essas propriedades físico-químicas estão sempre relacionadas com medidas de ângulo de contato. Desse modo, medidas de ângulo de contato têm sido amplamente usadas

para monitorar propriedades superficiais, tais como, tensão superficial crítica, componentes dispersivas e polares da energia superficial livre, interações ácido-base na superfície, cristalinidade superficial, orientação superficial dos grupos funcionais, rugosidade superficial, contaminação superficial e molhabilidade (BEAKE et. al., 1998).

Por meio de medidas de ângulo de contato (θ) entre o substrato e água pode-se avaliar a hidrofiliicidade da superfície antes e após a deposição das membranas.

Na Figura 13 observa-se os resultados das medidas de ângulo de contato para as membranas de quitosana pura e com carbonato de cálcio.

Figura 13 – Medidas de ângulo de contato para as membranas de quitosana pura e com carbonato de cálcio. Desvio Padrão 0,4



As análises de ângulo de contato foram efetuadas com o gotejamento de água deionizada na superfície da membrana, com posterior análise das medidas dos ângulos formados pela bolha de água na membrana, com software próprio do Grupo de Biomateriais.

Observa-se na Figura 13 que a presença de carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10% nas membranas de quitosana não alteraram

significativamente os valores médios (63° a $65,5^\circ$) de ângulo de contato, ou seja, não influenciou na molhabilidade da membrana, o que corrobora com o resultado observado no ensaio de FTIR.

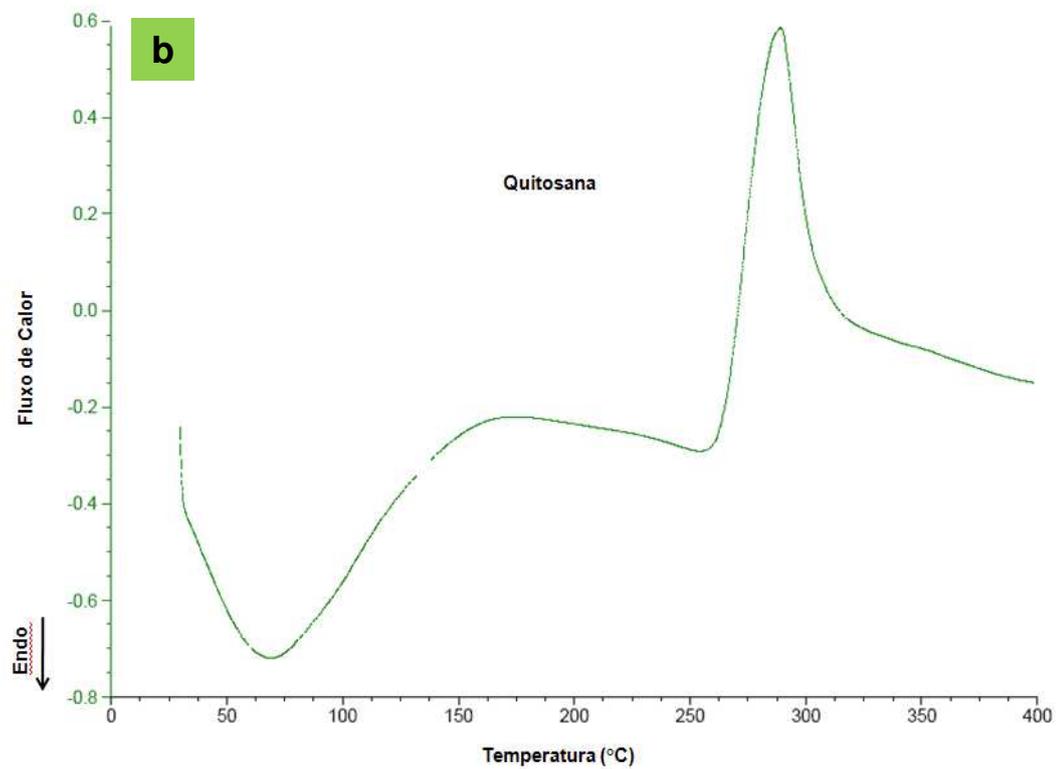
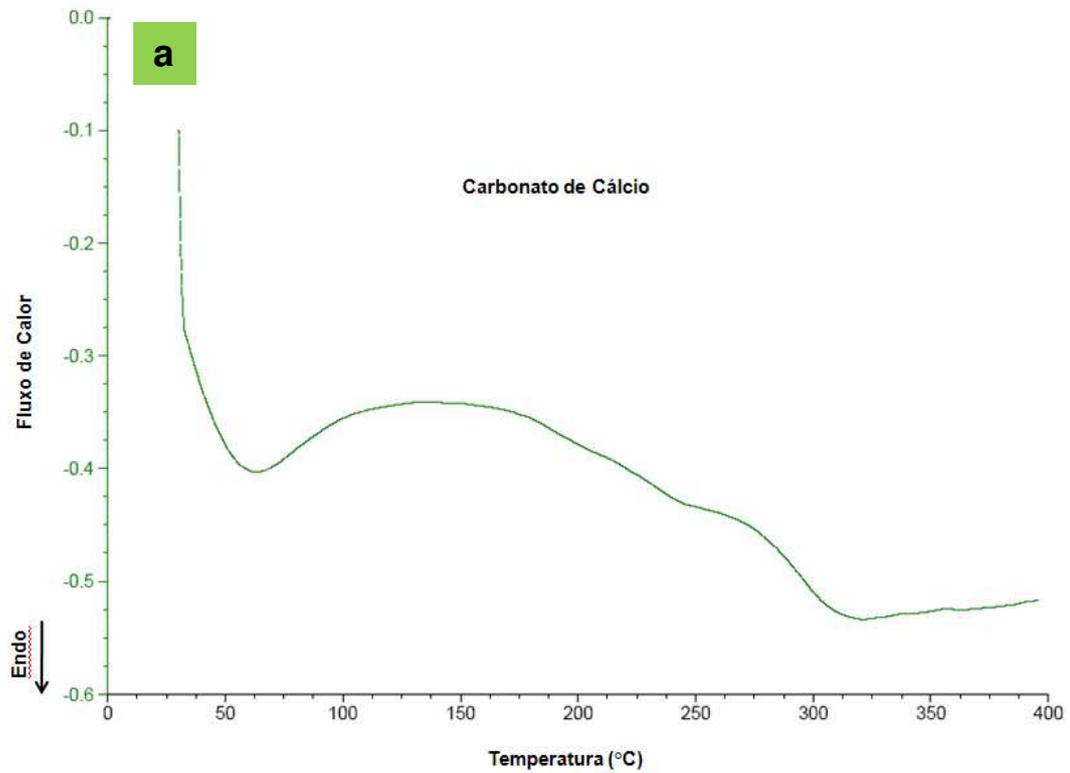
4.4 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

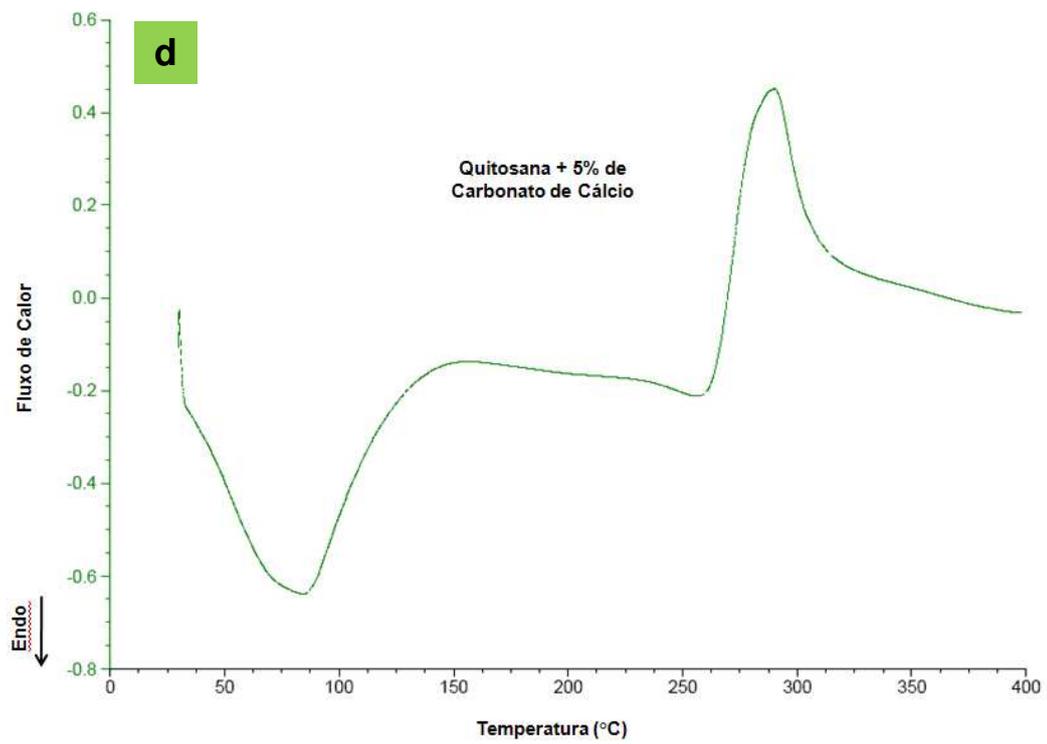
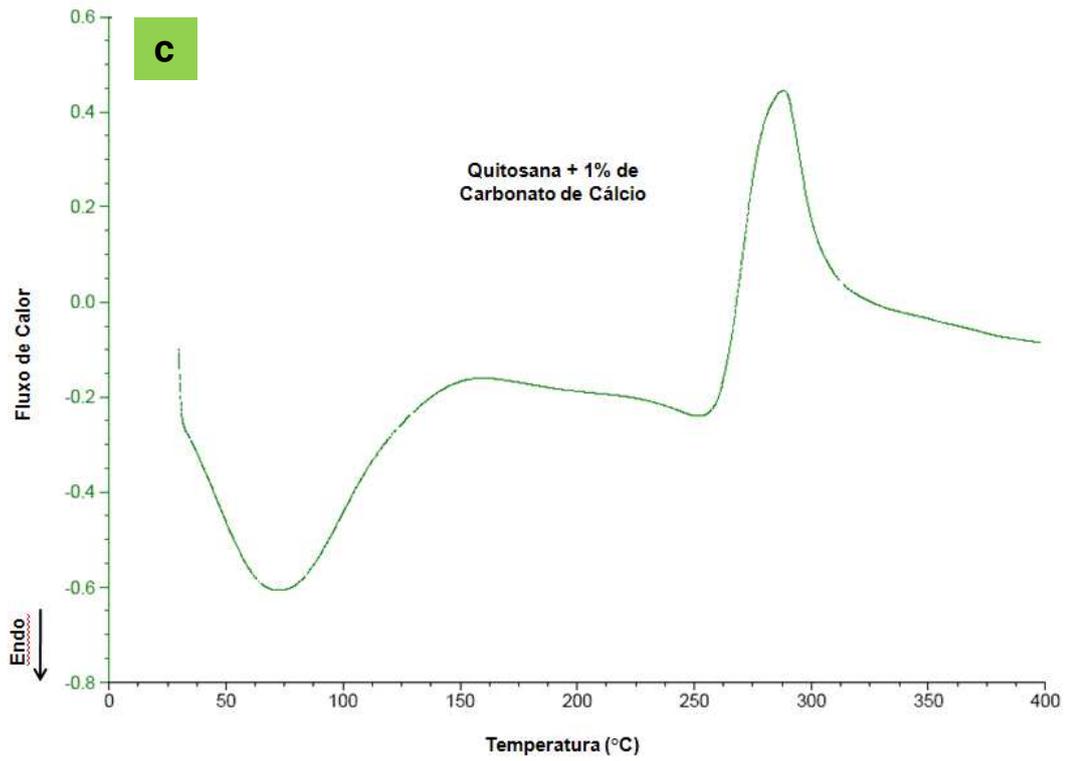
Na Figura 14 pode-se observar as curvas DSC de amostras de quitosana e de compostos quitosana/carbonato de cálcio sob atmosfera de N_2 na faixa de temperatura entre 0 e $400^\circ C$. Em todos os casos, observaram-se dois picos, o primeiro, endotérmico, correspondente ao processo de desidratação (perda de água residual), cuja área vai depender da secagem da amostra antes de realizar o ensaio e o segundo, exotérmico, corresponde ao processo de decomposição (degradação propriamente dita), que continua além do limite de temperatura do experimento.

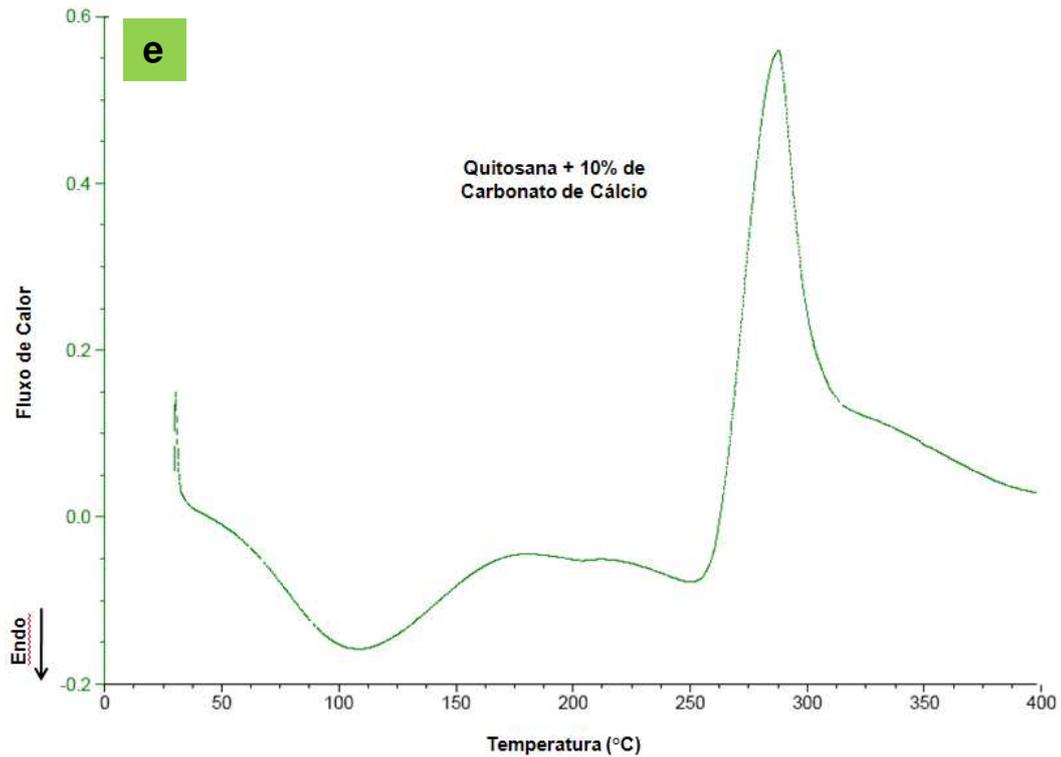
O carbonato de cálcio apresentou apenas a primeira curva, referente à perda de água, sem processo de fusão, pois a temperatura máxima utilizada neste ensaio foi de $400^\circ C$ e segundo Kibbe et al., (2000), o carbonato de cálcio decompõe-se normalmente a temperaturas superiores a $600^\circ C$,

No primeiro estágio, é possível verificar que a membrana sem carbonato de cálcio perdeu água mais facilmente do que os compósitos quitosana/carbonato de cálcio, caracterizando uma maior resistência térmica dos compósitos. Já as temperaturas de degradação de todas as membranas ficaram muito próximas, em torno de $300^\circ C$. Podemos inferir com isso que a inclusão de carbonato de cálcio nas membranas de quitosana influenciou na resistência térmica das mesmas.

Figura 14 – Análise de DSC para as membranas: (a) carbonato de cálcio; (b) quitosana; (c) quitosana + 1% de carbonato de cálcio, (d) quitosana + 5% de carbonato de cálcio e (e) quitosana + 10% de carbonato de cálcio.







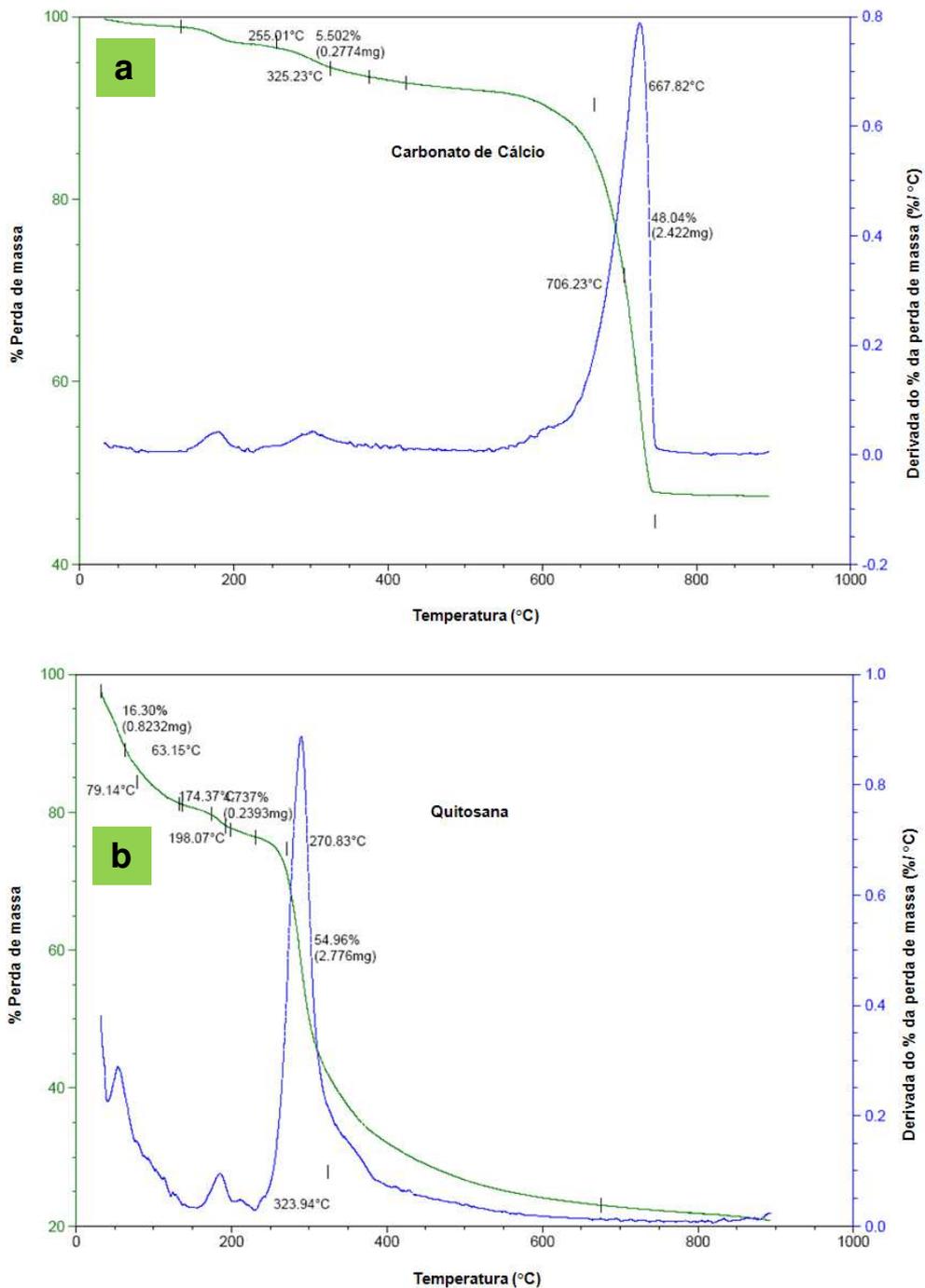
As curvas de DSC correspondentes a membrana de quitosana pura, ao carbonato de cálcio e aos compostos quitosana/carbonato de cálcio apresentam fortes indicativos que há um deslocamento do pico endotérmico indicando que quanto maior a quantidade de carbonato de cálcio maior foi a temperatura para retirar toda água livre do material, pois o deslocamento aconteceu em torno de 80 °C para membrana de quitosana sem carbonato de cálcio para aproximadamente 110°C nas membranas de quitosana com 10% de carbonato de cálcio. Esse resultado sugere que a membrana com 10% de carbonato de cálcio em sua composição apresenta maior capacidade de retenção de água e maior estabilidade térmica.

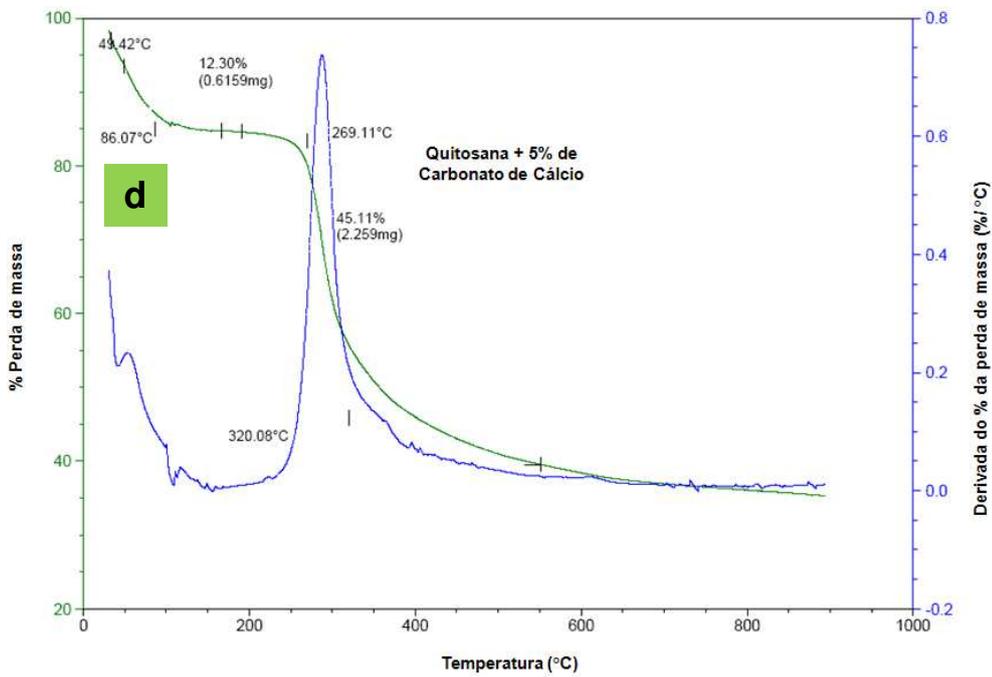
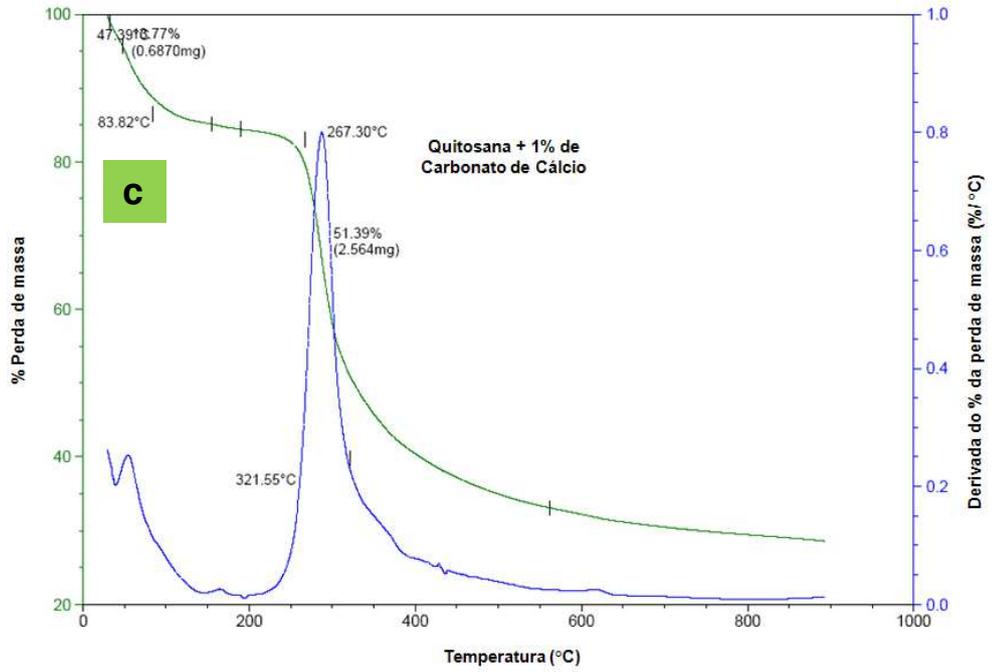
Na curva do carbonato de cálcio observa-se um pico endotérmico com início em torno de 60 °C, que pode ser um indicativo da perda de água livre. Acredita-se que esta perda esteja iniciando em menor temperatura, pelo fato das partículas estarem livres (sem quitosana), e nenhum impedimento para saída da água dos poros. O mesmo não ocorre quando as partículas estão envoltas por quitosana, como no caso dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio.

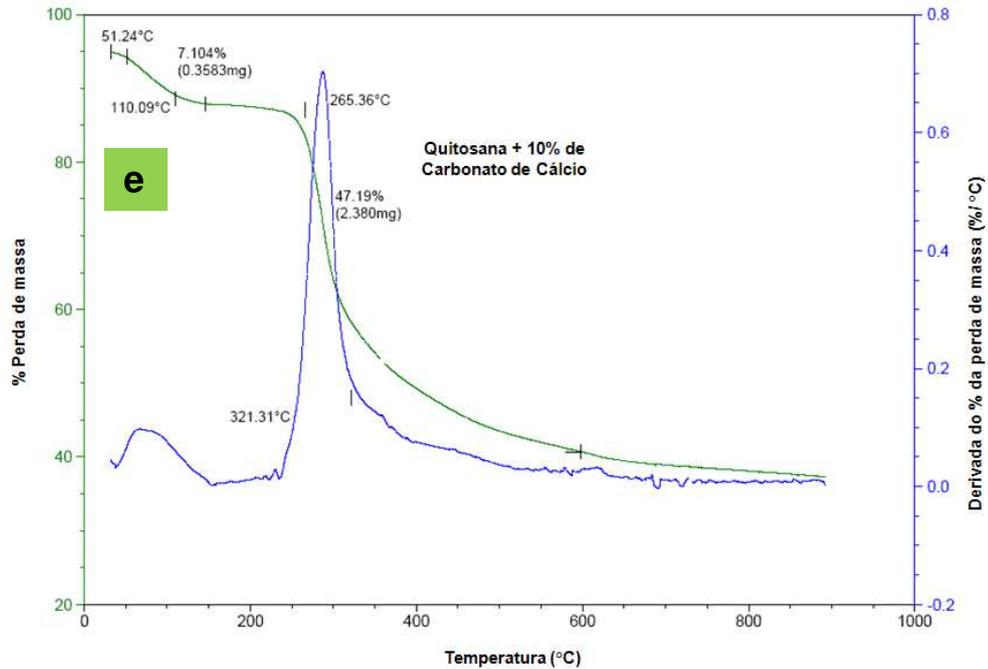
4.5 Análise Termogravimétrica (TG)

Na Figura 15 observa-se as curvas termogravimétricas dinâmicas referentes a membrana de quitosana, ao pó de carbonato de cálcio e aos compósitos quitosana/carbonato de cálcio com diferentes proporções.

Figura 15 – Análise de TG e respectiva derivada para as membranas: carbonato de cálcio (a); quitosana (b); quitosana + 1% de carbonato de cálcio (c), quitosana + 5% de carbonato de cálcio (d) e quitosana + 10% de carbonato de cálcio (e).







A decomposição térmica das preparações apresentou três etapas de perda de massa (%) e os valores de cada uma destas etapas estão melhor evidenciados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados termogravimétricos dinâmicos da membrana de quitosana, do pó de carbonato de cálcio e dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio com diferentes proporções.

Amostras	Etapas de Decomposição								
	1			2			3		
	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
Carbonato de cálcio	-	-	-	255,01	325,23	5,502	667,82	706,23	48,04
Quitosana(CS)	63,15	79,14	16,30	174,37	198,07	4,737	270,83	323,94	54,96
CS+1% CaCO₃	47,39	83,82	16,77	-	-	-	267,30	321,55	51,39
CS+5% CaCO₃	49,42	86,07	12,30	-	-	-	269,11	320,08	45,11
CS+10% CaCO₃	51,24	110,09	7,10	-	-	-	265,36	321,31	47,19

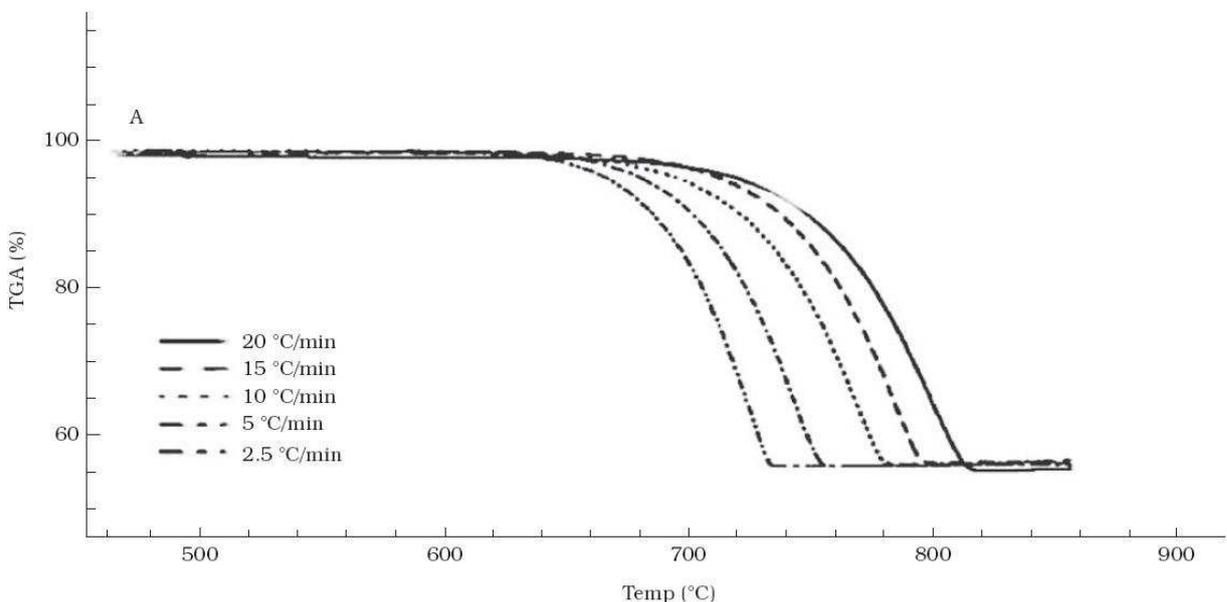
NOTA: Ti (Temperatura inicial); Tf (Temperatura final).

Segundo Pereira et al., (2009) as curvas de TG para casca ovo de galinha sugere uma decomposição em três etapas, em uma primeira etapa, ocorre a remoção de água com perda de massa em torno de 1,03% entre 25 e 226 °C. A

seguir, observa-se a decomposição da matéria orgânica, com perda de 3,77 % em um intervalo de temperatura de 226-574 °C. Em uma terceira etapa ocorre a perda de massa de 42,17% entre 574 e 769 °C, que estaria relacionada à liberação de CO₂ proveniente da decomposição do CaCO₃. A 800 °C, a amostra apresenta um resíduo de 53,03%, referente a óxido de cálcio.

Para Alcântara, (2007) e Murakami et al., (2007), o carbonato de cálcio de origem industrial se decompõe a cerca de 30°C a menos do que o obtido da casca de ovo e essa decomposição também está relacionada com a taxa de aquecimento usada neste processo como observado na Figura 16. A análise térmica do carbonato de cálcio industrial indicou sua decomposição a temperaturas entre 601°C e 770°C, ao passo que o composto extraído da casca de ovo sofreu o mesmo processo entre 636°C e 795°C. Estes resultados sugere que o carbonato de cálcio da casca do ovo seja mais resistente ao calor e, por isso, mais estável em relação ao composto industrial.

Figura 16 - Curvas de TGA do carbonato de cálcio industrial obtidos em diferentes taxas de aquecimento sob atmosfera de nitrogênio dinâmico



Fonte: MURAKAMI et al., 2007

Os dados referentes a perda de massa da quitosana ocorre em três etapas e estão de acordo com Lima (2010), onde na primeira etapa, a perda de massa ocorre em torno de 10% e é atribuída a adsorção de água, que é evaporada a temperaturas relativamente baixas (abaixo de 100°C). Isto pode significar que a água esteja

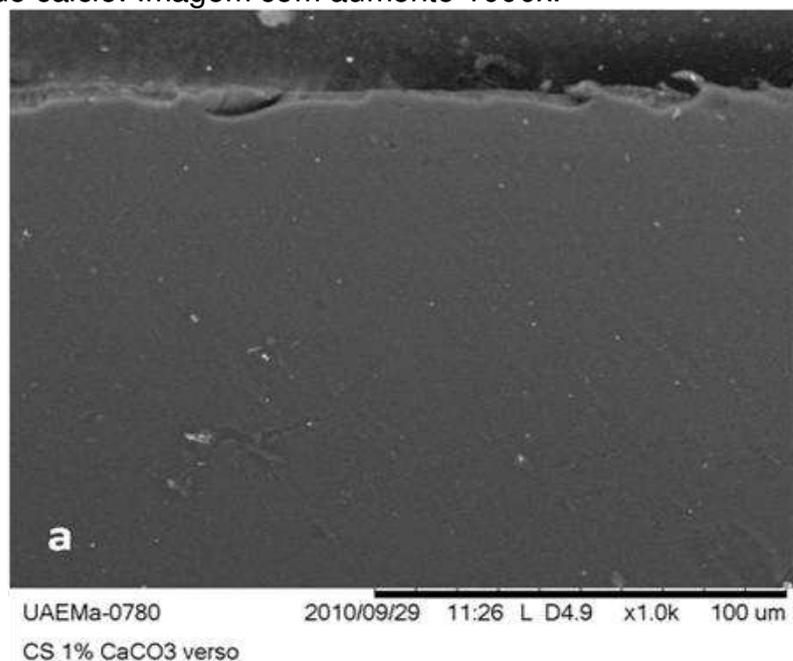
fisicamente adsorvida ou ligada fracamente a pontes de hidrogênio nas cadeias de quitosana. Já os próximos 10% de perda de massa, são atribuídos à perda de água fortemente ligada à estrutura. O principal estágio de degradação é atribuído à despolimerização da cadeia da quitosana, à decomposição do anel de piranose através da desidratação, à desaminação e finalmente às reações de rompimento do anel.

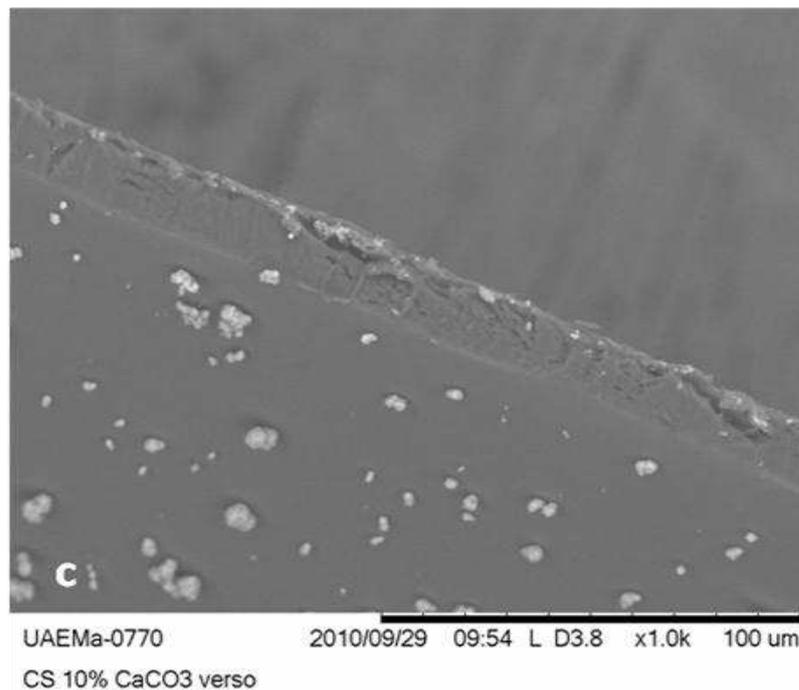
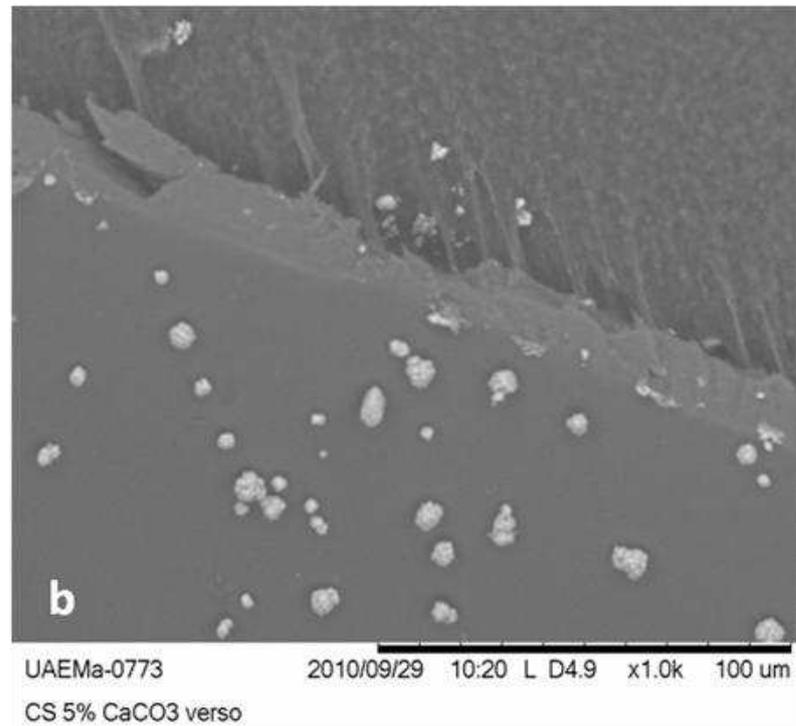
No caso dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio, observa-se que os resultados obtidos presentes na Figura 15, revelaram que, quanto maior o percentual de carbonato de cálcio no compósito, menor foi a perda de massa, principalmente no terceiro estágio, que é o estágio da despolimerização da quitosana.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 17 apresenta microfotografias do material estudado. Assim como na microscopia ótica pode-se observar a distribuição e forma das partículas de carbonato de cálcio nas membranas.

Figura 17 - Micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 5% (b) e 10% (c) de carbonato de cálcio. Imagem com aumento 1000x.





Também foi observada a presença de partículas de vários tamanhos e formas com grandes quantidades de aglomerados de carbonato de cálcio. Pela forma das partículas pode-se afirmar que tratam-se de cristais de calcita que foram confirmados pelos resultados da análise por difração de raios X, segundo os quais foram identificados picos característicos do carbonato de cálcio, na forma de calcita e corrobora com Neves (1998).

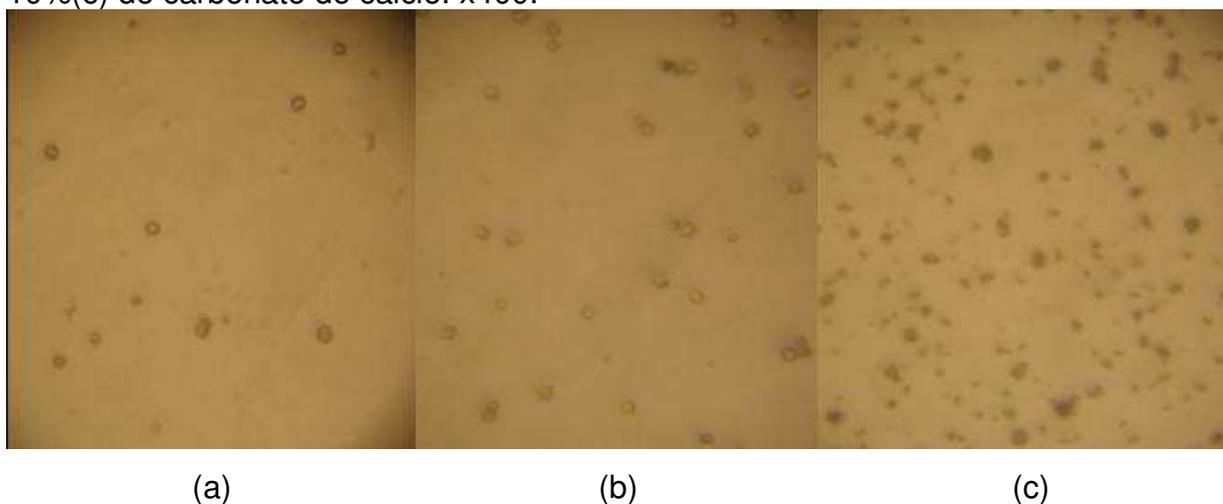
Souto (2008) afirma que a distribuição granulométrica do carbonato de cálcio precipitado (CCP) é uniforme e isto possibilita o melhoramento de algumas propriedades físicas do material, como molhabilidade, devido ao seu alto poder de absorção e conseqüentemente, estabilidade térmica.

Acredita-se que a presença de grande quantidade de aglomerados, seja o responsável pela diminuição da resistência mecânica do compósito, ocorrida no ensaio de tração neste estudo, pois segundo Garay, (2010) a partícula de carga está atuando como um concentrador de tensão na matriz do compósito e também, provavelmente, diminuindo a dissipação de energia na interface matriz/ CaCO_3 .

4.7 Microscopia Ótica (MO)

Na Figura 18 é observada a microscopia ótica das membranas de quitosana com carbonato de cálcio, assim como no MEV, são observadas partículas de carbonato de cálcio com tamanhos e forma variados. Acredita-se que isto tenha ocorrido devido a formações de aglomerados. Observa-se também que o número de partículas de carbonato de cálcio nas membranas aumenta de acordo com o aumento de carbonato de cálcio na solução de quitosana.

Figura 18 – Microscopia ótica das membranas de quitosana com 1% (a), 5% (b) e 10%(c) de carbonato de cálcio. x400.



A presença de partículas de carbonato de cálcio vai atribuir as membranas maior estabilidade térmica, como visto nos ensaios termogravimétricos. Além de

atuar como fonte de cálcio para o organismo e até mesmo potencializar o efeito cicatrizante da quitosana e acelerar o processo de epitelização.

4.8 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Este ensaio teve como objetivo observar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação das membranas, como também, verificar a influência do carbonato de cálcio neste processo. Para avaliação deste ensaio, foi considerada a perda de massa das amostras degradadas como observada na Tabela 4.

Tabela 4. Perda de massa percentual das membranas de quitosana (CS) e quitosana/carbonato de cálcio submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão. 90%GD

Ensaio	Perda de massa das membranas 1 mês de ensaio			
	PBS (pH=6,89)		Lisozima/PBS (pH=6,85)	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
CS (quitosana)	14,2	0,7	12,0	0,5
CS+1% CaCO ₃	15,1	0,7	12,2	0,5
CS+5% CaCO ₃	16,0	0,0	12,4	0,3
CS+10% CaCO ₃	15,5	0,6	13,2	0,3

Neste trabalho, a degradação das membranas ocorreu basicamente devido a presença do tampão PBS e não devido à ação da lisozima, e também por influência do pH das soluções, pois em todas as situações, houve uma maior perda de massa das membranas que ficaram por um mês em PBS, quando comparado com as membranas que ficaram em solução de PBS + Lisozima. Isto pode ter ocorrido devido ao comportamento eletrostático da quitosana e da lisozima que são diferenciados de acordo com o pH do meio.

A quitosana é policatiônica em pH abaixo de 6,5, ponto iso-eletrostático em pH 6,5 e é polianiônica pH acima desse valor. Já a lisozima é policatiônica em pH abaixo do seu ponto iso-eletrostático pH 11 e polianiônica acima desse valor de pH (ZENG; RUCKENSTEIN, 1998; COLFEN et al., 1998).

A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação *in vivo* da quitosana através da hidrólise dos resíduos acetilados, embora outras enzimas proteolíticas tenham mostrado um baixo nível de atividade de degradação sobre a molécula. A velocidade de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade e ao grau de desacetilação (PONCIANO, 2010). Esta enzima está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos, inclusive no fluido lacrimal com teores acima de 1%. Algumas propriedades biológicas tais como, atividades antimicrobianas e cicatrizantes, têm sido atribuídas aos fragmentos (oligossacarídeos) resultantes da degradação enzimática da quitosana (BERGER et al., 2004).

Para Dallan, (2005) os valores de degradação das membranas quando da exposição à enzima lisozima pelo período de um mês e quando da exposição somente ao tampão PBS, notou-se que, na maioria das composições, a degradação das membranas ocorreu basicamente devido à presença do tampão PBS e não à ação da lisozima. O mesmo não ocorreu com membranas contendo quitina. Contudo, após dois meses de exposição à lisozima, houve um aumento da degradação das membranas, sendo que, diferentemente do contato por um mês, na maioria dos ensaios foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a degradação quando da presença e da ausência da enzima na solução. Apesar deste fato, o maior valor de degradação observado foi de 14,33%, valor este pequeno considerando-se o longo tempo de exposição dos materiais à enzima.

Sabe-se que a quitosana é considerada um polímero degradável pela lisozima, porém, tal degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, já que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglucosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (SUH; MATTHEW, 2000). O que justifica os resultados obtidos por Dallan, 2005 e Ponciano, 2010.

Segundo Tomihata e Ikada (1997), quitosanas com grau de desacetilação de até 69% apresentam considerável degradação enzimática mesmo em períodos curtos de exposição à lisozima, enquanto que as de grau de desacetilação superior a 69% são dificilmente degradadas. Além disso, as características morfológicas dos materiais também interferem na degradação enzimática dos mesmos. De acordo com Mi et al., (2001), membranas porosas são mais facilmente degradadas do que as densas.

4.9 Estabilidade em Soluções Aquosas Ácida e Alcalina

Este ensaio teve como objetivo simular possíveis variações de pH, que pode ocorrer no rumem, pois estas variações são dependentes do tipo de alimento que é ingerido pelo animal.

Como observado na Tabela 5, as membranas tiveram uma maior perda de massa em meio levemente ácido do que em meio básico, o que corrobora com vários autores que falam que a quitosana é solúvel em meio ácido. No entanto, também ocorreu perda de massa em meio básico, que naturalmente pode ter ocorrido devido pela presença do solvente (água) utilizado na solução.

Tabela 5. Perda de massa percentual das membranas de quitosana (CS) e quitosana/carbonato de cálcio submetidos a ensaios de perda de massa em meio ácido e básico e respectivos desvios padrão. 90%GD

Ensaio	Perda de massa das membranas			
	7 dias de ensaio			
	ÁCIDO (pH=6,3)		BÁSICO (pH=8,2)	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
CS (quitosana)	7,85	0,6	3,85	0,6
CS+1% CaCO₃	3,60	0,7	1,95	0,4
CS+5% CaCO₃	4,25	0,5	1,25	0,2
CS+10% CaCO₃	1,15	0,1	2,4	0,6

Quando comparada, a perda de massa dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio e a membrana de quitosana pura pode-se observar diminuição da perda de massa dos compósitos, principalmente em meio levemente ácido. Isto pode, evidentemente, ter ocorrido devido a presença da carga na membrana, mas também, devido a quitosana ser polianiónica em pH acima de 6,5. No entanto, ocorreu aumento da perda de massa do compósito com 5% de carbonato de cálcio quando comparado com o compósito com 1% em meio ácido. Isto pode ter ocorrido devido a variação de espessura das membranas. Nas membranas com 10% de carbonato de cálcio em meio levemente ácido ocorreu uma significativa diminuição nesta perda, o que pode está relacionado com a possível elevação do pH para

valores superiores a 6,5, fazendo com que o comportamento fosse semelhante ao observado na perda de massa das membranas imersas em meio alcalino.

4.10 Estabilidade em Meio Ruminal

A fistulação ruminal tornou possível a análise do conteúdo do rúmen em laboratório, ao permitir a coleta do material para estudos de digestibilidade *in vitro*, bem como a análise *in vivo* de pequenas amostras através da degradabilidade *in situ*. Esta última baseia-se na inoculação de alimentos em sacos de náilon diretamente no rúmen, e apresenta grande vantagem, uma vez que o processo da degradação ocorre em condições reais no ambiente ruminal, além de permitir a análise concomitante de diferentes alimentos em um mesmo animal, ou dentro do conteúdo ruminal fresco, mantido em tempo e temperatura adequada para que não haja alterações da fauna e flora ruminal (BERCHIELLI et al., 2005).

Este ensaio foi realizado para observar o efeito do conteúdo ruminal sobre as membranas de quitosana e no compósito quitosana/carbonato de cálcio. Já que no meio ruminal estão presentes bactérias celulolíticas, que degradam celulose e que possivelmente, poderiam degradar a quitosana, já que esta tem estrutura química similar a da celulose. Porém, o que se pode ver na Tabela 6, foi ganho de massa e não perda, como se esperava.

Tabela 6. Perda de massa percentual das membranas de quitosana (CS) e quitosana/carbonato de cálcio submetidos a ensaios de perda de massa em meio ruminal e respectivos desvios padrão. 90%GD.

Ensaio	Perda de massa das membranas 7 dias de ensaio	
	Meio Ruminal	
	Média (%)	D. Padrão
CS (quitosana)	+8,43	0,5
CS+1% CaCO ₃	+7,75	0,6
CS+5% CaCO ₃	+5,70	0,9
CS+10% CaCO ₃	+6,92	1,0

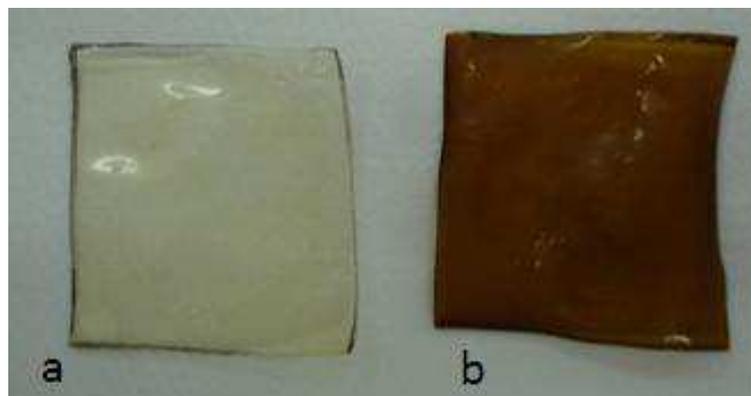
Este fato não tira a possibilidade de que não tenha ocorrido uma pequena perda de massa da quitosana, já que a degradação da quitosana pode ocorrer pelo próprio solvente utilizado na solução. No entanto, o ganho de massa ocorreu pela aderência de fibras vegetais presentes no conteúdo ruminal nas membranas como pode ser visto na Figura 19.

Além de que, como pode ser observado na Figura 20, também ocorreu alteração na cor da membrana, devido à presença de pigmentos vegetais que se ligaram a mesma.

Figura 19. Membrana de quitosana com presença de fibras vegetais aderidas a mesma após ser submetida ao ensaio de biodegradação em conteúdo ruminal. X200.



Figura 19. Membrana de quitosana umedecida com água antes e após ser submetida a biodegradação com o conteúdo ruminal.



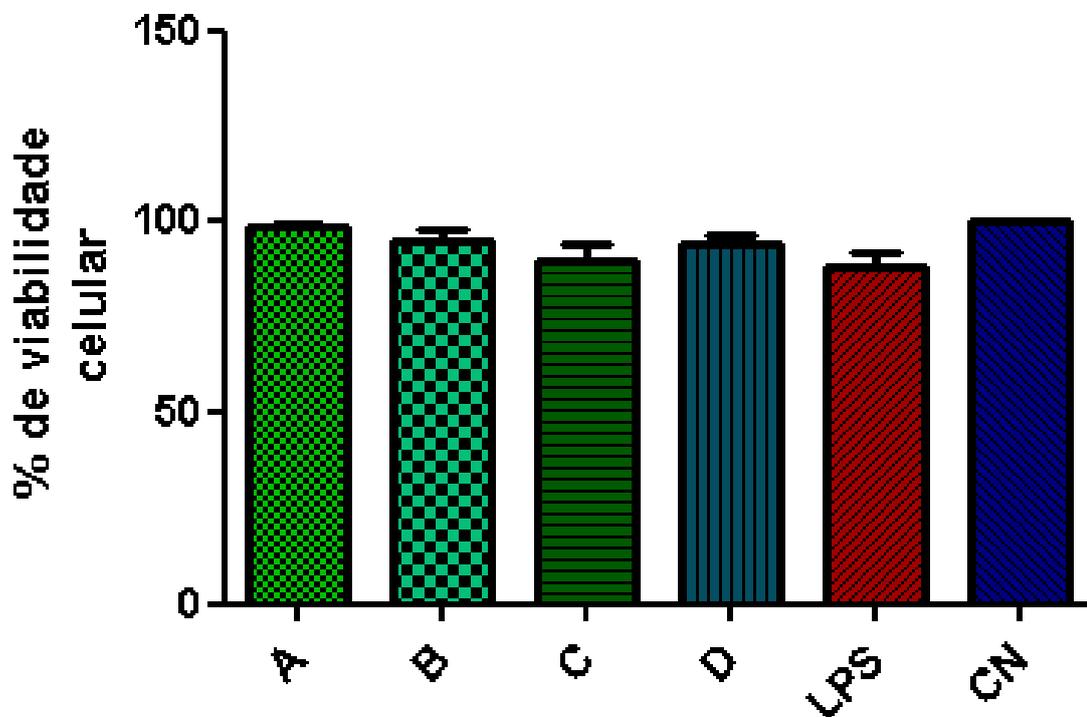
NOTA: a-sem contato com meio ruminal; b-com contato com meio ruminal

4.11 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Este teste teve o objetivo de avaliar a viabilidade das células perante o material produzido para uso em organismos vivos.

Todas as membranas testadas apresentaram viabilidade celular acima de 80 % como observado na Figura 21.

Figura 21. Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das membranas. A - quitosana 90%, B - quitosana com 1% CaCO_3 , C - quitosana com 5% CaCO_3 , D - quitosana com 10% CaCO_3 , LPS – controle positivo, CN – controle negativo



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na última coluna (CN=controle negativo). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais e 5 membranas de cada composição por animal.

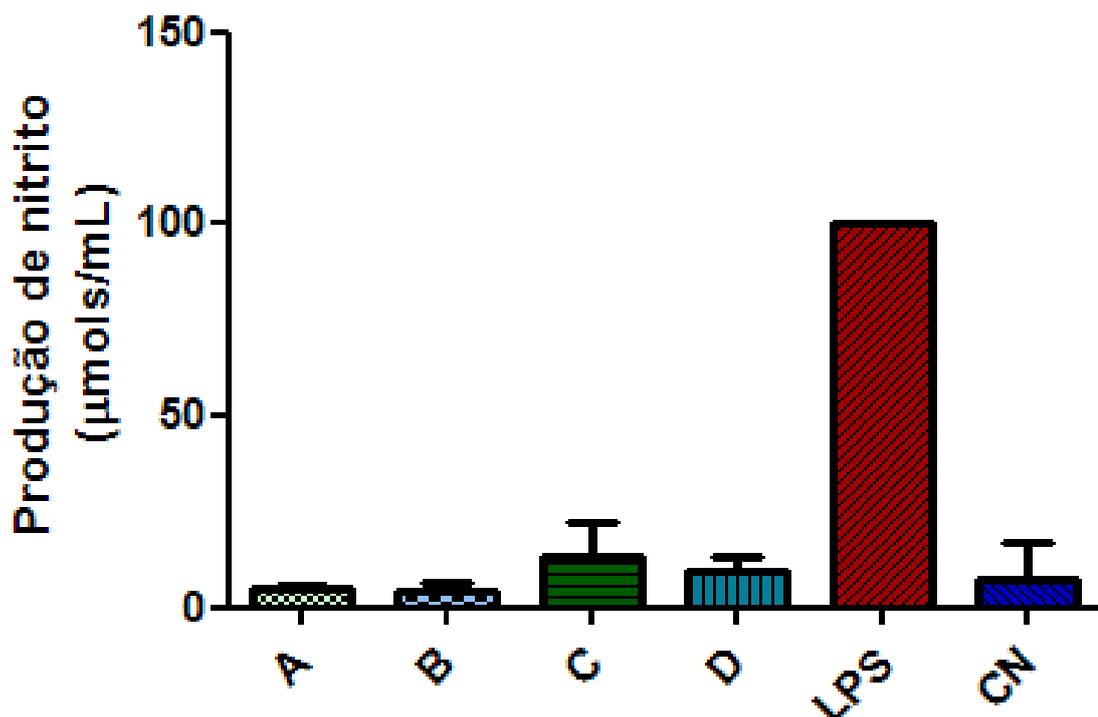
Os resultados observados na Figura 21 mostram que todas as membranas analisadas neste experimento apresentaram-se viáveis para serem utilizadas como biomaterial, pois todos os valores obtidos estão acima de 80% e foram confirmados pelo ensaio de determinação da produção de óxido nítrico e estão de acordo com

Lima, 2010. Para Bispo, 2009, o valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50%.

4.12 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição as membranas testadas situou-se de 20 $\mu\text{mols/mL}$ que são considerados valores positivos. A Figura 22 ilustra a produção de óxido nítrico.

Figura 22. Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença das membranas: A=quitosana GD 90%; B=quitosana+1% Carbonato de Cálcio; C=quitosana+5% Carbonato de Cálcio; D=quitosana+10% Carbonato de Cálcio; LPS=Controle positivo e CN=Controle negativo. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais.



Neste trabalho, como pode ser observado na Figura 21, as membranas de quitosana pura e quitosana com 1% carbonato de cálcio apresentaram valores abaixo do grupo controle, o que é indicativo de uma ação antiinflamatória (LIMA, 2010), no entanto, as membranas com 5% e 10% de carbonato de cálcio apresentaram valores acima do grupo controle, porém com nenhuma significância

como observado na Tabela 5, confirmando a não toxicidade das membranas e corroborando com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular.

Segundo Brito et al., (2009), a inclusão de membranas de quitosana no subcutâneo de ratos apresenta pouca reação inflamatória, com formação de fibrose (pseudocápsula) ao redor. As características observadas permitem considerar que esse tipo de material é do tipo não integrado e que pode ter lugar como implante a ser utilizado em reparação tecidual.

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos pelo testes de Tukey para as membranas testadas e respectivas significâncias.

Tabela 7. Análise de Variância – ANOVA Teste de Tukey para as membranas confrontadas com o padrão positivo e negativo

Comparações	Valores
A vs B	0.6309 0.2517 ns P>0.05
A vs C	-8.165 3.257 ns P>0.05
A vs D	-4.115 1.641 ns P>0.05
A vs LPS	-94.807 37.816 *** P<0.001
A vs CN	-2.333 0.9307 ns P>0.05
B vs C	-8.796 3.508 ns P>0.05
B vs D	-4.746 1.893 ns P>0.05
B vs LPS	-95.438 38.068 *** P<0.001
B vs CN	-2.964 1.182 ns P>0.05
C vs D	4.050 1.615 ns P>0.05
C vs LPS	-86.642 34.559 *** P<0.001
C vs CN	5.831 2.326 ns P>0.05
D vs LPS	-90.692 36.175 *** P<0.001
D vs CN	1.781 0.7105 ns P>0.05
LPS vs CN	92.474 36.885 *** P<0.001

Os testes de citotoxicidade mostram que a quitosana, na forma de membranas pode ser aplicada sem causar reações adversas em tecidos celulares, ou seja,

mesmo após o processo de fabricação das membranas, o material não se mostra citotóxico. Tal confirmação é importante, pois garante que o substrato pode passar pelo processo de moldagem sem que os tratamentos ácido e básico, ao qual é submetida, alterem sua biocompatibilidade.

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas, podendo ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (BOGDAN, 2001). Dentre as principais funções do NO, pode-se citar a manutenção da homeostase tecidual, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e inibição da agregação e adesão plaquetárias (KENDALL et al., 2001). O NO também atua na resposta de defesa contra fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais. Essa molécula pode causar dano ao DNA e morte celular via apoptose, induzindo fragmentação do DNA (MONCADA; ERUSALIMSKY, 2002).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. O NO derivado das células endoteliais é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido o alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico.

A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. (DUSSE et al., 2003; MONCADA; ERUSALIMSKY, 2002).

4.13 Ensaio Mecânico de Tração

Este ensaio teve por objetivo observar o efeito da inclusão de partículas de carbonato de cálcio nas propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, tensão máxima e alongamento de ruptura) nas membranas de quitosana e como pode ser observado na Tabela 8, o aumento da quantidade de carbonato de cálcio não alterou de forma significativa o módulo de elasticidade, porém ocorreu uma pequena diminuição nas propriedades referentes a tensão máxima e alongamento de ruptura.

Tabela 8. Resultados dos testes de Tração para membranas de quitosana sem e com carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio (ensaios com 5 replicatas).

Ensaio	Módulo de elasticidade E(MPa)	Tensão máxima δ(MPa)	Alongamento de ruptura %
CS	1444,69 \pm 292	64,83 \pm 7	14,10 \pm 8
CS1%CaCO ₃	1405,32 \pm 293	49,73 \pm 2	10,80 \pm 4
CS5%CaCO ₃	1115,99 \pm 435	49,42 \pm 20	9,07 \pm 3
CS10%CaCO ₃	1536,18 \pm 65	55,70 \pm 4	10,72 \pm 5

A inclusão de partícula de carga atua como um concentrador de tensão na matriz do compósito (GARAY, 2010). Contudo, essa diminuição não foi suficiente para afirmar que a inclusão de carbonato de cálcio nas proporções trabalhadas nesta pesquisa impossibilita a utilização destas membranas para o fim a que se objetiva neste estudo.

5 CONCLUSÕES

A técnica de DRX mostrou que quanto maior a quantidade de carbonato de cálcio nas membranas de quitosana maior é a cristalinidade do compósito e que o pó da casca do ovo apresenta carbonato de cálcio na forma de calcita.

A técnica de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) mostrou que o carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10% não alteraram, significativamente, os grupos funcionais característicos da quitosana.

Na microscopia ótica e na microscopia eletrônica de varredura foi observado que as partículas de carbonato de cálcio formaram aglomerados de tamanhos e formas variadas, porém bem distribuídas nas membranas.

Com o DSC pode-se concluir que o aumento da carga de carbonato de cálcio na membrana de quitosana atribuiu a mesma, maior estabilidade térmica, o que também foi, discretamente, observado pelo ensaio termogravimétrico (TG).

No ensaio de Tensão Superficial observou-se que o carbonato de cálcio nas proporções de 1%, 5% e 10% nas membranas de quitosana não influenciou significativamente os valores de ângulo de contato, ou seja, não modificou a molhabilidade da membrana.

Os ensaios de biodegradação mostraram que as membranas são biodegradáveis.

Os ensaios de MTT e NO revelaram que os compósitos são biocompatíveis e no ensaio mecânico ocorreu uma pequena diminuição nas propriedades de tração dos compósitos.

Baseado nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a membrana de quitosana com 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio extraído da casca do ovo de galinha melhora a compatibilidade do polímero sintético usado na região da cânula que fica em contato com a pele do animal.

Este trabalho abriu uma perspectiva de estudo voltado para produção de curativos compostos de quitosana/carbonato de cálcio que possa ser utilizado na Medicina Veterinária, devido ser composto de substâncias biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo, significativa absorção de exudado e também contribuir para a diminuição da poluição do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- AABD-EL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; BEREDAA, M. M. Application of Box-Behnken Design for Optimization of Poly- γ -Glutamic Acid Production by *Bacillus licheniformis* SAB-26. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 664-670, 2007.
- ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. **Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones**; Abram, A. P., ed.; Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, cap 1. 2004.
- ABREU, F. R.; CAMPANA FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.
- AGRIPINO, A. A. **Contributo para a valorização da concha de ostra como suplemento alimentar: caracterização química da concha**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Alimentar/Qualidade) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.
- AIMOLI, C. G. **Investigação da Adequação de Membranas de Quitosana Quimicamente Modificadas para Uso como Biomaterial: Estudo da Calcificação *in vitro***. 2007. 187f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química. 2007.
- AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p.144-153, 2008.
- ALCALDE, C. R.; MACHADO, R. M.; SANTOS, G. T.; PILOLLI, R.; JOBIM, C. C. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 917-921, 2001.
- ALCÂNTARA, A. S. Carbonato de cálcio de casca de ovo é mais estável que o composto industrial. **Materiais Avançados, Inovação e Tecnologia**. 2007. Disponível em: <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=carbonato-de-calcio-de-casca-de-ovo>>. Acesso em: 12 nov. 2010.
- ALTUN, G. D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 100, p. 964-971, 2007.
- AMER, A. O.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life. **Macrophage Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 56-61, 2002.
- ASSIS, B. G. O.; LEONI, M. A.; NOVAES, P. A. **Avaliação de efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópica em ratos**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 16p. 2007.

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.

ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 480-499, 2008.

ASSOIAN, R. K, KOMORIYA, A., MEYERS, C. A. MILLER, D. M. SPORN, M. B. Transforming growth factor- β in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. **Journal of Biological Chemistry**. v. 258, p. 7155, 1983.

ASTM International: D882-10. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Disponível em: < <http://www.astm.org/Standard/index.shtml>>. Acesso em: 08 dez. 2008.

ASTM International: D6400-99e1. Standard Specification for Compostable Plastics. Disponível em: < <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D6400-99E1.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

ASTM International: F1635-04 Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. Disponível em: < <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/F1635-04.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

ASTM International: F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications, 2007.

ATKINSON S.A.; WARD W.E. Clinical Nutrition: The role of nutrition in the prevention and treatment of adult osteoporosis. **Canadian Medical Association Journal**. v. 27, n. 11, p. 1511-1514. 2001.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilia Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1. p. 27-51, 2005.

BARANOSKI, S; AYELLO, E. A. **O essencial sobre o tratamento de feridas: Princípios práticos**. Loures: Lusodidacta. 2004.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BATICH, C.; LEAMY, P. Biopolymers. In: KUTZ, M. **Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design**. McGraw-Hill: New York. 2003.

BEAKE, B.D.; LING, J. S. G.; LEGGETT, G. J. Correlation of friction, adhesion, wettability and surface chemistry after argon plasma treatment of poly (ethylene terephthalate). **Journal of Materials Chemistry**, Manchester, v. 8, p. 2845-2854, 1998.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. O óxido nítrico, superóxido e peroxinitrito: o bom, o mau e o feio. **American Journal Physiology**, v. 271, p. 37. 1996.

BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S. G.; GARCIA, A. V. Aplicação de técnicas para estudos de ingestão, composição da dieta e digestibilidade. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 29-40, 2005.

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

BERSCHT, P.C., NIES, B., LIEBENDORFE, A., KREUTER, J. In vitro evaluation of biocompatibility of different wound dressing materials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 6, p. 201-205, 1995.

BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. Os polimorfos de carbonato de cálcio – uma síntese fácil de aragonita. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, 178-180, 2008.

BIAGINI, G.; MUZZERELLI, R. A. A.; GIARDINO, R. E.; CASTALDINI, C. Biological Material for wound healing. In: BRINE, I.; CHARLES, J. *Advanced in chitin and chitosan*. Elsevier Science Publishers, London, p. 16-24, 1992.

BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. 206f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BOGDAN, C. Nitric Oxide and the immune response. **Nature Immunology**. v. 2, p. 907-916, 2001.

BRITO, M. K. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. PELLIZZON, C. H.; T. NETO, C. G. Chitosan inclusions in the subcutaneous space of rats: clinic, histologic and morphometric evaluation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 1, p. 35-40, 2009.

BRODY, C. D. Slow covariations in neuronal resting potentials can lead to artefactually fast cross-correlations in their spike trains. **Journal of Neurophysiology**. v. 80, p. 3345–3351, 1998.

BROWN, E. M. The extracellular Ca^{2+} -sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis. **Annual Reviews Nutrition**, Palo Alto, v. 20, p. 507-533, 2000.

BRYANT, J. R., CADOGAN, J.; WEAVER, M. C. The new dietary reference intakes for calcium: implications for osteoporosis. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 18, n. 5, p. 406S-412S, 1999.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. LTC: Rio de Janeiro, 2002.

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. **Nitric oxide function in the skin**. Nitric Oxide. v. 10, p. 179-193, 2004.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

CASHMANN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **British Journal of Nutrition**., v. 87 (2Suppl), p. 169-177, 2002.

CHAO, A. C.; SHYU, S. S.; LIN, Y. C.; MI, F. L. Enzymatic grafting of carboxyl groups on chitosan to confer the property of a cationic dye absorbent. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 157-162, 2004.

CHATTI, S.; BORTOLUSSI, M.; BOGDAL, D.; BLAIS, J. C.; LOUPY, A. Synthesis and properties of new poly(ether-ester)s containing aliphatic diol based on isosorbide: effects of the microwave-assisted polycondensation. **European Polymer Journal**. v. 42, p. 410. 2006.

CHEN, F.; WANG, Z. C.; LIN, C. J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. **Materials Letters**, v. 57, p. 858–861, 2002.

CHIRACHANCHAI, S.; LERTWORASIRIKUL, A.; TACHABOONYAKIAT, W. Carbaryl insecticide conjugation onto chitosan via iodo-chitosan and chitosan carbonyl imidazolide precursors. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 19-27, 2001.

CLARK, R. A.; Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 306, p. 42-48, 1993.

COALHO, M. R. **Fermentação e degradabilidade ruminal de dietas com níveis de sais de cálcio de ácidos graxos em bovinos da raça nelore**. 2004, 72f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de medicina veterinária e zootecnia da Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2004.

COLFEN, H.; HARDING, S.E.; WINZOR, D.J.; VARUM, K. A study of the interaction between chitosan and lysozyme, **Abstracts** presented at Biopolymer Mixtures, UK, 1998.

CORDEIRO, M. O.; COSME, J. D.; CARVALHO, L. R. de.; MACHADO, V. C.; TEIXEIRA, W. B. M.; SANTOS. J. Z. L. V. **Análise histológica da regeneração**

óssea induzida pela casca do ovo de galinha em *Rattus norvegicus*. NOVAPAPI, 2008.

CRINI, C.; Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science.** v. 30, p. 38-70, 2005.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.** 2005, 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DAWSON-HUGHES, B.; DALLAL G. E.; KRALL, E. A. Um ensaio clínico controlado do efeito da suplementação de cálcio sobre a densidade óssea em mulheres pós-menopáusicas. **The New England Journal Medicine.** v. 323, p. 878-883, 1990.

DEUEL, T. F.; KAWAHARA, R. S. Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. **The Annual Review of Medicine.** v. 42, p. 567-584, 1991.

DOBRZÁNSKI, L. A. Significance of materials science for the future development of societies. **Journal of Materials Processing Technology.** v. 175, p. 133-145, 2006.

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. **Makromolekulare Chemie.**, v. 186, p. 1671-1677, 1985.

DUARTE, M. A. T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxi-butirato) e de suas blendas com poli(ϵ -caprolactona).** 2004, 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. 2004.

DUARTE, M. M.; MONTES DE OCA, H.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L. Primary culture gland cells from the South American rattlesnake. **Crotalus durissus terrificus Toxicon**, v. 37, p. 1673-1682, 1999.

DUFFIELD, T.; PLAIZIER, J. C.; FAIRFIELD, A.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; WILSON, J.; ARAMINI, J.; MCBRIDE, B. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 1, p. 59-66, 2004.

DUMITRIU, S.; VIDAL, P.; CHORNET, E. Hydrogels based on polysaccharides. **In: Polysaccharides in medicinal applications.** Wiley, p. 25-194. 1996.

DUMITRIU, S. Polysaccharides as Biomaterials. **Polymeric Biomaterials.** Marcel Dekker: New York, 2002.

DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D.; SOUYRIS, F. Powderd eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.** Edinburgh, v. 22, n. 3, p. 187-194. 1995.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39. n. 4, p. 343-350, 2003.

FALINI, G., S. ALBECK, S. WEINER, L. ADDADI. Control of aragonite polymorphism by mollusk shell macromolecules. **Science**. v. 271, p. 67-69, 1996.

FAMBRI, L.; MIGLIARES, C.; KESENCI, K.; PISKINE, E. Biodegradable Polymers. In: BARBUCCI, R. **Integrated Biomaterials Science**. Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry, third edition**. Marcel Dekker, New York, p. 745-770, 2000.

FERNANDES, C. E. Osteoporose. **Revista Brasileira de Medicina**. São Paulo. v. 58, n. 2, 1998.

FERREIRA, A. B. de H. **Minidicionário da língua portuguesa**. ed. 4. Nova Fronteira. Rio de Janeiro, 2000.

FIDÉLES, T. B. **Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

FIELD, C. K.; KERSTEIN M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**. p. 167, 1994.

FÍSTULA RUMINAL. Disponível em: <
<http://www.flickr.com/photos/vacueta/268621008/>>. Acesso em: 05 mai 2009.

FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M.; **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 43, 1992.

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

FREIRE, M. N.; HOLANDA, J. N. F. Reciclagem de resíduo casca de ovo em massa cerâmica para revestimento poroso, In: 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica. 2007. Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA. 2007.

FURUSAKI, E.; UENO, Y.; SAKAIRI, N.; TOKURA, S. Faciel preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -Cyclodextrin. **Carboydrate Polymers**, v. 9, p. 29-34, 1996.

GARAY, C. A. **Efeito da adição de carbonato de cálcio em Compósitos Poliméricos Moldados por RTM e RTM Light**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais). Curso de Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

GLINARDELLO, M. M. C.; SANTOS, A. R.; SANT'ANNA, C. M.; CRUZ, C. R.; CARVALHO, D. P.; SILVA, V. P. LESÃO EPITELIAL E CICATRIZAÇÃO DE NATUREZA HIPERTRÓFICA E QUELÓIDE. **Corpus et Scientia**, vol. 5, n. 2, p. 37-44, 2009.

GOMES, G. M. F.; EGITO, A. S. do; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, E. L. de.; VASCONCELOS, A. M. de. **Seleção dos animais e cuidados pré, durante e pós-cirúrgicos na fistulação ruminal em caprinos e ovinos**. Sobral: EMBRAPA CAPRINOS e OVINOS, 2009.

GRABHER, C.; CLIFFE, A.; MIURA, K.; HAYFLICK, J.; PEPPERKOK, R.; RORTH, P.; WITTBRODT, J. Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 263-271, 2007.

GREEN L. C, WAGNER D. A, GLOGOWSK J, SKIPPER P. L, WISHNOK J. S, TANNEMBAUM S. R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v. 126, p. 131-138, 1982.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts on superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Revista de Odontologia**. Univ. São Paulo, v. 6, p. 66-71, 1992.

GURR, M. **Calcium in nutrition**. Brussels: ILSI Europe, 40p. (ILSI Europe Concise Monograph Series), 1999.

GUYTON, A. C., HALL H. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 895-910, 1997.

HARDWICK, R.; HAYES, B. K.; FLYNN, C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. **Journal of Periodontology**, v. 66, n. 6, p. 495-505, 1995.

HARMON, D. L.; RICHARDS, D. J. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. **Journal of Animal Science**, n. 75, p. 2248-2255, 1997.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 151-165, 2003.

HELOU, J. B.; CORRÊA, F. A. F.; REZENDE, P. M.; PACHECO, A. A.; FEISTEL, J. C.; ORLANDO, C. F. P.; MORAES, A. M.; SILVA, O. C.; SILVA, L. A. F. **Descorna plástica em bovinos: uso tópico de um composto a base de quitosana a 5% como auxiliar na cicatrização de feridas contaminadas (RESULTADOS PRELIMINARES)**, 2008.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HENCH, L. L.; JONES, J. R. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. CRC PRESS: Boca Raton, 2005.

HIRANO, S. Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan. In: BREAK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., eds. **Chitin and Chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, p. 37-43, 1989.

HIROUYUKI, H.; KAWABE, A.; SHINKAI, M.; KOBAYASHI, T. Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 86, n. 2, p. 191-196, 1998.

HOMEY, B.; STEINHOFF, M.; RUZICKA, T.; LEUNG, D. Y. M. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 118, n. 1, p. 178-189, 2006.

HSIEH, J. **Industry partnership finds alternative uses for eggshell waste**. 2005. Disponível em: <<http://www.whistle.gatech.edu/archives/05/oct/24/eggwaste.shtml>>. Acesso em: 5 ago. 2008.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. ed . 5. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JING, S. B.; LI, L.; Ji, D.; TAKIGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 49, n. 9, p. 721-723, 1997.

JORENS. P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**. v. 4, p. 75-89, 1995.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 303-314, 1999.

KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: **Biopolymers from renewable resources**. Berlin: Springer-Verlag, p. 1-29, 1998.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Diseases**. v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KHAN, T. A., PEH, K. K., CHENG, H. S., Reporting degree of deacetylation values of chitosan : the influence of analytical methods. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. p. 205-212, 2002.

KHAN, T. A.; PEH, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. [S. l.], v. 6, n. 1, p. 20-26, 2003.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2004.

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

KIBBE, A. H.; WADE, A.; WELLER, P.J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3. ed. Londres Farmacêutica Press, 2000.

KIM S. K.; RAJAPAKSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 62, p. 357–368, 2005.

KOHN, J.; LANGER, R. Bioresorbable and Bioerodible Materials. **Biomaterials Science**, New York, Academic Press, p. 64-72, 1996.

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

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**. v. 104, p. 6017-6084, 2004.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921-1971, 2001.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic property. **Journal of Polymer Science**. v. 31, p. 485-491. 1993.

LAKSHMINARAYANAN, R.; LOH, X. J.; GAYATHRI, S.; SINDHU, S.; BANERJEE, Y.; KINI, R. M.; ALIYAVEETIL, S. Formation of transient amorphous calcium carbonate precursor in quail eggshell mineralisation: An in vitro study. **Biomacromolecules**. v. 7, p. 3202-3209, 2006.

LANGER, R.; PEPPAS, N. A. Avances in biomaterials, drug delivery and bionanotechnology. **Alche Journal**. New York, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides: Theory and Applications**. Blackie Academic & Professional. New York, 1995.

LARREGINA, A. T.; FALO Jr, L. D. **Dendritic cells in the context of skin immunity**. In *Dendritic Cells*, 2nd Ed. M. T. Lotze and A.T. Thomson, eds. Academic Press. London. p. 301-314, 2001.

LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. β -chitin from squid pens: Extraction and characterization. In: Simpósio Iberoamericano de Quitina siaq, 3., Córdoba, Espanha, 2004. **Libro de resúmenes...** [S.l.: s.n.], p. 78, 2004.

LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; RENNÓ, L. N. et al. Consumos e digestibilidades aparentes totais e parciais de carboidratos totais, fibra em detergente neutro e carboidratos não fibrosos em novilhos submetidos a três níveis de ingestão e duas metodologias de coleta de digestas abomasal e omasal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 670-678, 2005.

LEE, S. L.; WANG, Y.; MILBRANDT, J. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (EGR1). **Molecular and Cellular Biology**. p. 4566-4572, 1996.

LERNER, B. R.; LEI, D. L. M.; CHAVES, S. P.; FREIRE, R. D. O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. **Revista de Nutrição**. v. 13, n. 1, p. 57-63, 2000.

LI, J.; CHEN, J. KIRSNER, R. Pathophysiology of Acute Wound Healing. **Clinics in Dermatology**. v. 25, p. 9-18, 2007.

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

LIMA, M. S. P. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico)**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-Graduação. Natal, 2006.

LIMA, I. S.; RIBEIRO, E, S. AIROLDI, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Química Nova**. v. 29, p. 501-506, 2006.

LOPES, J. B. **Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de fator de crescimento de queratinócitos e carboximetilquitosana**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho, **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673. 2004.

LU, 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.

MAGNONI D.; CUKIER C. **Perguntas e Respostas em Nutrição Clínica**. 2ª ed – São Paulo: Roca, 2004.

MANN, S.; PERRY, C. C. Solid-State Bioinorganic Chemistry: Mechanisms and Models of Biomineralization. **Advances in Inorganic Chemistry**. v. 36, p. 137, 1991.

MARTINI, F. H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. New Jersey, A Simon and Schuster Company, 3ª ed, p. 28, 1995.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, p. 927, 1990.

MCDOWELL, L. R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3ª ed. Gainesville: University of Florida, 1999.

MELLO, K. G. P. C.; BERNUSSO, L. C.; PITOMBO, R. N. M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, p. 665-668, 2006.

MERTINS, O.; CAROSO, M. C.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. **Journal of nanoscience and nanotechnology**. v. 6, p. 2425-2431, 2006.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; WU, Y. B.; LEE, S. T.; SHYONG, J. Y. e HUANG, R. N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, p. 165-173, 2001.

MIDDLETON J. C.; TIPTON A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2335-2346, 2000.

MIGUEL M. C. V., LOPES M. A. F., RIBEIRO FILHO J. D.; BOGES M. C. B. Rumenostomia com a implantação de uma cânula flexível numa novilha com disfagia. In: do Congresso Paulista de Medicina Veterinária. Santos. **Anais...** 2004. 1 CD-ROM.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; JOURD'HEUIL, D.; GRISHAM, M. B.; FUKUTO, J. M.; FEELISCH, M.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide, in: L. J. Ignarro (Ed.), **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. Academic Press, San Diego, p. 41-55, 2000.

MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 3, n. 3, p. 214-20, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, W. A. Leucocyte – endothelial – cell interactions in leucocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**. v. 24, n. 6, p. 326-333, 2003.

MURAKAMI, F. S.; RODRIGUES, P. O.; CAMPOS, C. M. T. de; SILVA, M. A. S. Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 3, p. 658-662, 2007.

MURAKAMI, F. S. **Estudo termoanalítico entre carbonato de cálcio industrial e carbonato de cálcio obtido da casca do ovo**. In: V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. Poços de Caldas, 2006.

MUZZARELLI, R. A. A.; BELMONTE, M. M.; MUZZARELLI, B.; SIMONELLI, L. **Materiali da medicazione a base di chitosani**. In: CONVEGNO-SCUOLA ASSOCIAZIONE ITALIANA DI SCIENZA E TECNOLOGIA DELLE MACROMOLECOLE "POLIMERI IN MEDICINA". Gargnano, p. 307-336, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. **Depolymerization of methyl pyrrolidinone chitosan by lysozyme**. **Carbohydrate Polymers**. v. 19, p. 29-34, 1992.

MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L.; GABELLINI, E. L. A. **Rumen fistulation and cannulation technique in cattle and sheep**. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 2059-2064, 2009.

NETTLES, D. L. **Evaluation of Chitosan as a Cell Scaffolding Material for Cartilage Tissue Engineering**. 2001. 66f. MSc Thesis, Mississippi State University, USA. 2001.

NEVES, M. A., **Alternativas para valorização da casca de ovo como complemento alimentar e em implantes ósseos**. 1998. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 1998.

NICHOLSON, J. W. **The Chemistry of Medical and Dental Materials**. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2002.

NOVELLI, E. G.; SILVA, G.; KASPAR, N. H. In: 49º Congresso Brasileiro de Cerâmica. Águas de S. Pedro, SP, 2005, **Anais...** Águas de S. Pedro, SP, p. 1-5, 2005.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. **Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes**. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 56, p. 858-62, 1992.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKO, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. **Effects of chitin and chitosan on blood coagulation**. **Carbohydrate Polymers**. v. 53, p. 337-42, 2003.

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. **Valorização de Resíduos Sólidos: Casca de Ovos como Matéria-Prima para a Obtenção de Novos Produtos**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production. Key Elements for a Sustainable World: Energy, Water and Climate Change. São Paulo, Brazil, p. 1-11, 2009.

OLIVEIRA, M. V. M.; VARGAS JUNIOR, F. M.; SANCHEZ, L. M. B. et al. **Degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal de alimentos por intermédio da**

técnica *in situ* associada à do saco de náilon móvel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 2023-2031, 2003.

OLIVEIRA, J. R.; BERTECHINI, A. G.; FASSINI, E. J.; ALBINO, L. F. T.; FREITAS, R. T. F.; FIALHO, E. T. Níveis de cálcio para poedeiras leves e semipesadas no segundo ciclo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1060-1067, 2002.

OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In: SKJAK-BRACK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. A. (Eds.). Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. **Elsevier Applied Sciences**. New York 813p, 1989.

ORÉFICE, R.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J. S.; GIRALDO, O. H.; GIRALDO G. I.; CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lípases immobilization: characterization aspects. Article in press: **Carbohydrate Polymers**, 2009.

ORTOLANI, E. L. **A ruminação dos bovinos vista a olho nu**. Disponível em: <http://www.canaltortuga.com.br/noticiario/pag_noticia2.asp?categoria=1&edica=426>. Acesso em: 04 de set. 2007.

PANCHENCE, J. M.; KOHN, J. Biodegradable polymer. In: Lanza, R. P., Langer, R., Vacanti, J. (Ed.). **Principle of tissue engineering**. San Diego: Academic Press, p. 263-277, 2000.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11-16, 2004.

PEREIRA, J. G.; OKUMURA, F.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Termogravimetria: Um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em Cascas de ovos. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1661-1666, 2009.

PEREIRA, M. N. **Responses of lactating cows to dietary fiber from alfafa or cereal byproducts**. 1997. 186f. Thesis (Doctor in Animal Nutrition) – University of Wiscosin, Madison, 1997.

PHIPPS, W.; SANDS, J.; MAREK, J. **Enfermagem médico-cirúrgica**. 6^a ed. Loures: Lusociência. 2003.

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

QASBA, P. K.; KUMAR, S. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p. 255–306, 1997.

RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M., Determination of the Degree of *N*-Deacetylation in Chitin and Chitosan as well as Their Monomer Sugar Ratios by Near Infrared Spectroscopy. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**. v. 31, p. 749-753, 1993.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Academic press, San Diego, 1996.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J.; BLOCK, L. H. Spray-dried chitosans Part I: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 252, p. 41-51, 2003.

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

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. Mc Millan Press, London, 1992.

ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation, In: WILLIAN, P. **Fundamental immunology**. 4^a ed., Philadelphia: Lippincott. p. 1051-1066, 1999.

SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 81-88, 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Anatomia e fisiologia. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001, cap. 1, p.5.

SAN ROMÁN J.; REIS R. **Biodegradable systems in medica functions: desing, processing, testing and applications**. Editora CRC: Boca Ratón, 2004.

SANDFORD, P. A. **Chitin and Chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. Elsevier Applied Science: London, 1989.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SANTOS JÚNIOR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. São Paulo – Campinas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 308-317, 2007.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

SANTRA, A.; KARIM, S. A. Rumens cannulation in sheep and goats: fabrication of cannula and surgical procedure for its implantation. **Indian Journal of Animal Sciences**, Nova Delhi, v. 72, n. 11, p. 978-980, 2002.

SARIKAYA, M.; TAMERLER, C.; JEN, A. K. Y.; SHULTEN, K. BANEYX, F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. **Nature Materials**. v. 2, n. 9, p. 577-585, 2003.

SCHELLINI, S. A.; HOYAMA, E.; PADOVANI, C. R.; FERREIRA, V. L. R.; ROSSA, R. Complicações com o uso de esferas não integráveis e integráveis na reconstrução da cavidade anoftálmica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 62, p. 382, 1999.

SCHILLING, A. F.; LINHART, W.; FILKE, S.; GEBAUER, M.; SCHINKE, T.; RUEGER, J. M.; AMLING, M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 3963-3972, 2004.

SENEL, S.; MCCLURE, J.; S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SILVA JÚNIOR, P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli (metacrilato de metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 109-115, 2001.

SOUTO, E. C. S. **Estudo de condições operacionais para obtenção de carbonato de cálcio precipitado**. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2008.

STEDILE, R.; BECK, C. A. C.; NÓBREGA, F. S.; DA SILVA FILHO, A. P. F.; FERREIRA, M. P.; ALIEVI, M. M.; SCHIOCHET, F. BORDIN, A. I.; GONZALEZ, P. C.; LAMPERT, M. Rumensostomia com colocação de cânula flexível em ovinos. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 36, n. 1, p. 35-38, 2008.

SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**. v. 21, p. 2589-2598, 2000.

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**. v. 211, p. 609-618, 2006.

TAKEMURA, R. WERB, Z. Modulation of apoprotein E secretion in response to receptor-mediated endocytosis in resident and inflammatory macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 159, p. 167, 1984.

TATAKIS, D. N.; PROMSUDTHI, A.; WIKESJÖ, U. M. E. Devices for periodontal regeneration. **Periodontol 2000**, v. 19, p. 59-73, 1999.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. **Biologia da ferida e cicatrização**. In: SIMPÓSIO FUNDAMENTOS EM CLÍNICA CIRÚRGICA, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-64. 2008.

TERUI, T.; OZAWA, M.; TAGAMI, H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Experimental Dermatology**. v. 9, n. 1, p. 1-10, 2000.

TIZARD, I. R. **Introdução a Imunologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567-575, 1997.

TORRES, M. A. **Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Natural e Modificada Quimicamente e o seu uso na Adsorção das Proteínas BSA e Lisozima**. 2006. 146f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2006.

TORRES, J. D.; FARIA, E. F.; PRADO, A. G. S.; Thermodynamic studies of the interaction at the solid/liquid interface between metal ions and cellulose modified with ethylenediamine. **Journal of Hazardous Materials**. v. 129, p. 239, 2006.

UENO, H.; TAKASHI, M.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 52, p. 105-115, 2001.

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

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 58, p. 279-289, 2004.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed.: Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

VERT, M.; LI, M. S.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. **Journal of Materials Science**. v. 3, 1992. 432 p.

VESELY, I. The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability. **Cardiovascular Pathology**. v. 12, p. 277-286, 2003.

VIEIRA, R. S. **Remoção e Recuperação de Mercúrio utilizando quitosana natural e reticulada**. 2004. 150f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

VISSER, S. A.; HERGENROTHER, W.; COOPER, S. Polymers. In: **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**, Academic Press, p. 50-60. 1996.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**, 3. ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, 2000.

WEAVER, C. M.; PLawecki, K. L. Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 54, (suppl), p. 1238S-1241S, 1994.

WEINER, S.; ADDADI, L. Design strategies in mineralized biological materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, p. 689-702, 1997.

WEINSIER, R. L.; KRUMDIECK, C. L. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 72, n. 3, p. 681-689, 2000.

WILLIAMS, D. F. **Dictionary of Biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, p. 42, 1999.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de Nutrição e Dietoterapia**. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

YUEHUEI, H.; FRIDMAN, R. J.; POWERS, D. L.; DRAUGHN, R. A.; LATOUR, R. A. Jr. Fixation of osteotomies using bioabsorbable screws in the canine femur. **Clinical Orthopaedics & Related Research**. v. 355, p. 300-311, 1998.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Recuperação de tintura direta e corante ácido por adsorção em quitosana fibra de equilíbrios. **Sci Tecnologia**, v.23, p.1667-1676. 1998.

GLOSSÁRIO

ABOMASO: (também chamado de coagulador e coalheira) é a quarta câmara do estômago dos ruminantes, onde ocorre a digestão. É um saco alongado, com estrutura e funções comparáveis às do estômago de não-ruminantes.

ALÇAS DE HENLE: é uma parte do rim, é o segmento do néfron que vem após o túbulo contorcido proximal.

AMENORRÉIA: ausência de regras, fora da gravidez, e numa mulher em idade de ter menstruações.

ANABOLISMO: é a parte do metabolismo que se refere à síntese de substâncias em um organismo, ou seja, a partir de moléculas mais simples, são criadas moléculas mais complexas

ANAERÓBIO: organismos ou certos tecidos que vivem na ausência do ar, do oxigênio, portanto, extraem a energia necessária à sua vida de substâncias orgânicas que eles mesmos decompõem.

BRADICININA: é uma hormona polipéptidea do grupo das Cininas com actividade fisiológica natural no ser humano.

CATABOLISMO: é a parte do metabolismo que se refere à assimilação ou processamento da matéria orgânica adquirida pelos seres vivos para fins de obtenção de energia.

CÂNULAS: tubo aberto nas extremidades, de forma variável, usado em cirurgia, e por vezes adaptado a instrumentos como seringas, irrigadores, etc.

CERATINÓCITOS: são células diferenciadas do tecido epitelial (pele) e invaginações da epiderme para a derme (como os cabelos e unhas) responsáveis pela síntese da queratina.

CITOCINAS: são proteínas que modulam a função de outras células ou da própria célula que as geraram. São produzidas por diversas células, mas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, sendo importantes para o controle da resposta imune.

COLÁGENO: é uma classe bastante abundante de proteínas formadas por aminoácidos no organismo humano. Ele tem a função de manter as células unidas e é o principal componente protéico de órgãos como a pele, cartilagens e ossos.

DESBRIDAR: ato de remover da ferida o tecido desvitalizado e/ou material estranho ao organismo.

DIAPEDESE: é caracterizada pela passagem dos leucócitos através da parede dos capilares sanguíneos, vénulas e até arteríolas, penetrando através das junções entre as células endoteliais.

DIGESTÃO: é o conjunto das transformações, mecânicas e químicas, que os alimentos orgânicos sofrem ao longo de um sistema digestivo, para se converterem em compostos menores hidrossolúveis e absorvíveis.

DUODENO: É a primeira parte do intestino delgado. Localizado entre o estômago e o íleo. Depois que os alimentos se combinam com o ácido estomacal, eles descem para o duodeno, onde se misturam com a bile da vesícula biliar, e com os sucos digestivos do pâncreas.

EOSINA: é um conjunto de compostos químicos que são corantes utilizados para análises histológicas em microscópio óptico.

ETIOLOGIA: é um conjunto de critérios necessários para provar, de maneira conclusiva, que um certo micróbio é o causador de uma doença específica.

FAGOCITAR: ato de Ingerir ou englobar partículas ou células.

FIBROBLASTOS: são células presentes na segunda camada da pele, a derme, e são responsáveis pela produção de colágeno e da substância que envolve estas fibras (matriz extracelular), fundamentais para qualidade da pele. Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular.

FÍSTULA: canal ou tubo que conecta um órgão ou tubo natural a uma outra superfície, quer externa ou interna.

HEMATOXILINA: É um produto natural que ao ser oxidado resulta numa substância de cor azul-púrpura escura denominada hemateína.

HISTAMINA: é amina biogênica envolvida em processos bioquímicos de respostas imunológicas, bem assim como a desempenhar função reguladora fisiológica intestinal, além de atuar como neurotransmissor. Encontrada também no organismo humano, é produto da descarboxilação da histidina, aminoácido presente nos mastócitos e basófilos.

INTERLEUCINA-1: é uma interleucina cuja função principal é aumentar a produção de defensinas pelo epitélio. É um fator solúvel produzido por monócitos, macrófagos, que ativa os linfócitos t e potencializa suas respostas aos antígenos.

LEUCÓCITOS: também conhecidos por glóbulos brancos, são células produzidas na medula óssea e presentes no sangue, linfa, órgãos linfóides e vários tecidos conjuntivos.

LIPOSSOMA: são pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios que se organizam espontaneamente em meio aquoso. Tais partículas são consideradas uma excelente forma de sistema de liberação controlada de medicamentos ou substâncias biologicamente ativas devido a sua

flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos.

MACRÓFAGOS: são células que derivam da migração dos monócitos sangüíneos para o tecido. São células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomos, que fagocitam elementos estranhos ao corpo.

MIÍASE: é uma doença produzida pela infestação de larvas de moscas em pele ou outros tecidos de animais.

NECROSE: Morte de um tecido ou de um órgão, quando ainda fazendo parte do organismo vivo.

NITRITO: são composições químicas liberadas por alguns tipos de bactérias, sal ou éster do ácido nitroso (HNO_2) ou ânion dele derivado.

OSTEOINDUÇÃO: é a propriedade das substâncias de induzir células indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e estas em osteoblastos com posterior formação de novo tecido ósseo.

OSTEOPENIA: diminuição da densidade dos ossos, por redução do número de osteoblastos.

QUIMIOTAXIA: nome dado ao processo de locomoção de células em direção a um gradiente químico. A quimiotaxia pode ser negativa (fazendo as células irem em sentido oposto de uma substância) ou positiva (fazendo estas células irem em sentido a favor de uma certa substância).

RUMEN: é o primeiro compartimento do estômago dos ruminantes. Em conjunto com o retículo forma uma vasta câmara de fermentação que alberga um complexo ecossistema microbiano capaz de degradar paredes celulares vegetais, constituídas principalmente por celulose e hemicelulose.

RUMENOSTOMIA: é um procedimento cirúrgico no flanco do ruminante que estabelece um orifício artificial no rúmen.

RUMINANTES: subordem de mamíferos caracterizados pela presença de um estômago complexo, com três ou quatro câmaras, adaptado à ruminação.

SEROTONINA: é um neurotransmissor, isto é, uma molécula envolvida na comunicação entre neurônios.

TÚBULOS DISTAIS:, ao penetrar na região do córtex renal, a parte espessa da alça de Henle.

TÚBULOS PROXIMAIS: é uma parte do rim e trata-se de uma estrutura tubular retorcida.

UMECTANTE: Substância que promove a retenção de umidade, ou seja, hidrofílicas.

