

Esferas de quitosana/*D. ambrosioides* (mastruz) para aplicação como biomaterial

Chitosan/D. ambrosioides (mastruz) spheres to be applied as a biomaterial

Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros

Doutoranda em Ciência e Engenharia de Materiais/DEMa/UFCCG

Professora do Curso de Odontologia/UACB/UFCCG

Rossemberg Cardoso Barbosa

Doutor Pesquisador do Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPd/UFCCG

Rosana Araújo Rosendo

Doutoranda em Ciência e Engenharia de Materiais/DEMa/UFCCG

Professora do Curso de Odontologia/UACB/UFCCG

Dayanna Kelly Marques de Oliveira

Graduanda em Engenharia de Materiais/DEMa/UFCCG

Fernando Antônio Cavalcanti Viana

Engenheiro Agrônomo da UFPB

Coordenador do Horto de Plantas Medicinais IPeFarM/UFPB

Marcus Vinícius Lia Fook

Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais/DEMa/UFCCG

Coordenador do Laboratório CERTBIO/DEMa/UFCCG, Bolsista de Produtividade do CNPq

• Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Objetivo: Desenvolver esferas de quitosana/*D. ambrosioides* (mastruz) para aplicação como biomaterial. **Material e Métodos:** Para obtenção das esferas de quitosana e quitosana com extrato alcoólico bruto do mastruz (EAB) utilizou-se a técnica de Geleificação Ionotrópica. Foram formados quatro grupos: Q0- quitosana; Q5; Q10 e Q20, quitosana com 5%, 10% e 20% de EAB, respectivamente. Foram caracterizadas por Microscopia Óptica (MO); Citotoxicidade e Biodegradação. **Resultados:** NoMO, observou-se esferas bem delimitadas e mais escuras, à medida que o percentual do EAB aumentou. Todos os grupos foram não citotóxicos. Na presença de lisozima, observou-se perda de massa, já na solução tampão fosfato salina (PBS) constatou-se ganho de massa. **Conclusão:** Conclui-se que as esferas apresentaram potencial para utilização como biomaterial.

Palavras-chave: quitosana; plantas medicinais; regeneração óssea.

ABSTRACT

Objective: This work aimed to develop chitosan/*D. ambrosioides* (mastruz) spheres to be applied as a biomaterial. **Material and Methods:** To obtain the chitosan spheres and the chitosan with crude ethanolic extract of mastruz (CEE) the Ionotropic gelation technique was used. Four groups were formed: Q0- Chitosan; Q5; Q10 and Q20, Chitosan with 5%, 10% and 20% of CEE, respectively. **Were characterized by Optic Microscopy (OM); Cytotoxicity and Biodegradation. Results:** In OM, well delimited and darker spheres were observed, as the CEE percentage increased. All groups were noncytotoxic. In the presence of lysozyme, mass loss was observed, as for in solution Phosphate Buffered Saline (PBS) the mass gain was found. **Conclusion:** It can be concluded that the spheres presented potential for use as a biomaterial.

Keywords: chitosan; medicinal plants; bone regeneration.

Introdução

Algumas técnicas vêm sendo empregadas na tentativa de recuperação de elementos dentários perdidos, dentre elas, o emprego de implantes dentários osseointegráveis. Entretanto, em alguns casos, torna-se indispensável à realização de cirurgias de enxertos para repor o tecido ósseo perdido ou para prevenir que essas perdas ocorram. Há situações clínicas em que se faz necessário o preenchimento do alvéolo dentário imediatamente após a exodontia e previamente à instalação do implante osseointegrável, tornando possível sua osseointegração.¹

Na perda ou comprometimento do tecido ósseo, vários biomateriais naturais ou sintéticos, como polímeros, cerâmicas e metais ou seus compósitos têm sido investigados e utilizados de diferentes maneiras, como uma alternativa aos enxertos ósseos.² Dentre esses materiais; destaca-se a quitosana, um biopolímero que apresenta grande potencial osteogênico, acelerando e maximizando o reparo ósseo, atuando como um biomaterial osteoindutor.³

O grande potencial da biodiversidade brasileira estimula o desenvolvimento de produtos inovadores. Neste sentido, instrumentos internacionais e políticas nacionais impulsionam a importância das plantas medicinais.⁴ Dentre estas, destaca-se o mastruz (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants) que apresenta diversas propriedades farmacológicas^{5,6} de grande destaque na área médica-odontológica: como a sua capacidade de acelerar o reparo ósseo⁷; e o seu efeito anti-inflamatório e cicatrizante nos tecidos pulpar e periodontal, estimulando assim o reparo ósseo alveolar.⁸

Sendo assim, este trabalho objetivou desenvolver e avaliar esferas de quitosana/*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants para aplicação como biomaterial. Um aspecto importante nesta pesquisa é a possibilidade de obtenção de um novo biomaterial com tecnologia e materiais nacionais, a partir do emprego da quitosana e do extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, de forma que esta proposta de trabalho encontra efetiva relevância social e científica.

Material e Métodos

A pesquisa foi do tipo laboratorial, quali-quantitativa desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

A planta foi cultivada e coletada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em João Pessoa.

Em seguida foi obtido do extrato alcoólico de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz), sendo este um material escuro, pastoso e denominado extrato alcoólico bruto (EAB).

Com a finalidade de identificar botanicamente, foi confeccionada a exsiccata, com a qual se fez a identificação botânica no herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da UFCG. Amostras representativas das exsiccatas foram depositadas no Herbário CSTR, sob número de tombo – CSTR 6015.

Foi, então, preparada uma solução de quitosana 2% (Sigma Aldrich® - Grau de desacetilação de 75-85%, Lote SLBF5331V) em ácido acético glacial a 1% (Neon, Lote 21352) (v/v), no agitador mecânico (IKA®RW 20, da marca IKA®) durante 24 h a 435 rpm. Em seguida, foi dissolvido, também, sob agitação mecânica, a quantidade de EAB necessária para obtenção das soluções de quitosana com diferentes percentuais do extrato. Os grupos foram formados a partir desses percentuais. Sendo o grupo Q0, as esferas produzidas a partir da solução de quitosana; Q5, aquelas produzidas a partir da solução de quitosana+5% de EAB; Q10, quitosana+10% de EAB e finalmente Q20, quitosana+20% de EAB (Q20).

Posteriormente às diluições, para a obtenção das esferas, foi utilizada a técnica de Geleificação Iônica. Para tanto, foram adicionados separadamente, 10 ml de cada solução (Q0, Q5, Q10 e Q20) em seringas de 10ml (Descarpack) equipadas com uma agulha de 25 mm de comprimento e 0,80 mm de diâmetro (NIPRO). O conjunto (seringa/agulha/solução) foi então acoplado a uma bomba de infusão (Cole Parmer) com velocidade de 20 ml/h. As gotículas formadas foram recolhidas em um bquer contendo 100ml de solução de TPP (Tripolifosfato de Sódio) (Sigma Aldrich®, Lote 12421JIV) a 5%, onde foram formadas as esferas. As mesmas permaneceram na solução de TPP por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, as esferas de cada grupo foram lavadas em 10ml de água destilada, por três vezes. Concluído o terceiro ciclo de lavagem, as esferas de quitosana/*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin&Clemants foram dispostas em discos de papel filtro para remover o excesso de água e levadas à estufa por 24 horas a 37°C para secar. Passadas às 24 horas, as esferas foram acondicionadas, separadamente por grupo, em tubos falcon e, finalmente, encaminhadas para as caracterizações.

As esferas de quitosana (Q0) e quitosana com extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin&Clemants, em diferentes concentrações (Q5, Q10 e Q20), foram caracteri-

zadas pelas técnicas de Microscopia Óptica (MO) e pelos ensaios de Citotoxicidade *in vitro* e Biodegradação Enzimática *in vitro*.

Para caracterização por Microscopia Óptica (Hirox, modelo SHX- 13M) foram realizadas imagens com o aumento de 40X da superfície externa das esferas de quitosana sem e com o extrato *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin&Clemants em diferentes concentrações.

O ensaio de Citotoxicidade *in vitro* foi realizado por meio do contato direto entre as esferas e as linhagens de fibroblastos (L929). Para tanto, foi utilizada uma concentração de 5 x 10⁵ células/mL do meio para cultivo de células tipo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-C e adicionados 100 µL em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 µL de RPMI 1640-C, foram usados 12 poços para cada grupo testado (totalizando 48 poços), 12 poços para o branco e 12 poços para o controle negativo, o RPMI 1640-C foi utilizado como controle. A placa foi incubada outra vez em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, foram adicionados 100 µL de solução de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em RPMI 1640-C (0,5mg/mL). Novamente, a placa foi incubada em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de álcool isopropílico, sendo finalmente realizada a leitura da densidade óptica em um leitor de microplacas (Victor 3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade.

Esferas inteiras de cada um dos grupos (Q0, Q5, Q10, Q20) foram submetidas à avaliação da Biodegradação Enzimática *in vitro*, em solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich®, Lote SLBC5890) e outras amostras, também de cada um dos quatro grupos, foram submetidas à avaliação da biodegradação em solução de lisozima/PBS com concentração de 1 mg/mL.

Foram utilizadas 50mg (± 2mg) de esferas, correspondendo à massa inicial de cada amostra. Para cada grupo (Q0, Q5, Q10, Q20) foi realizado o ensaio em três amostras, tanto para a solução de PBS, quanto para a solução de lisozima/PBS; para cada um dos tempos determinados; 7, 14 e 21 dias.

As amostras foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37°C. As primeiras esferas de cada grupo (triplicata), tanto do PBS quanto da lisozima/PBS foram retiradas da estufa após 7 dias; as outras esferas de cada grupo (triplicata) mantidas no PBS e lisozima/PBS só foram retiradas da estufa após 14 dias e 21 dias.

Depois da remoção das esferas da estufa em cada um dos tempos propostos, procedeu-se a pesagem em balança analítica (Shimadzu AU220). Os valores das massas em miligrama (mg) das amostras antes e após os tempos determinados forneceram os resultados referentes à degradação das esferas, observados a partir da média de ensaios repetidos.

Os resultados do ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro* foram tabulados e analisados estatisticamente no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v. 20, IBM, Chicago, IL), sendo considerado o nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). Inicialmente, os dados foram analisados quanto a sua distribuição, sendo aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Dada a distribuição normal, os dados foram analisados segundo análise de variância (ANOVA). Para a análise de biodegradação enzimática *in vitro*, foram considerados os fatores “concentração do extrato de mastruz”, “tempo” e “presença de lisozima”. Assim, foi realizada a análise de variância a três critérios fixos (three-way ANOVA). Para análise das diferenças intergrupos, utilizou-se o teste de Tukey HSD.

Resultados

Por meio da microscopia ótica MO, utilizando-se um aumento de 40x, foi possível observar que as esferas são bem delimitadas e que se tornaram mais escuras, à medida que o percentual do extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants foi aumentado, evidenciando a incorporação deste (Figura 1).

Com relação ao ensaio de Citotoxicidade *in vitro*, os resultados observados na Tabela 1 demonstram que as amostras de todos os grupos apresentaram viabilidade celular, não sendo por tanto citotóxicas. Visto que de acordo com documento ISO 10993-5: 2009⁹, que determina a citotoxicidade do material se os valores obtidos forem menores do que 70%.

No ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro*, quando as esferas foram inseridas na solução de lisozima/PBS (*Phosphate Buffered Saline*), foi possível observar que todos os grupos apresentaram perda de massa estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre os momentos inicial e final em todos os tempos estudados (Tabela 2), fato este mais evidente no grupo Q0, nos tempos de 14 e 21 dias quando se observou a degradação total das mesmas (Figura 2). O fato de ter havido perda de massa em todos os grupos demonstra a efetividade da lisozima.

Na solução de PBS sem lisozima (Figura 3), pôde-se observar um ganho de massa, entre os momentos inicial e final, estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em quase todos os grupos e todos os tempos observados. Exceção foi observada para as amostras com 5% do extrato de mastruz (Q5), entre os tempos de 14 dias inicial e final, as quais não diferiram entre si ($p > 0,05$), embora se observe também esse ganho (Tabela 2).

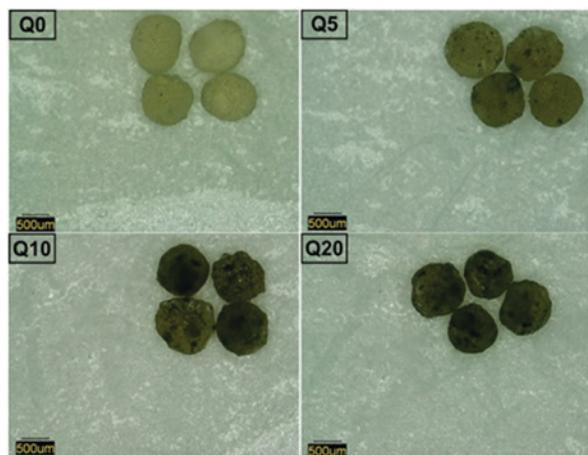


Figura 1. Imagens das esferas no MO com aumento de 40x. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)

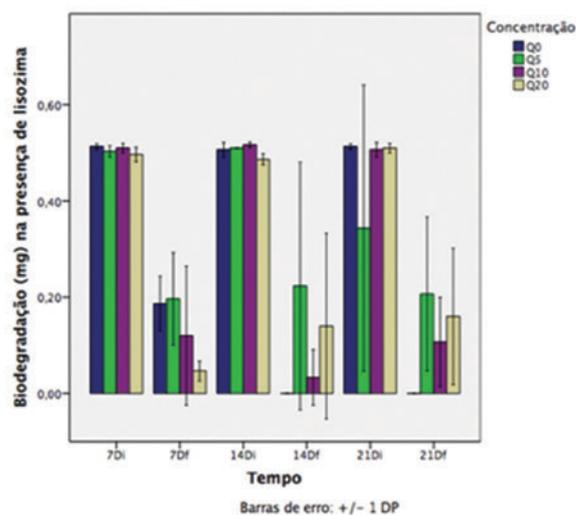


Figura 2. Biodegradação, na presença de lisozima, das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7, 14 e 21 dias), onde Di significa avaliação da massa inicial e Df significa avaliação da massa final. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão

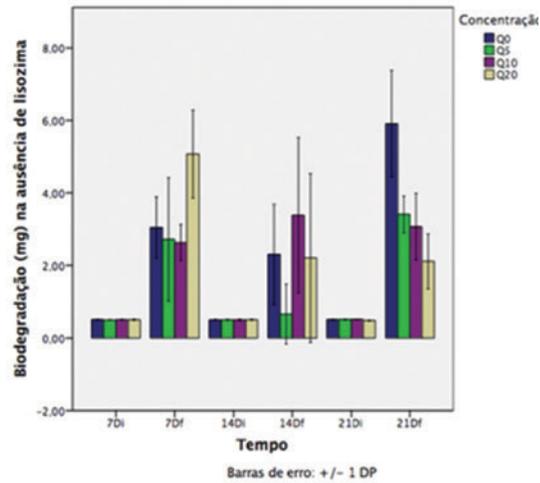


Figura 3. Biodegradação, na ausência de lisozima, das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7, 14 e 21 dias), onde Di significa avaliação da massa inicial e Df significa avaliação da massa final. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão

Tabela 1. Percentual de viabilidade celular de cada grupo

Grupo	% de viabilidade	Desvio Padrão
Q0	93	± 14
Q5	93	± 14
Q10	93	± 16
Q20	96	± 13

Tabela 2. Resultados do ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro*

	Grupo	Solução de lisozima/PBS		Solução de PBS	
		Perda de massa (mg)	Perda de massa (%)	Ganho de massa (mg)	Ganho de massa (%)
0	7 dias	- 3,27	- 63,64	25,37	500,67
	14 dias	- 5,07	- 100,00	18,00	360,00
	21 dias	- 5,13	- 100,00	54,03	1066,44
5	7 dias	- 3,07	- 60,00	22,23	447,67
	14 dias	- 2,87	- 56,21	1,57	31,33
	21 dias	- 1,37	- 39,80	29,00	568,63
10	7 dias	- 3,9	- 76,47	21,27	422,52
	14 dias	- 4,83	- 93,55	28,83	576,67
	21 dias	- 4,00	- 78,95	25,53	497,41
20	7 dias	- 4,50	- 90,60	45,63	906,63
	14 dias	- 3,47	- 71,23	17,00	16,27
	21 dias	- 3,50	- 68,63	337,75	336,55

Discussão

Neste trabalho, se utilizou o extrato alcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz) (EAB). Segundo a APG III - *Angiosperm Phylogeny Group*, isto é o Grupo para a Filogenia das Angiospermas; o mastruz não se encontra mais no gênero *Chenopodium* e sim no gênero *Dysphania*, sendo *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants o nome aceito e correto atualmente, em substituição à *Chenopodium ambrosioides* L.¹⁰

De acordo com Bitencourt¹¹, a incorporação de substâncias ativas pode influenciar a estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como: tamanho, peso molecular, interações com a matriz polimérica, dentre outros.

Na atual pesquisa, por meio da MO, não se observou perda das características das esferas, decorrente da incorporação do EAB, porém Ma e Liu¹² observaram essa perda, quando utilizaram albumina de soro bovino (BSA) incorporada à quitosana. Sendo a eficiência de encapsulação inferior a 40% quando a razão em peso de BSA para quitosana atingiu 20%.

No presente trabalho o ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado, por meio do contato direto entre as esferas e as linhagens de fibroblastos (L929), utilizando-se o teste de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

De acordo com a classificação de citotoxicidade de materiais do documento ISO 10993-5: 2009⁹ ocorre a citotoxicidade do material se os valores obtidos de viabilidade celular (%) forem menores do que 70%, no presente trabalho todos os valores de viabilidade foram superiores a 70%, portanto sendo estes considerados não citotóxicos.

Grassi⁶ realizou um teste *in vitro* de viabilidade celular, para tanto foi utilizado células não tumorais L929 frente a diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB) do mastruz, as mesmas células utilizadas no presente estudo. Com os resultados obtidos, ele concluiu que o EEB não reduziu a viabilidade celular, quando comparadas ao controle negativo. O mesmo autor avaliou também os efeitos tóxicos do EEB de *C. ambrosioides* que pudessem inviabilizar o uso terapêutico da planta, e este não gerou hipotermia e alterações motoras nos camundongos e ratos testados quando se utilizou as mesmas concentrações do teste *in vitro* por via oral.

Borges *et al.*¹³ compararam a toxicidade do óleo essencial de *C. ambrosioides* para células de mamíferos e concluíram que óleo não apresentou toxicidade contra as mesmas.

A taxa de degradação da quitosana é um importante fator a ser considerado para sua aplicação biomédica e farmacêutica. É importante que polímeros como a quitosana possam ser eliminados do organismo após o cumprimento de sua função, e para isso, é necessário que o polímero seja reduzido a fragmentos menores passíveis de sofrer, por exemplo, *clearance* renal.¹⁴

Com relação à biodegradação na presença da lisozima, o fato do grupo no Q0 ter havido maior degradação compara-

do aos demais grupos, já que degradou totalmente no tempo final de 14 e 21 dias, corrobora com a hipótese de que o EAB atuou como agente reticulante e provocou a não degradação total nos grupos Q5, Q10 e Q20.

Em outro estudo, membranas de quitosana com sulfato de condroitina degradaram mais rápido do que aquelas de quitosana pura. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a alta solubilidade do sulfato de condroitina em água, e que por isso, o mesmo foi liberado, ampliando a degradação da quitosana.¹⁵ No presente estudo o extrato alcoólico bruto (EAB) de *Dysphania ambrosioides* apresentou dificuldade de solubilização, o que pôde ser observado no momento das diluições do mesmo na quitosana, antes da confecção das esferas; como também nas imagens obtidas com a microscopia ótica. Esse fato pode ter influenciado na degradação maior do grupo Q0.

No trabalho de Spin Neto¹⁶ sobre regeneração óssea, foi observada uma importante característica da quitosana, que foi a biodegradabilidade, pois nos dois períodos observados, não foi observado resquícios da mesma. A biodegradação de muitos polímeros tem sido estudada, especialmente da quitosana, por ser de fácil manipulação, favorecendo esse tipo de estudo. No presente trabalho se observou em todos os grupos e tempos avaliados que, na presença da lisozima, houve uma diminuição da massa das esferas, o que significa degradação das mesmas, provavelmente se fossem analisadas por períodos maiores de tempo poderia ser observada a degradação total destas.

Esse ganho de massa pode ser explicado pelo fato da quitosana, em soluções aquosas de ácidos diluídos, como a que foi utilizada para a fabricação das esferas, adquirir maior número de cargas positivas devido à protonação dos grupos amino de suas cadeias e passa a exibir o comportamento de um polieletrólito catiônico,¹⁷ apresentando caráter higroscópico, sendo capaz de absorver até 400% da sua massa inicial em meio aquoso.¹⁸

Conclusão

- A metodologia para produção de esferas foi de fácil execução, sendo por tanto reprodutível;
- O estudo morfológico realizado por MO evidenciou a formação de esferas bem delimitadas e mais escuras, à medida que se aumentou o percentual do EAB, evidenciando a incorporação deste;
- Todas as amostras estudadas apresentaram viabilidade celular;
- Na presença de lisozima, as esferas de todos os grupos apresentaram perda de massa em todos os tempos estudados, fato este mais evidente no grupo Q0, nos tempos de 14 e 21 dias. Na ausência de lisozima na solução de PBS pode-se observar um ganho de massa em todos os grupos para todos os tempos observados;
- Conclui-se que todas as esferas apresentaram potencial para utilização como biomaterial. 

Referências ::

1. Boëck-Neto RJ, Artese L, Pettrelli A, Shilbli JA, Perrotti V, Piccirilli M. VEGF and MVD expression in sinus augmentation with autologous bone and several graft materials. *Oral Dias*. 2009;15(2):148-54.
2. Oliveira LSAF, Oliveira CS, Machado APL, Rosa FP. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *R. Ci. Méd. Biol*. 2010;9(1):37-44.
3. Azevedo AS, Sá MJC, Fook MVL, Nóbrega Neto PI, Sousa OB, Azevedo SS. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos: Estudo histológico e morfométrico. *Ciência Rural*. 2013;43(7):1265-70.
4. Assis MA, Morelli-Amaral, VF, Pimenta, FP. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Fitos*. 2015;9(1):1-72.
5. Brito MVH, Carvalho DS, Albuquerque AMM. Efeito do extrato de mastruz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Paraense de Medicina*. 2007;21(1):21-5.
6. Grassi LT. *Chenopodium ambrosioides* L. Erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante. [Dissertação]: Universidade do Vale do Itajaí; 2011. 147. Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
7. Penha ES. Efeito do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L) no processo de reparo ósseo de ratos. [Dissertação]. Natal-RN: Universidade Potiguar; 2012. 59. Mestrado em Odontologia.
8. Souza JNL. Ação da aroeira (*schinusterebinthifolius raddi*) e do mastruz (*chenopodium ambrosioides* l) no processo de reparo de dentes de ratos reimplantados. [Dissertação]. Natal-RN: Universidade Potiguar, 2010. 131. Mestrado em Odontologia.
9. ISO 10993-5:2009:Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
10. APG III 2009. An up date of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc*. 2009;161(2):105-21.
11. Bitencourt CM. Desenvolvimento e aplicação de filmes á base de gelatina aditivados com extratoetanólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.). [Dissertação] Pirassununga: Universidade de São Paulo; 2013. 107. Mestrado em Ciência da Engenharia de Alimentos.
12. Ma L, Liu C. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. 2010;75(448).
13. Borges AR, Aires JRA, Higinio TMM, Medeiros MGF, Citó AMGL, Lopes JAD, et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *ExpParasitol*. 2012;132:123-28.
14. Kean T, Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *AdvancedDrugDeliveryReviews*. 2010;62:3-11.
15. Fernandes LL. Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. [Monografia] Rio de Janeiro-RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009. 63. Graduação em Engenharia de Materiais.
16. Spin Neto R. Desenvolvimento e aplicações de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica. [Dissertação]. Araraquara-SP: Universidade Estadual Paulista - Júlio Mesquita; 2008.132. Mestrado em Periodontia.
17. Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Campana SP, Cavalheiro ET. Caracterização de Quitosanas Comerciais. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2003.
18. Campos MGN. Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos. [Tese] Campinas - SP: Universidade Estadual de Campinas; 2007.130. Doutorado em Química.

Recebido em: 26/03/2016 / Aprovado em: 14/06/2016

Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Curso de Odontologia

Avenida dos Universitários, S/N, Santa Cecília

Patos/PB, Brasil - CEP: 58708-110

E-mail: luannaabiliod@gmail.com