

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

VINICIUS BALLISTA GALETTI

**Preparo e caracterização de membranas porosas à base de *whiskers* de beta-
quitina/curcumina**

São Carlos

2019

VINICIUS BALLISTA GALETTI

Preparo e caracterização de membranas porosas à base de *whiskers* de beta-quitina/curcumina

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Materiais e Manufatura, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro de Materiais e Manufatura.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

G151p Galetti, Vinicius
Preparo e caracterização de membranas porosas à base de whiskers de beta-quitina/curcumina / Vinicius Galetti; orientador Sérgio Paulo Campana Filho. São Carlos, 2019.

Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais e Manufatura) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Curativo. 2. Curcumina. 3. Quitina. 4. Membrana porosa. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE APROVAÇÃO

| |
|--|
| Candidato: Vinicius Ballista Galetti |
| Título do TCC: Preparo e caracterização de membranas porosas à base de whiskers de beta-quitina/curcumina |
| Data de defesa: 12/11/2019 |

| Comissão Julgadora | Resultado |
|--|------------------|
| Livre-docente Sérgio Paulo Campana Filho (orientador) | <i>APROVADO</i> |
| Instituição: IQSC - Departamento de Físico-Química | |
| Professor Doutor Danilo Manzani | <i>APROVADO</i> |
| Instituição: IQSC - Departamento de Química e Física Molecular | |
| Pesquisador Danilo Martins dos Santos | <i>APROVADO</i> |
| Instituição: Embrapa Instrumentação - Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio - LNNA | |

Presidente da Banca: **Livre-docente Sérgio Paulo Campana Filho**


(assinatura)

*A minha família por acreditarem e
me apoiarem a todo momento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente minha mãe, Jusselaine Aparecida Ballista Galetti, que me apoia a todo momento e me incentiva a continuar e sempre buscar mais. Minha irmã, Marina Ballista Galetti, que sempre está presente e me ajuda de uma maneira inexplicável a ser uma pessoa melhor. Agradeço também toda minha família por me ajudar a trilhar o caminho até aqui e me ensinar como ser mais humano.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana, por todo suporte, apoio e conhecimento que me proporcionou durante minha graduação.

Agradeço ao Dr. Danilo Martins dos Santos por todo apoio e compreensão durante o desenvolvimento desse projeto e de minha iniciação científica.

Agradeço a mestranda Amanda Grizzo que me ajudou no desenvolvimento desse projeto e se tornou uma amiga muito querida.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante a graduação, sem eles não teria a coragem e o suporte para as realizações que tive até aqui. Em especial quero agradecer Jônatas Viscaino e Jacqueline Pereira Rocha que desde o primeiro dia que cheguei em São Carlos se tornaram muito especiais para mim.

Agradeço também Jayne Beatriz, Camila Yumi, Vanessa Narumi, Ana Beatriz e Hugo Nakaema, que estão comigo em todos os momentos, desde os mais tristes até os mais felizes.

Quero agradecer também minhas amigas Letícia Godoy, Fernanda Dalarmi, Larissa Lorenzini e Débora Reis, que sempre me apoiam e se tornaram parte da minha família.

Agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma a trilhar meu caminho até aqui.

"Ohana quer dizer família. Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer".

(SANDERS, CHRIS; LILO & STITCH, 2002)

RESUMO

GALETTI, V.B. **Preparo e caracterização de membranas porosas à base de whiskers de beta-quitina/curcumina**. 2019. 64 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A quitina consiste em polímero natural biodegradável, biocompatível e não-tóxico presente em grande abundância na natureza, o que a torna promissora matéria-prima para produção de novos materiais a serem aplicados na área biomédica. No presente estudo, foram preparadas membranas porosas à base de *whiskers* de beta-quitina, contendo glicerol como plastificante, às quais diferentes teores de curcumina foram incorporados (1, 2,5 e 5%), visando avaliar o potencial desses materiais como curativos para o tratamento de lesões na pele. As membranas obtidas foram caracterizadas quanto à sua estrutura química por espectroscopia no infravermelho, propriedades mecânicas, capacidade de hidratação, porosidade. A morfologia das membranas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios *in vitro* de suscetibilidade à degradação enzimática foram realizados para avaliar a estabilidade desses materiais em condições simuladas de aplicação. Os resultados revelaram que as membranas obtidas apresentavam elevada porosidade ($92,0 \pm 1,5$ e $87,9 \pm 0,5$ %). Alta capacidade de hidratação (2331 ± 91 e 510 ± 68 %), a qual reduziu com o aumento no teor de curcumina. Os ensaios de tração demonstraram que o aumento na concentração de curcumina levou à redução nos valores de tensão de ruptura e módulo de elasticidade e não alteraram a capacidade de alongação. Os ensaios de suscetibilidade à degradação enzimática indicaram que as membranas contendo 1% e 5% de curcumina foram mais estáveis em meio aquoso na presença de lisozima, sendo os valores de massa residual após 7 dias de análise próximos a 70,0%, ao passo que a massa residual das membranas sem curcumina e com 2,5 % de carga apresentaram valores de massa residual iguais a 65 % e 60 %, respectivamente. Apesar de ensaios biológicos adicionais que avaliem a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana serem necessários, os resultados obtidos no presente estudo indicam que as membranas produzidas apresentam potencial para serem utilizadas como curativos no tratamento de lesões de pele que liberam grande quantidade de exudado em função da elevada porosidade e capacidade de hidratação desses materiais.

Palavras-chave: Curativo, Quitina, Curcumina, Membranas Porosas.

ABSTRACT

GALETTI, V.B. **Preparation and characterization of porous membranes based on beta-chitin whiskers /curcumin.** 2019. 64 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Chitin is a biodegradable, biocompatible and non-toxic natural polymer present in abundance in nature, making it a promising to produce new materials to be applied in the biomedical field. In the present study, porous membranes based on beta-chitin whiskers containing glycerol as plasticizer were prepared, each membrane have different curcumin contents (1, 2.5 and 5%), aiming to evaluate the potential of these materials as curatives for the treatment of skin lesions. The porous membranes were characterized by their chemical structure by infrared spectroscopy, mechanical properties, swelling capacity, porosity. Membrane morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and in vitro enzymatic degradation susceptibility assays were performed to evaluate the stability of these materials under simulated application conditions. The results showed that the membranes obtained presented high porosity (92.0 ± 1.5 and $87.9 \pm 0.5\%$). High swelling capacity (2331 ± 91 and $510 \pm 68\%$), which decreased with the increase of curcumin content. Tensile tests demonstrated that the increase of curcumin concentration led to a reduction in the tensile strength and modulus of elasticity values and did not alter the elongation capacity. Enzyme degradation susceptibility assays indicated that membranes containing 1% and 5% curcumin were more stable in aqueous solution in the presence of lysozyme, with residual mass values after 7 days of analysis close to 70.0%, whereas that the residual mass of membranes without curcumin and with 2.5% load presented residual mass values of 65% and 60%. Although additional biological assays to evaluate biocompatibility and antimicrobial activity are required, the results obtained in the present study indicate that the membranes produced have the potential to be used as wound dressings in the treatment of skin lesions that release large amounts of exudate due to the high porosity and swelling capacity of these materials.

Keywords: Wound dressings, Chitin, Curcumin, Porous Membranes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização. | 29 |
| Figura 2: Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina. | 30 |
| Figura 3: Estrutura do glicerol. | 32 |
| Figura 4: Estrutura química da curcumina. | 33 |
| Figura 5: Estrutura da pele humana. | 34 |
| Figura 6: Gládios de lula. | 38 |
| Figura 7: Beta-quitina obtida após o processo de desproteínização. | 39 |
| Figura 8: Suspensões nas placas de Petri. Da esquerda para a direita temos, membranas de whisker + glicerol; whisker + glicerol + 1% de curcumina; whisker + glicerol + 2,5% de curcumina e whisker + glicerol + 5% de curcumina. | 45 |
| Figura 9: Membranas após liofilização. Da esquerda para a direita temos, membranas de whisker + glicerol; whisker + glicerol + 1% de curcumina; whisker + glicerol + 2,5% de curcumina e whisker + glicerol + 5% de curcumina. | 45 |
| Figura 10: Espectro de infravermelho das membranas porosas. | 46 |
| Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura das membranas. (a) Membrana de whisker de quitina + glicerol; (b) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 1,0% curcumina; (c) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 2,5% curcumina; (d) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 5,0% curcumina. | 47 |
| Figura 12: Porosidades das membranas porosas. | 48 |
| Figura 13: Capacidade de hidratação das membranas (%) em função do tempo. | 49 |
| Figura 14: Propriedades (a) Tensão de ruptura, (b) Alongamento e (c) Módulo de elasticidade. | 51 |
| Figura 15: Curva de TG para as membranas porosas. | 53 |
| Figura 16: Curva de DTG para as membranas porosas. | 53 |
| Figura 17: Massa residual das membranas incubadas em tampão PBS. | 56 |
| Figura 18: Massa residual das membranas incubadas em tampão PBS e lisozima. | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 6: Primeiro estágio de queda de massa. | 54 |
| Tabela 2: Segundo estágio de queda de massa. | 54 |
| Tabela 8: Terceiro estágio de queda de massa..... | 55 |
| Tabela 9: Degradação das membranas após 7 dias de incubação. | 57 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 Introdução | 26 |
| 1.1 Biopolímeros | 27 |
| 1.2 Quitina | 29 |
| 1.3 <i>Whiskers</i> | 30 |
| 1.4 Glicerol | 32 |
| 1.5 Curcumina | 33 |
| 1.6 Lesões na pele | 34 |
| 1.7 Cicatrização e curativos | 35 |
| 1.8 Membranas porosas | 36 |
| 2 Objetivos | 37 |
| 2.1 Objetivo Geral | 37 |
| 2.2 Objetivos específicos | 37 |
| 3 Procedimento experimental | 38 |
| 3.1 β -quitina | 38 |
| 3.2 <i>Whiskers</i> de β -quitina | 39 |
| 3.6 Membranas porosas de <i>whiskers</i> de β -quitina/glicerol | 40 |
| 3.7 Membranas porosas de <i>whiskers</i> de β -quitina com glicerol e curcumina | 41 |
| 3.6 Caracterização das membranas porosas | 42 |
| 3.6.1 Espectroscopia no Infravermelho | 42 |
| 3.6.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) | 42 |
| 3.6.3 Porosidade | 42 |
| 3.6.4 Capacidade de hidratação | 43 |
| 3.6.5 Propriedades mecânicas | 43 |
| 3.6.6 Termogravimetria | 43 |
| 3.6.7 Degradação enzimática | 44 |
| 4 Resultados | 44 |
| 4.1 Caracterização das membranas porosas | 44 |
| 4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho | 45 |
| 4.1.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) | 47 |
| 4.1.3 Porosidade | 48 |
| 4.1.4 Capacidade de hidratação | 49 |
| 4.1.5 Propriedades mecânicas | 50 |
| 4.1.6 Termogravimetria | 52 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 4.1.7 Degradação enzimática | 55 |
| 5 Conclusões | 58 |
| 6 Perspectivas | 60 |
| 7 Referências | 61 |

1 Introdução

No século 21, biomateriais são usados em diversas áreas e campos da medicina, biotecnologia e farmacêutica. Essa classe de materiais não era como conhecemos hoje há 50 anos atrás, inclusive a palavra “biomaterial” não era sequer utilizada para referenciar esses materiais que tentam simular ou substituir alguma parte ou função do corpo (RATNER et al., 2004).

Colocando em uma linha do tempo evidenciamos que desde a pré-história os biomateriais desempenharam um papel importante. Assim, por exemplo, o uso de suturas pode ser datado desde o Antigo Egito (2000 AC), era utilizados linho e ouro, já na Europa eram utilizados intestinos de gatos para as suturas; implantes dentários eram feitos de diversos tipos de materiais, por exemplo, pelos maias eram feitos de conchas em 600 AC, os franceses utilizavam ferro (200 AC), e romanos chineses e astecas utilizavam madeira e ouro (RATNER et al., 2004).

Na década de 1950 o foco era apenas encontrar materiais bioinertes, foco apenas na biocompatibilidade para substituir e dar suporte mecânico para um tecido. Com o passar do tempo a preocupação passou a ser com a bioatividade dos materiais utilizados, uma preocupação com a vida útil do implante utilizado. Atualmente o enfoque é na regeneração de um tecido funcional, ou seja, uma preocupação com o aspecto biológico, materiais biodegradáveis que serão absorvidos ou incorporados pelo tecido do hospedeiro. Uma abordagem mais recente se preocupa com a biomimética dos materiais. A biomimética é uma área de estudo que visa entender processos realizados pela natureza e como esses processos podem ser utilizados para inspirar soluções para problemas humanos (HOLZAPFEL et al.; 2013).

Seguindo a linha de regeneração de tecidos, existe uma área muito importante que estuda como alterar a forma como hoje são tratadas algumas doenças, traumas e mesmo ferimentos, essa é a engenharia de tecidos. Ao invés de pensar em um transplante de tecidos para a substituição de tecidos lesionados, são utilizados biomateriais capazes de regenerar, manter e ainda melhorar as funções do tecido ao invés de apenas trocá-lo (O'BRIEN; 2011).

Muitos problemas advindos do transplante de tecidos, como a rejeição, falta de tecidos para todos os pacientes que precisam de transplantes, além do preço e da dor causada pelos métodos de transplantar tecidos, seriam solucionados com a engenharia de tecidos (O'BRIEN; 2011).

Biomateriais que são utilizados na engenharia de tecidos podem ser tanto sintéticos como é o caso do poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico) quanto naturais.(GRIFFITH; 2002).

Scaffolds são materiais 3D porosos que promovem a constituição de ambiente favorável para a regeneração tecidual, o que é esperado de biomateriais para a aplicação em regeneração de tecidos. Esses *scaffolds* servem como suporte para que o tecido cresça sobre eles, estes podem conter ativadores que estimulem o crescimento tecidual (MARTIN, WENDT, HEBERER; 2004).

Para a fabricação dos *scaffolds* são utilizadas três classes de materiais: cerâmicas, polímeros sintéticos, polímeros naturais e metais. Cada um desses grupos tem suas propriedades e especificações, mas também limitações. Para solucionar essas limitações são utilizados compósitos de *scaffolds* de diferentes fases de materiais para combinar suas propriedades (O'BRIEN; 2011).

1.1 Biopolímeros

Polímeros são macromoléculas compostas por muitas (por vezes dezenas de milhares) de unidades de repetição que são denominadas monômeros, unidos entre si por ligações covalentes. Além disso, as cadeias poliméricas podem estabelecer interações intramoleculares fracas, como ligações hidrogênio e interações de Van der Waals, mas o uso de reagentes bifuncionais, ou de funcionalidade superior, promove a reticulação covalente das cadeias poliméricas (AKCELRUD, 2007).

Polímeros sintéticos e biopolímeros são extensivamente utilizados em Medicina, também em formulações farmacêuticas e na elaboração de biomateriais úteis na Engenharia de Tecidos. A utilização de polímeros na medicina é tão antiga quanto o início do estudo dos próprios polímeros (RATNER et al., 2004). As principais vantagens dos materiais poliméricos em comparação aos cerâmicos e metálicos incluem principalmente a versatilidade de forma que os polímeros podem ser utilizados (filmes, membranas, fios, géis, partículas, entre outros), o custo e a disponibilidade de encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas específicas para aplicações diversas (GRIFFITH, 2000).

Para selecionar um polímero para determinada aplicação muitos fatores necessitam ser considerados, pois os polímeros apresentam propriedades particulares que levam a aplicações muito específicas. Alguns exemplos de características que precisam ser consideradas são a forma da cadeia e a sua rigidez/flexibilidade, a disposição das unidades repetitivas (taticidade), presença de grupos funcionais, balanço ou predominância de características

hidrofílicas/hidrofóbicas, a massa molar média e dispersividade. A combinação dessas características pode levar a comportamentos físico-químicos e mecânicos completamente diferentes e, portanto, precisam ser consideradas com critério ao propor uma possível solução (AKCELRUD, 2007; DUMITRIU; 2001).

Polímeros podem ser sintetizados a partir de precursores denominados monômeros, que são reagentes bifuncionais susceptíveis a participar de reações de polimerização, ou podem ter origem natural, sendo nesse caso sintetizados por organismos vivos. Apesar dos polímeros sintéticos serem os mais utilizados, pois são produzidos em escala industrial e têm custo reduzido, os polímeros naturais apresentam vantagens tais como sua abundância na natureza e seu caráter renovável, além de serem, em geral, atóxicos, biocompatíveis e gerarem produtos de biodegradação que também exibem biodegradabilidade e baixa toxicidade, o que geralmente não ocorre no caso dos polímeros sintéticos, tornando os polímeros de ocorrência natural mais seguros que os polímeros sintéticos para a elaboração de biomateriais (RATNER et al., 2004; GRIFFITH, 2000).

A aplicação mais importante para os polímeros naturais é na área da medicina regenerativa, que inclui o tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos. Frequentemente, tais aplicações têm estreita relação com a semelhança do biomaterial e a matriz extracelular, sendo ainda possível observar atividades biológicas importantes do polímero natural as quais agregam funcionalidades específicas, como a indução da cicatrização de ferimentos (MOGOȘANU; 2014).

Uma classe de macromoléculas naturais muito utilizada para a elaboração de biomateriais e aplicações em farmácia, medicina e engenharia de tecidos são os polissacarídeos, que são abundantes como resíduos da atividade agrícola, como o bagaço de cana-de-açúcar, e da indústria pesqueira, como é o caso das cascas/carapaças de crustáceos. Nos exemplos citados as biomassas constituídas pelo bagaço de cana-de-açúcar e as cascas de crustáceos são ricas, respectivamente, em celulose, o polissacarídeo mais abundante na biosfera, e em quitina, que é apontada por alguns autores como um dos polissacarídeos mais abundantes após a celulose. Quitina e quitosana, polissacarídeo que ocorre na parede celular de alguns fungos e leveduras, vêm sendo extensivamente estudados para diversas aplicações, inclusive em medicina, farmácia e engenharia de tecidos, devido a suas propriedades físico-químicas e interessantes atividades biológicas (AZEVEDO et al.; 2007).

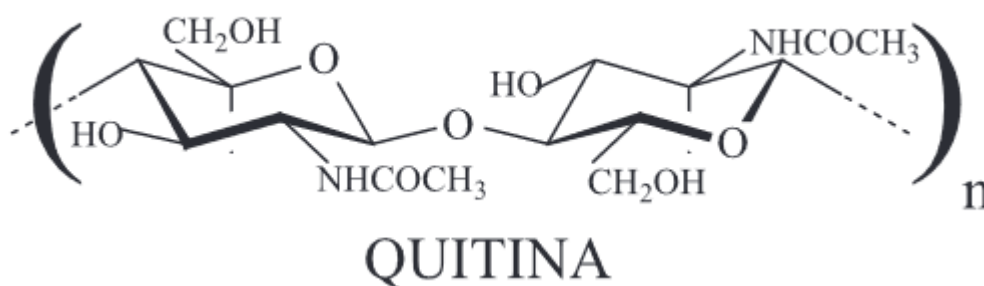
1.2 Quitina

A quitina é um dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza ocorrendo como importante componente dos exoesqueletos de artrópodes e nas paredes celulares de fungos e leveduras (RINAUDO; 2006; WIBOWO et al.; 2005).

Como mencionado, quitina ocorre nas cascas de camarões e carapaças de caranguejos, abundantes resíduos do processamento de frutos do mar, sendo essas biomassas empregadas industrialmente para a extração do polissacarídeo, o qual pode posteriormente ser quimicamente convertido em quitosana. Assim, considerando que tais biomassas apresentam elevadas demandas química e biológica de oxigênio, seu descarte na natureza pode causar severos danos ambientais, enquanto sua utilização industrial agrega valor à cadeia produtiva da indústria pesqueira. De fato, as propriedades físico-químicas e as atividades biológicas de quitina e quitosana abrem excelentes perspectivas de aplicações em diversos campos (WIBOWO et al.; 2005; CHANG et al.; 2010; DUTTA, RAVIKUMAR, DUTTA; 2002).

Quitina é um polímero fibroso e semi-cristalino de cadeia linear cuja unidade repetitiva, ou monômero, é o dissacarídeo que é formado majoritariamente (> 80%) por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura 1) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), embora também possam ocorrer limitadamente (< 10 %) unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GUPTA; 2010; ROBERTS; 1992).

Figura 1: Estrutura idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.



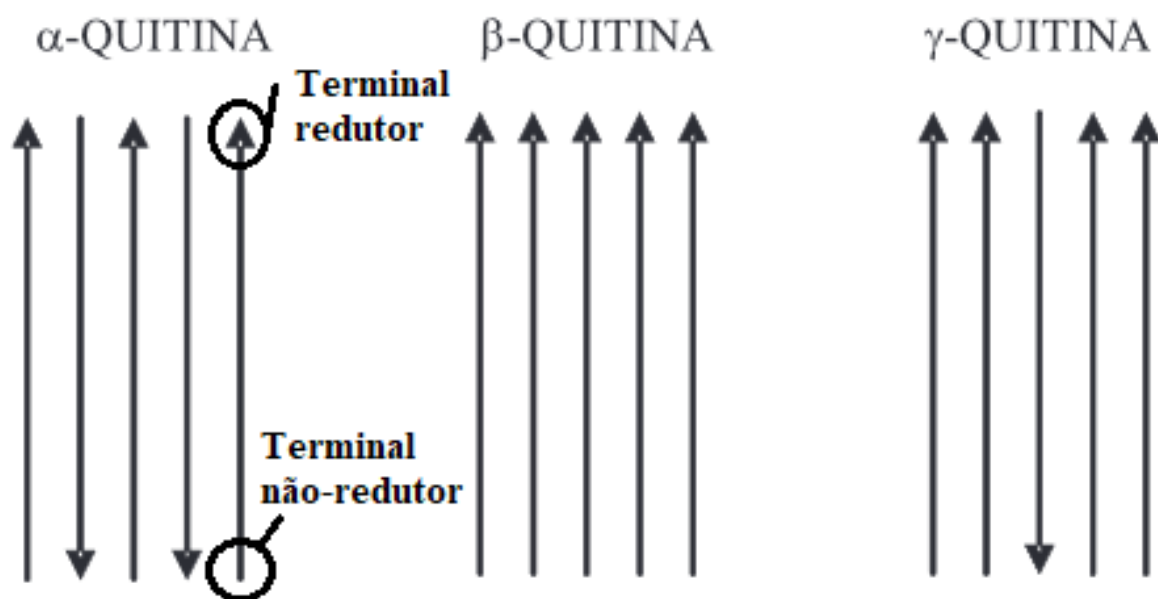
Fonte: Campana Filho *et al.*, 2007.

Quitina pode adotar diferentes arranjos no estado sólido, constituindo polimorfos denominadas α -, β - e γ -quitina, que ocorrem predominantemente em estruturas específicas conforme a função que desempenha nos organismos vivos dos quais é extraída. A α -quitina, a polimorfa a mais abundante e mais estável, é encontrada na parede celular de fungos, em carapaças de lagostas, de caranguejos, cascas de camarões e em cutículas de insetos. A

polimorfos β - e γ -quitina são encontradas em estruturas flexíveis, mas resistentes. Um exemplo de onde encontrar β -quitina é em gládios de lulas (RINAUDO; 2006; ROBERTS; 1992).

Levando em conta o empacotamento no estado sólido das cadeias de quitina nos domínios cristalinos (Figura 2), pode ser observado que as interações inter- e intramacromoleculares, do tipo ligações hidrogênio, são muito menos numerosas na polimorfa β -quitina, tornando-a mais acessível a solventes e mais susceptível a reações quando comparada à α -quitina. De fato, em α -quitina, graças à disposição anti-paralela de suas cadeias, ocorrem numerosas ligações hidrogênio envolvendo intracadeias e, também entre cadeias pertencentes à mesma lamela como entre aquelas de lamelas diferentes, resultando em arranjo mais compacto quando comparado a β -quitina (ROBERTS; 1992; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 2: Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina.



Fonte: Campana Filho *et al.*, 2007.

Devido às propriedades e atividades da quitina uma área de interesse de aplicação da quitina é na área biomédica, principalmente na engenharia de tecidos, pois pode ser processada como gel, membranas, filmes, nanofibras, micro e nanopartículas, e pode constituir *scaffolds* (JAYAKUMAR; 2010).

1.3 Whiskers

Uma forma que podemos encontrar a quitina é na forma de *whiskers*. Primeiramente antes de falar de *whiskers* em si, é preciso comentar sobre materiais compósitos. Esse tipo de material é, de uma forma bem simplificada, um tipo de conjunto que apresenta várias fases, ou

seja, um material multifásico. Essas fases estão separadas e podemos denominá-las como matriz e a fase dispersa ou fibra (CALLISTER et al., 2007).

As propriedades dos compósitos são uma função das fases que o constituem. O agente de reforço (fase dispersa) pode se apresentar sob forma de partículas ou de fibras (CALLISTER et al., 2007).

A utilização de fibras para a fase dispersa é mais comum e apresenta mais aplicações, pois favorece maiores valores de resistências ou rigidez. O comprimento dessas fibras é muito importante, pois a partir delas definimos as propriedades do material (CALLISTER et al., 2007).

Os *whiskers* nada mais são que um tipo de reforço na forma de fibras usado em um compósito. Mas nesse caso os *whiskers* são nanocristais muito finos com razão de aspecto muito grande (razão entre comprimento e diâmetro). Como são nanocristais, os *whiskers* não apresentam defeitos (sem imperfeições no arranjo periódico dos átomos), isso confere valores de resistência muito elevados (CALLISTER et al., 2007).

Nanocompósitos poliméricos seguem a mesma ideia de compósitos, só que nesse tipo de material a fase dispersa é dimensão nanométrica, no caso estudado os *whiskers*. O uso de uma fase nanométrica causa um grande efeito nas propriedades dos materiais (GOPALAN NAIR; DUFRESNE; 2003).

Os polímeros mais usados como reforço são sintéticos e, portanto, não apresentam características satisfatórias quanto biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os polímeros naturais como os polissacarídeos semicristalinos (quitina, amido e celulose) são muito bons candidatos para utilização como nanocristais (GOPALAN NAIR; DUFRESNE; 2003; ZENG et al.; 2011).

Dependendo da sua origem biológica a quitina forma diferentes tipos de fibrilas, que são filamentos com diâmetros de 2,5 a 25 nm. Devido a sua semelhança com a celulose, o primeiro trabalho no qual a hidrólise ácida foi utilizada para eliminar os domínios amorfos, de maneira a permitir o isolamento de fibrilas nanométricas em suspensão, desenvolvido por Marchessault e colaboradores (1959), foi inspirado em estudos anteriores que visaram a obtenção de *whiskers* de celulose (MARCHESSAULT, MOREHEAD, WALTER; 1959).

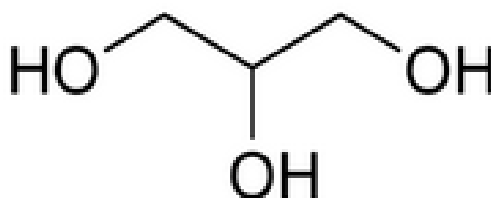
Atualmente os *whiskers* de quitina são obtidos como suspensões e estão sendo estudados para aplicações como reforço de nanocompósitos em campos como a engenharia de tecidos, cosméticos e para o encapsulamento de fármacos. (MINCEA, NEGRULESCU, OSTAFE; 2012; DUFRESNE; 2010).

Entretanto, existem poucos trabalhos e que β -quitina é explorada para a produção de *whiskers*, embora essa polimorfa de quitina apresente domínios cristalinos, os quais podem ser isolados através da hidrólise ácida para a formação de materiais cristalinos de dimensões nanométricas (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

1.4 Glicerol

O glicerol é um líquido incolor, sem cheiro e muito viscoso. Que apresenta estrutura de um tri-álcool (triol) com 3 carbonos em sua cadeia, chamado assim de 1,2,3-propanotriol (Figura 3). O glicerol recebe o nome comercial de glicerina. É umas das substâncias químicas mais conhecidas pelo homem (BEATRIZ, ARAÚJO, LIMA; 2011; PAGLIARO, ROSSI; 2008).

Figura 3: Estrutura do glicerol.



Fonte: Pagliaro, Mario *et al.*, 2007.

A solubilidade em água é possibilitada pela presença dos 3 grupos hidroxila na estrutura e também por sua natureza higroscópica. É uma molécula que forma a ligações hidrogênio tanto intra como intermolecularmente (CALLAM et al., 2001).

O glicerol pode ser produzido tanto por fermentação microbiana como por síntese química a partir de matéria-prima da petroquímica. Ele é também o principal subproduto obtido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (DA SILVA, MACK, CONTIERO; 2009).

As aplicações que podem ser consideradas para o glicerol estão na área de cosméticos, pintura, automotiva, alimentos, farmacêutica, papel e indústria têxtil (WANG et al.; 2001).

Como as cadeias de polímeros naturais têm como qualidade inerente a fragilidade das estruturas. Uma opção para melhorar as propriedades mecânicas é a utilização de plastificantes na composição dos materiais poliméricos em que participa (SRINIVASA, RAMESH, THARANATHAN; 2007).

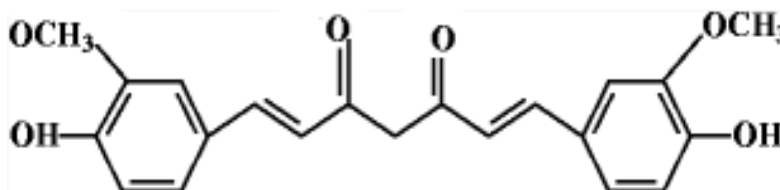
Os plastificantes reduzem as forças intermoleculares e assim proporcionam maior mobilidade às cadeias biopoliméricas (diminuindo a rigidez), e melhorando as propriedades mecânicas (SRINIVASA, RAMESH, THARANATHAN; 2007).

O glicerol apresenta um bom papel quanto plastificante de estruturas poliméricas, melhorando sua flexibilidade, elasticidade e outras propriedades mecânicas. Existem estudos que evidenciam um aprimoramento nas propriedades de filmes poliméricos de quitosana (SRINIVASA, RAMESH, THARANATHAN; 2007; SUYATMA et al., 2005).

1.5 Curcumina

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) (Figura 4) é um pigmento natural da cor amarela que pode ser isolado a partir do rizoma do açafrão (LEUNG, KEE; 2009).

Figura 4: Estrutura química da curcumina.



Fonte: Wang, Feng *et al.*, 2012.

Ela é muito utilizada como condimento alimentar (curry, por exemplo), na área de cosméticos e na medicina tradicional chinesa. Recentemente alguns estudos mostram que esse composto natural apresenta características muito interessantes para aplicações biomédicas, como a ação anti-inflamatória e ação anticâncer que a curcumina apresenta (WANG et al.; 2012; MIQUEL et al.; 2002; ANAND et al.; 2007).

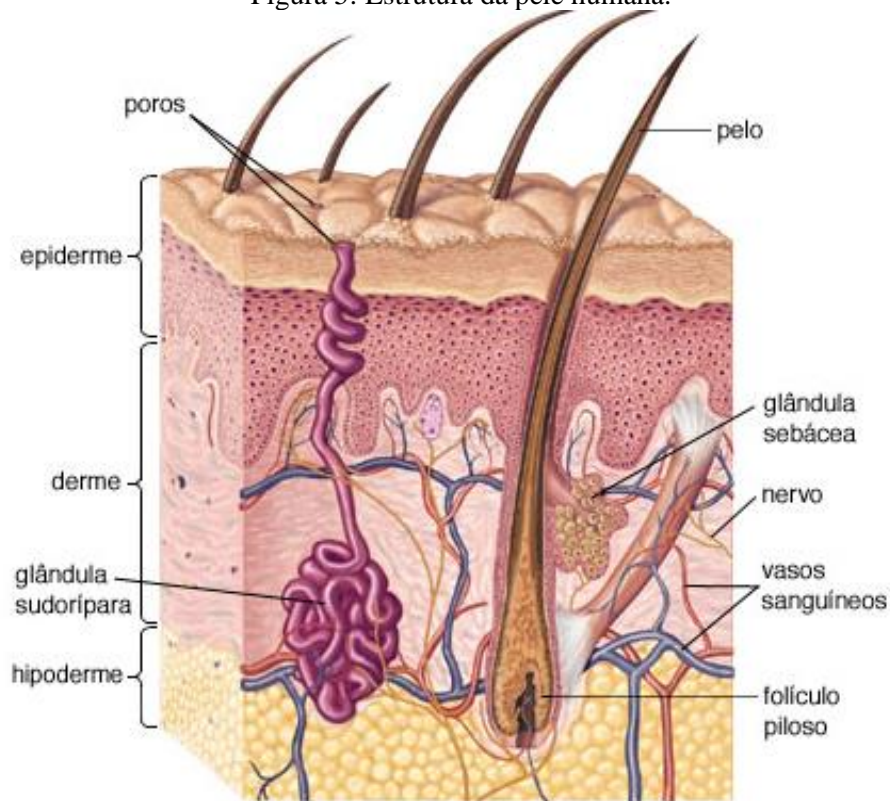
Biomonte e colaboradores realizaram um estudo *in vivo* da ação da curcumina em câncer pancreático. Os resultados dessa análise se mostraram promissores quanto a ação da curcumina na inibição da proliferação de tumores cancerosos (BIMONTE et al.; 2016).

Kant e colaboradores realizaram testes em ratos para evidenciar a ação anti-inflamatória da curcumina. A conclusão do trabalho foi que a regeneração de pele em ratos onde foi utilizado a curcumina como tratamento a cicatrização é mais rápida. Foi evidenciado também que a curcumina entra em ação na regeneração cutânea agindo diretamente no estágio de inflamação do ferimento (KANT et al.; 2014).

1.6 Lesões na pele

A pele (Figura 5) é o maior e o mais importante órgão do corpo humano, pois cobre todo o exterior do corpo e levando em consideração sua massa, ele representa cerca de 15% da massa total do corpo. A pele funciona como uma barreira para proteger o hospedeiro do exterior, a proteção vai desde desidratação até a invasão de microrganismos. A pele é formada basicamente por 3 camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme (KORRAPATI et al.; 2016; JAYARAMA REDDY et al., 2013).

Figura 5: Estrutura da pele humana.



Fonte: Encyclopaedia Britannica Inc., 2010.

A epiderme é a camada mais externa da pele, por esse motivo é uma estrutura altamente celular (maior parte de células mortas) para promover a sua principal função que é a de proteção do corpo. Sua composição são camadas de queratinócitos com diferenciação entre camadas. Temos também outras células na sua constituição como os melanócitos. Abaixo temos a derme que é separada da epiderme pela membrana basal. Consiste numa espécie de *scaffold* de matriz extracelular rico em colágeno, elastina, hialurano e proteoglicanos. Esses componentes conferem elasticidade e, também, resistência mecânica. O principal tipo de célula que está

presente na derme são os fibroblastos, que são responsáveis pela maior parte das sínteses dos componentes da matriz extracelular. As células endoteliais, que formam os vasos sanguíneos, também são abundantes nessa camada (TCHEMTCHOVA et al.; 2011).

A hipoderme é bem vascularizada e contém o tecido adiposo. Essa camada participa das propriedades termorregulatórias e mecânicas da pele (TCHEMTCHOVA et al.; 2011).

Lesões na pele são definidas como qualquer tipo de interrupção na continuidade de um tecido. Elas podem acontecer por diversos motivos, inclusive por distúrbios genéticos, traumas agudos, feridas crônicas ou intervenções cirúrgicas. Um trauma relacionado com a perda de pele muito comum é o trauma térmico, onde áreas grandes podem ser danificadas, e normalmente não há como lograr a regeneração natural/espontânea da pele (SHEVCHENKO, JAMES, JAMES; 2009).

As lesões da pele podem ser classificadas conforme ocorram sem perda de tecido ou com perda de tecido (trauma, queimaduras, entre outros) e quanto à sua extensão. E, também, são classificadas conforme o tecido da pele que atingem, sendo que a lesão superficial atinge somente a epiderme e quando a lesão atinge tanto a epiderme quanto a derme, ou as três camadas, é considerada grave (PAUL, SHARMA; 2012).

1.7 Cicatrização e curativos

Quando um tecido é lesionado, logo se inicia o processo de cicatrização. Esse processo não é simples e linear, mas sim um conjunto complexo de eventos que são diretamente relacionados como o tipo de lesão, profundidade, quantidade de exsudado liberado e até o quadro médico da pessoa (REINKE, SORG; 2012).

Independentemente do tipo de ferimento, esse processo de regeneração da pele segue etapas que são sobrepostas. O processo usual é a remoção do tecido lesionado para que o tecido possa ser regenerado (REINKE, SORG; 2012).

Um curativo ideal tem que exercer as seguintes funções: remover excesso de exsudados, agir como uma barreira contra microorganismos, permitir a troca gasosas, manter um ambiente úmido na interface ferida/cobertura, ser isento de partículas contaminantes, isolamento térmico e permitir a remoção sem traumas (MOHANDAS et al., 2018).

Os curativos usados geralmente são à base de algodão e servem apenas para cobrir o ferimento, não oferecendo um ambiente tão favorável para a cicatrização. Atualmente estão sendo desenvolvidos curativos que são bioativos. São filmes, esponjas, hidrogéis entre outros,

que além de proteção oferecem mais benefícios os quais são necessários para uma boa cicatrização (MOHANDAS et al., 2018).

A produção desse tipo de curativo que interage com o ferimento é feita de materiais poliméricos, podendo ser tanto naturais como sintéticos. O ponto negativo da utilização de polímeros sintéticos é que sua degradação pode gerar produtos tóxicos, assim a utilização de materiais biodegradáveis (polímeros naturais) é muito mais interessante (MOHANDAS et al., 2018).

1.8 Membranas porosas

Entre os tipos de materiais estudados a fim de produzir curativos bioativos estão as membranas porosas. Elas podem oferecer todos os requisitos ideais já citados e ainda promover a liberação de medicamentos o que melhora ainda mais seu uso como curativo (CHOW, KHOR; 2000).

Existem alguns outros pontos relevantes sobre as membranas porosas que podem proporcionar uma boa cicatrização, tais como sua alta capacidade de intumescimento, permeabilidade elevada ao vapor de água e a gases e, além disso, sua porosidade proporciona uma boa adesão para o crescimento e proliferação celular (CHOW, KHOR; 2000).

Existem muitas técnicas para a produção de poros em membranas de base polimérica, a escolhida para esse trabalho foi a de liofilização e será detalhada abaixo (FIAMINGO, CAMPANA-FILHO; 2016).

Todo o processo de liofilização pode ser descrito em 3 passos. Primeiro há o congelamento para conversão da água em gelo, em seguida ocorre sublimação do gelo e por último acontece a remoção de toda ou parte da água que não foi convertida em gelo (FRANKS, 1998).

Considerando esse processo de liofilização em membranas de base polimérica, temos que a remoção do gelo por sublimação leva ao aparecimento de espaços (poros) entre as cadeias, assim a estrutura formada se assemelha a uma esponja (membranas porosas) (WANG et al.; 2017).

Como visto, os polímeros naturais apresentam diversas características satisfatórias para o uso como biomaterial, por esse motivo neste trabalho serão estudadas membranas porosas de *whiskers* de beta-quitina e sua utilização para o desenvolvimento de curativo bioativo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Produzir membranas porosas à base de *whiskers* de quitina e curcumina potencialmente aplicáveis como curativos no tratamento de lesões de pele.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar *whiskers* de beta-quitina extraída de gládios de lula;
- Desenvolvimento por liofilização de membranas utilizando glicerol como agente plastificante;
- Avaliar o efeito da incorporação de diferentes cargas de curcumina na morfologia e nas propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas.

3 Procedimento experimental

3.1 β -quitina

A β -quitina foi extraída de gládios de lula (Figura 6) da espécie *Doryteuhis spp.* Os gládios foram lavados em água, para que fossem removidos vestígios de carne e posteriormente foram secos em estufa de circulação de ar a 30°C por 24 horas. Após secos os gládios foram triturados em um moinho de facas.

Figura 6: Gládios de lula.

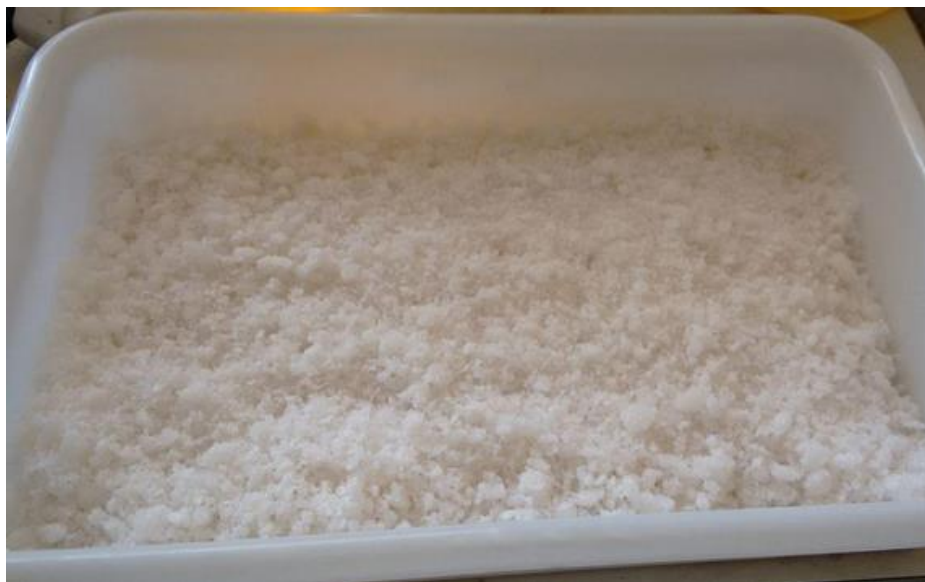


Fonte: Autoria própria.

O próximo passo, foi a desproteinização da biomassa triturada. Esse processo foi feito para a remoção de proteínas, para tal a beta-quitina (200g) foi tratada em 3,0 L de solução de NaOH 1 mol L⁻¹. A solução foi colocada sob agitação mecânica por 18 horas à temperatura ambiente e posteriormente foi filtrada (CAMPANA-FILHO et al., 2007; CHAUSSARD, DOMARD; 2004).

Após esse tratamento, a β -quitina foi lavada novamente para que fosse neutralizada e enfim foi seca em estufa de circulação de ar a 30°C por 24 horas (Figura 7) (CAMPANA-FILHO et al., 2007; CHAUSSARD, DOMARD; 2004).

Figura 7: Beta-quitina obtida após o processo de desproteínização.



Fonte: Autoria própria.

Como parte final do processo, essa massa seca foi triturada em moinhos de facas (modelo MA048 MARCONI) e em seguida foi peneirada. As partículas com dimensões entre 0,425 - 1,410 mm foram utilizadas na produção do *whiskers*.

3.2 *Whiskers* de β -quitina

Para a produção dos *whiskers*, a β -quitina foi submetida a processo de hidrólise ácida. Para esse processo foi utilizado um balão de fundo redondo e ao qual foram adicionados 10 g de β -quitina e 300 mL de HCl 3 mol L⁻¹. O balão foi colocado em sistema refluxo e banho de glicerina a 90°C. O sistema ficou em refluxo durante 3 horas (MARCHESSAULT, MOREHEAD, WALTER; 1959).

A fim de interromper a reação de hidrólise, o balão foi colocado em um banho de gelo. Quando o sistema atingiu a temperatura ambiente, a suspensão foi transferida para tubos falcon e centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *whiskers* foram resuspenso em água destilada e centrifugados novamente nas mesmas condições. Esse processo foi repetido até o pH da suspensão ficar entre 5-7.

As suspensões resultantes foram colocadas em membranas de diálise e estes colocados em água destilada. O processo de diálise foi feito em 3 dias.

Após esse período, o material resultante foi submetido à processo de dispersão com Ultra Turrax por 3 min a uma velocidade de 19000 rpm. Em seguida, a suspensão resultante foi sonicada no dispositivo HIELSHER SONIFIER UP400S ($\nu = 24\text{KHz}$) por 3 minutos seguindo

os seguintes parâmetros: sonotrodo de 22 mm de diâmetro, irradiação intermitente (ciclos de 50% de pulsação) e potência ajustada em 200 W, sendo a suspensão resultante mantida sob refrigeração entre 6 - 8 °C até futuro uso e caracterização.

A concentração de *whiskers* foi determinada pesando 3 amostras de suspensão com 1,0 g cada. As 3 amostras foram liofilizadas para uma nova pesagem da massa de *whiskers* na solução, assim foi possível determinar a concentração mássica de *whiskers* em solução que foi de $34,7 \pm 0,2$ mg por grama de suspensão.

3.6 Membranas porosas de *whiskers* de β -quitina/glicerol

O glicerol utilizado para produção das membranas foi o comercial da SIGMA – ALDRICH G5516 (Glicerol reagente para biologia).

Essa etapa foi realizada em 3 partes explicitadas abaixo.

Parte A - Suspensão de *whiskers* de β -quitina

A suspensão de *whiskers* foi diluída para obter suspensão de 50 g com concentração de *whiskerks* de 22 mg/g. Esta suspensão foi colocada sob agitação magnética.

Parte B – Dispersão de glicerol

Foram pesados 440 mg de glicerol e foi adicionado 60 g de água deionizada. Essa solução foi tratada por 5 minutos no Ultra Turrax a 19000 rpm. Posteriormente foi submetida a tratamento no dispositivo ultrassônico nas condições descritas no item 3.2 por 5 minutos.

Parte C – Membranas de *whiskers* de beta-quitina com glicerol

A suspensão de *whiskers* foi colocada no Ultra turrax a 19000 rpm enquanto a solução de glicerol era vertida no mesmo béquer, o sistema foi agitado por 5 minutos no Ultra Turrax. Por fim essa solução foi novamente submetida a tratamento no dispositivo ultrassônico por 5 minutos (seguindo mesmas condições do item 3.2).

Com o intuito de obter membranas de dimensões aproximadamente iguais, a mesma massa de solução (≈ 25 g) foi adicionado a placas de Petri identificadas. As mesmas foram congeladas a -80°C por 45 minutos e então liofilizadas, obtendo-se, assim, as membranas porosas.

3.7 Membranas porosas de *whiskers* de β -quitina com glicerol e curcumina

A curcumina utilizada neste trabalho foi a comercial da SIGMA – ALDRICH C1386 (Curcumin)

Essa etapa foi realizada em 3 partes explicitadas abaixo.

Parte A - Suspensão de *whiskers* de β -quitina

A suspensão de *whiskers* foi diluída para obter suspensão de 150 g com concentração de *whiskers* de 22 mg/g. Esta suspensão foi colocada sob agitação magnética.

Parte B – Dispersão de curcumina em glicerol

Foram pesados 25 mg, 62,5 mg e 125 mg de curcumina em frascos diferentes para preparação de membranas com teores de curcumina em relação à massa de *whiskers* de quitina de 1,0 %, 2,5 % e 5,0 %, respectivamente.

A cada frasco foi adicionado 1 g de glicerol e a solução obtida foi colocada sob agitação magnética.

Parte C – Membranas de *whiskers* de beta-quitina com glicerol e curcumina

Foi adicionada água deionizada (60 g) nas soluções de curcumina (440 mg) para resultar em soluções com concentração de curcumina de 1,0 %, 2,5 % e 5,0 %. Cada solução foi agitada por 5 min no Ultra Turrax (19000 rpm).

O passo seguinte foi tratar cada solução no dispositivo ultrassônico por 5 min seguindo as mesmas condições do item 3.2.

Adicionou-se a solução de curcumina à suspensão de *whiskers* (50 g). Nesse passo a solução de curcumina é vertida na suspensão de *whiskers* enquanto está sob agitação no Ultra Turrax (5 minutos a 19000 rpm).

Por fim essa solução foi novamente submetida a tratamento no dispositivo ultrassônico por 5 minutos (segundo mesmas condições do item 3.2).

Com o intuito de obter membranas de dimensões aproximadamente iguais, a mesma massa de solução (≈ 25 g) foi adicionado a placas de Petri identificadas. As mesmas foram congeladas a -80°C por 45 minutos e então liofilizadas, obtendo-se, assim, as membranas porosas com diferentes concentrações de curcumina.

3.6 Caracterização das membranas porosas

3.6.1 Espectroscopia no Infravermelho

Para realizar a análise no infravermelho, foram cortadas amostras de 1 cm² (1cmx1cm) das amostras. Foi utilizado o espectrômetro no infravermelho Bruker modelo Tensor 27. Os espectros foram obtidos na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e acúmulo de 32 varreduras.

3.6.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a morfologia da superfície das membranas porosas produzidas, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura digital modelo ZEISS LEO-440. Amostras de 1 cm² de área foram cortadas de cada amostra para análise. Por fim, foram colocadas sobre uma fita carbono adesiva no porta amostra de alumínio, cobertas com um fina camada de ouro e analisadas.

3.6.3 Porosidade

Para a determinação da porosidade das membranas, amostras de 1cm x 1cm foram pesadas e submersas em 10 mL de etanol absoluto à temperatura ambiente.

Na etapa subsequente, as amostras foram submetidas à ciclos de compressão-descompressão com o objetivo de promover a entrada de etanol nas membranas.

Em seguida, as amostras foram retiradas e o excesso de etanol removido levemente com papel toalha, sendo determinada a massa da amostra.

A porosidade das membranas pôde ser calculada por meio da Equação 1,

$$P(\%) = \frac{m_f - m_i}{p.v} \cdot 100 \quad (1)$$

em que:

$P(\%)$ = porosidade em porcentagem;

m_f = massa final das membranas (mg);

m_i = massa inicial das membranas (mg);

p = densidade aparente do álcool etílico à 28°C;

v = volume da amostra (mL).

O volume das amostras foi calculado multiplicando-se as medidas de espessura, altura e comprimento das membranas, obtidas empregando-se paquímetro.

3.6.4 Capacidade de hidratação

Para a determinação do grau de hidratação das membranas, amostras de cada uma foram cortadas (1 cm x 1cm), pesadas e imersas em solução tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,4 a 37°C. Foram utilizados intervalos determinados (0 s; 1 s; 2,5 min; 5 min; 7,5 min; 10 min) para medir a propriedades em questão. Após cada intervalo de tempo as amostras foram retiradas da solução e o excesso de solução removido levemente com auxílio de papel toalha, sendo, em seguida, pesadas. A capacidade de hidratação pode ser calculada seguindo a Equação 2,

$$GH(\%) = \frac{m_f - m_i}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

em que,

$GH(\%)$ = grau de hidratação em porcentagem;

m_f = massa final das membranas (mg);

m_i = massa inicial das membranas (mg).

3.6.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas foram analisadas utilizando o equipamento TA instruments DMA Q800 com uma garra do tipo Tension film.

Para essa análise as membranas foram cortadas nas dimensões de 30 mm x 6,4 mm. O experimento foi realizado com espaçamento entre as garras de 15 mm, rampa de força de 1 N min⁻¹ a 18 N e força pré-carga de 0,01 N, a 25 °C.

A partir dos ensaios foi possível determinar as propriedades mecânicas das membranas como: resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (GPa) e alongamento máximo na ruptura (%).

3.6.6 Termogravimetria

As análises termogravimétricas das membranas foram realizadas em equipamento TGA-50 (Shimadzu). Cerca de 8 mg de amostra foram transferidos para porta amostra de platina

e aquecidos de 22 a 700 °C sob razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹.

3.6.7 Degradação enzimática

Para avaliar a degradação enzimática das membranas porosas, amostras de cada membrana foram secas, cortadas em quadrados de 1 cm² de área (1cm x 1cm) e pesadas em balança analítica.

O próximo passo foi colocar as membranas em recipientes de vidro previamente esterilizados e identificados. Cada amostra foi analisada em solução tampão fosfato estéril (branco) e em solução de lisozima a 0,05 mg mL⁻¹ de tampão fosfato.

As amostras foram, incubadas a 37 °C por períodos de 1 dia, 2 dias, 4 dias e 7 dias. Após estes períodos, as mesmas foram retiradas dos frascos, lavadas com água deionizada, liofilizadas e pesadas. A degradação enzimática pôde ser analisada por meio da diferença da massa das amostras antes e após o experimento. Dessa forma, as porcentagens foram obtidas empregando-se a Equação 3,

$$DE(\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (3)$$

em que:

$DE(\%)$ = Degradação enzimática em porcentagem (porcentagem de massa restante após a degradação);

m_f = massa final das membranas (mg);

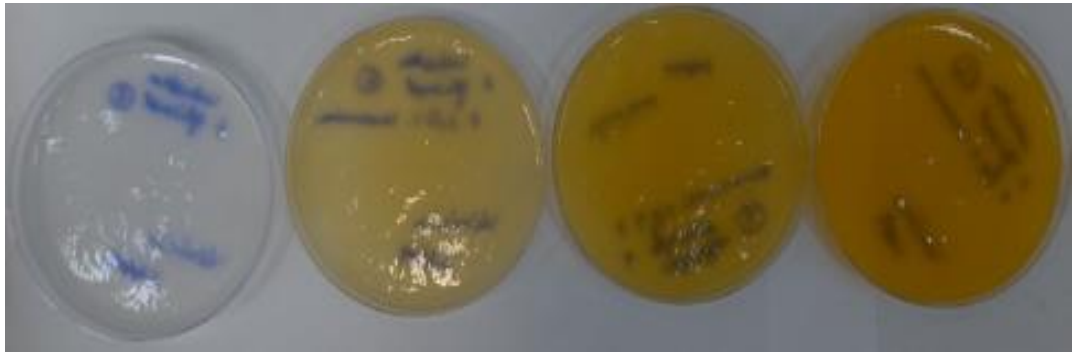
m_i = massa inicial das membranas (mg).

4 Resultados

4.1 Caracterização das membranas porosas

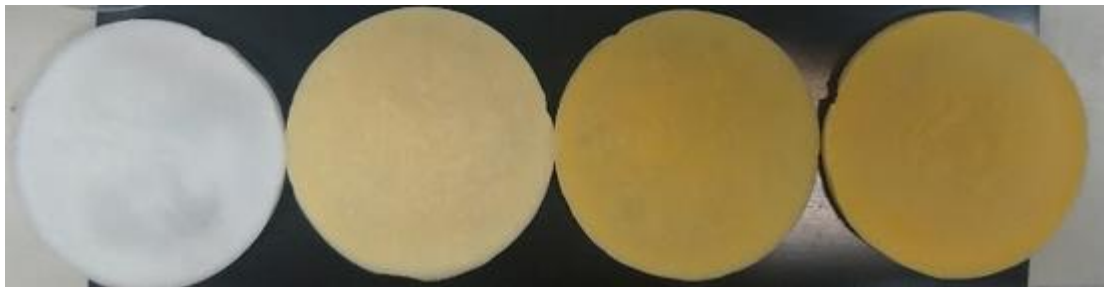
Seguindo os passos dos itens 3.6 e 3.7 foram produzidas com sucesso as membranas porosas descritas. Na Figura 8 temos as soluções em placas de Petri antes de serem congeladas e liofilizadas. Na Figura 9 temos as membranas após a liofilização.

Figura 8: Suspensões nas placas de Petri. Da esquerda para a direita temos, membranas de whisker + glicerol; whisker + glicerol + 1% de curcumina; whisker + glicerol + 2,5% de curcumina e whisker + glicerol + 5% de curcumina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 9: Membranas após liofilização. Da esquerda para a direita temos, membranas de whisker + glicerol; whisker + glicerol + 1% de curcumina; whisker + glicerol + 2,5% de curcumina e whisker + glicerol + 5% de curcumina.

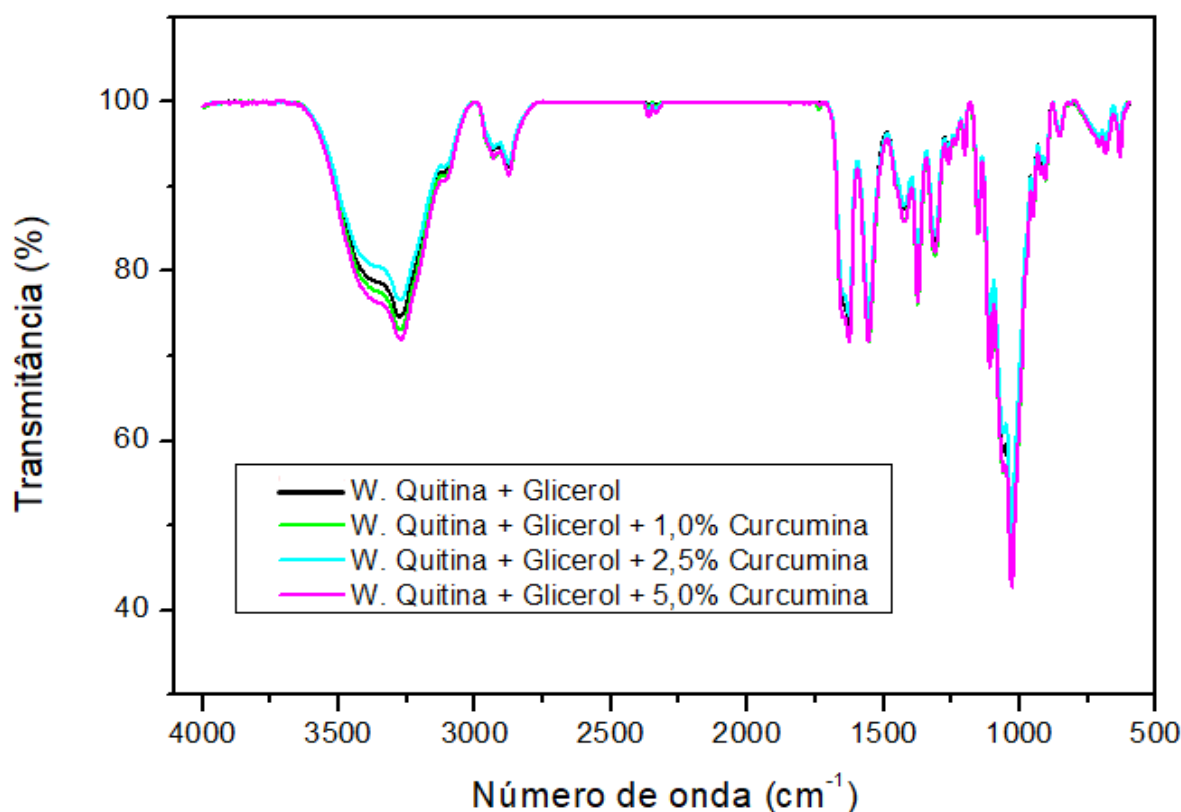


Fonte: Autoria própria.

4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de infravermelho de todas as membranas estão reunidos na Figura 10.

Figura 10: Espectro de infravermelho das membranas porosas.



Fonte: Autoria própria.

A banda apresentada entre 3300-3400 cm^{-1} pode corresponder a deformação das ligações -OH presentes na quitina e no glicerol, e também a ligação -OH do fenol presente na curcumina (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

A seguinte banda perto de 3000 cm^{-1} temos a deformação axial de C-H que está presente em todos os componentes (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

As bandas representadas de 1600-1700 cm^{-1} podem representar a deformação das ligações dos grupos carbonilas presentes tanto na quitina (amida) como na curcumina (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

Entre 1550-1450 cm^{-1} temos a deformação da ligação N-H presente na quitina (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

As bandas presentes entre 1470-1300 cm^{-1} são referentes às vibrações C=C do anel aromático presente na curcumina e também podem representar a elongação das ligações C-O presentes na quitina também. Neste intervalo podemos relacionar a deformação da ligação C-N (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

A deformação da função éter pode ser evidenciadas nas bandas entre 1000-1200 cm^{-1} . Essa função está presente na curcumina e na quitina (KIM et al., 2013; BISPO, MANSUS, MANSUR; 2009).

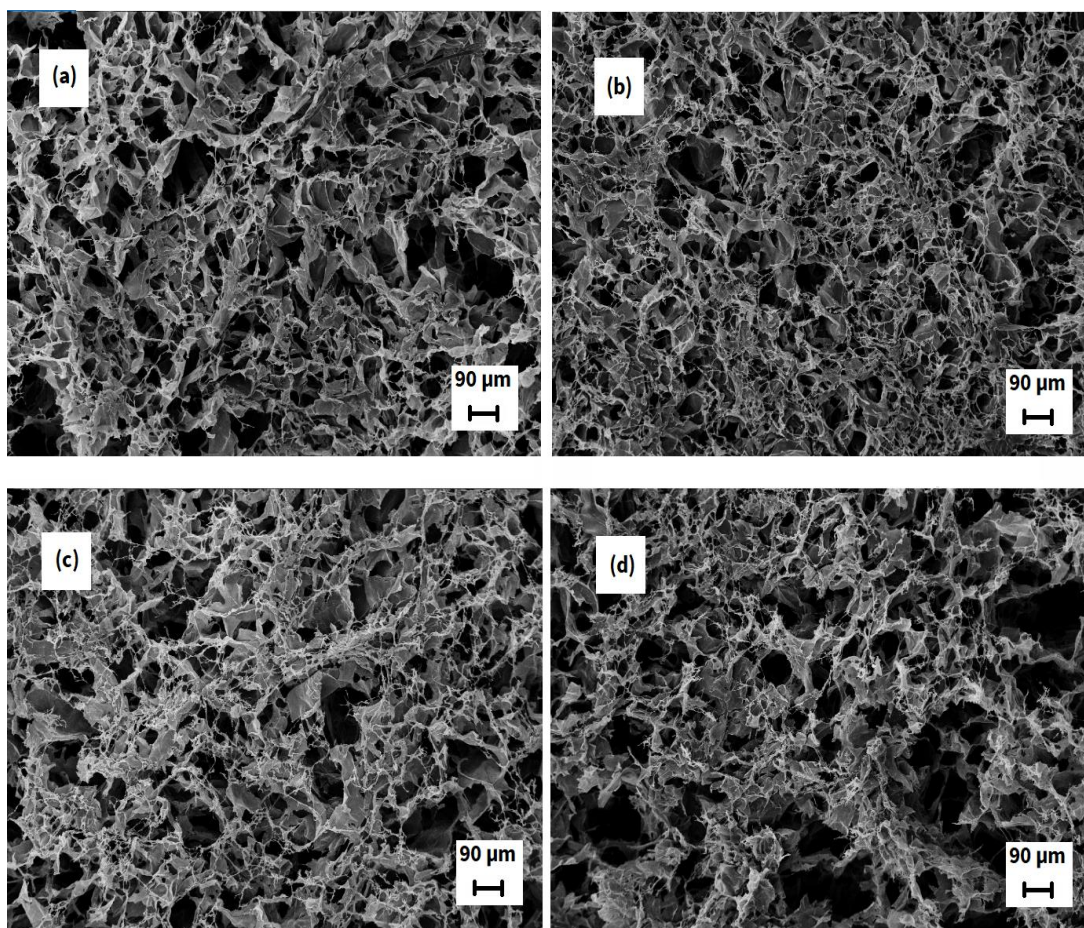
Como pode ser observado não há diferenças entre espectros de infravermelho. Isso é devido à similaridade das ligações que compõem os componentes das membranas, assim era esperado não haver diferença entre as amostras no infravermelho.

As bandas referentes a curcumina e ao glicerol não são evidenciadas, pois as bandas de beta-quitina se sobrepõem a essas e são muito intensas.

4.1.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das membranas porosas foi analisada e pode ser vista na Figura 11.

Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura das membranas. (a) Membrana de whisker de quitina + glicerol; (b) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 1,0% curcumina; (c) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 2,5% curcumina; (d) Membrana de whisker de quitina + glicerol + 5,0% curcumina.



Fonte: Autoria própria.

Comparando as morfologias das superfícies das membranas, pode ser observado que, aparentemente, a adição de curcumina não altera a estrutura dos poros nem sua distribuição na membrana. Assim, os poros continuam apresentando heterogeneidade de tamanho independentemente da adição e da quantidade de curcumina adicionada.

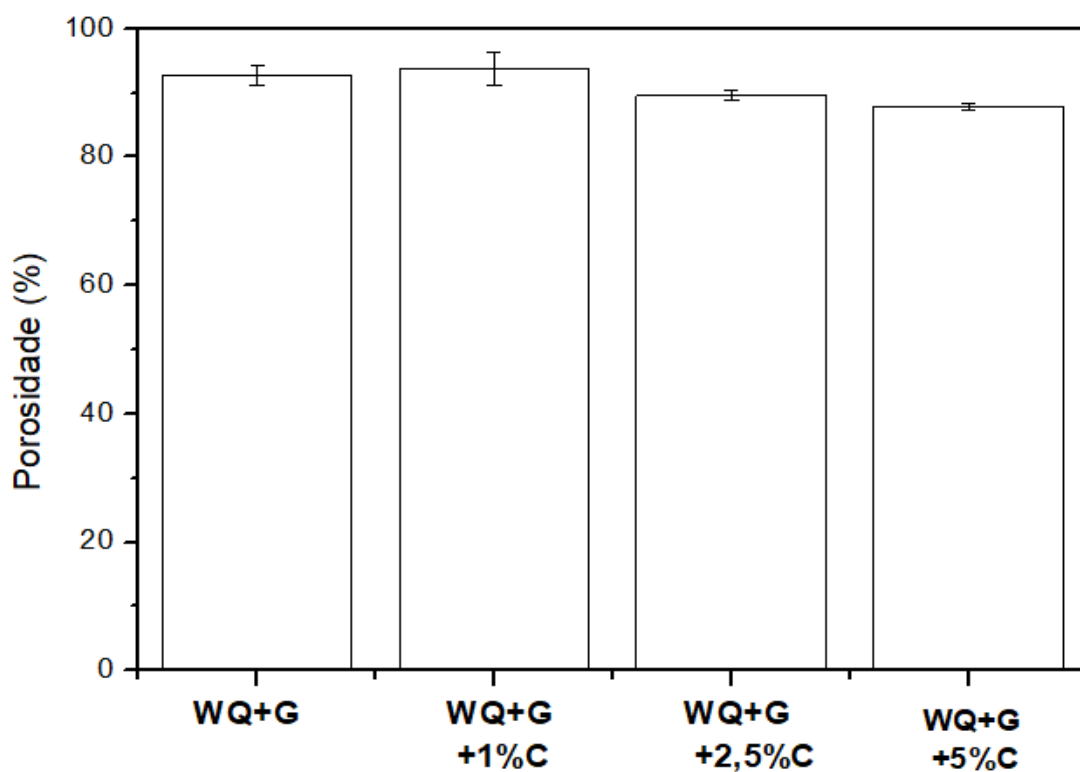
Como mencionado, a porosidade é uma característica essencial para a aplicação em engenharia de tecidos. Os poros proporcionam um ambiente propício para troca de gases e nutrientes com o meio, além de servir como meio de adesão e migração celular (sustentação) (CHOW, KHOR; 2000).

A existência de poros é evidenciada nas membranas, portanto a sua aplicação com curativos pode ser considerada nesse aspecto devido ao que foi citado acima. Nesse sentido, a porosidade das membranas foi estimada pelo método de deslocamento de líquidos, sendo os resultados obtidos apresentados e discutidas no próximo tópico.

4.1.3 Porosidade

Na figura 12 estão apresentados os dados referentes à porosidade média das membranas.

Figura 12: Porosidades das membranas porosas.



Fonte: Autoria própria.

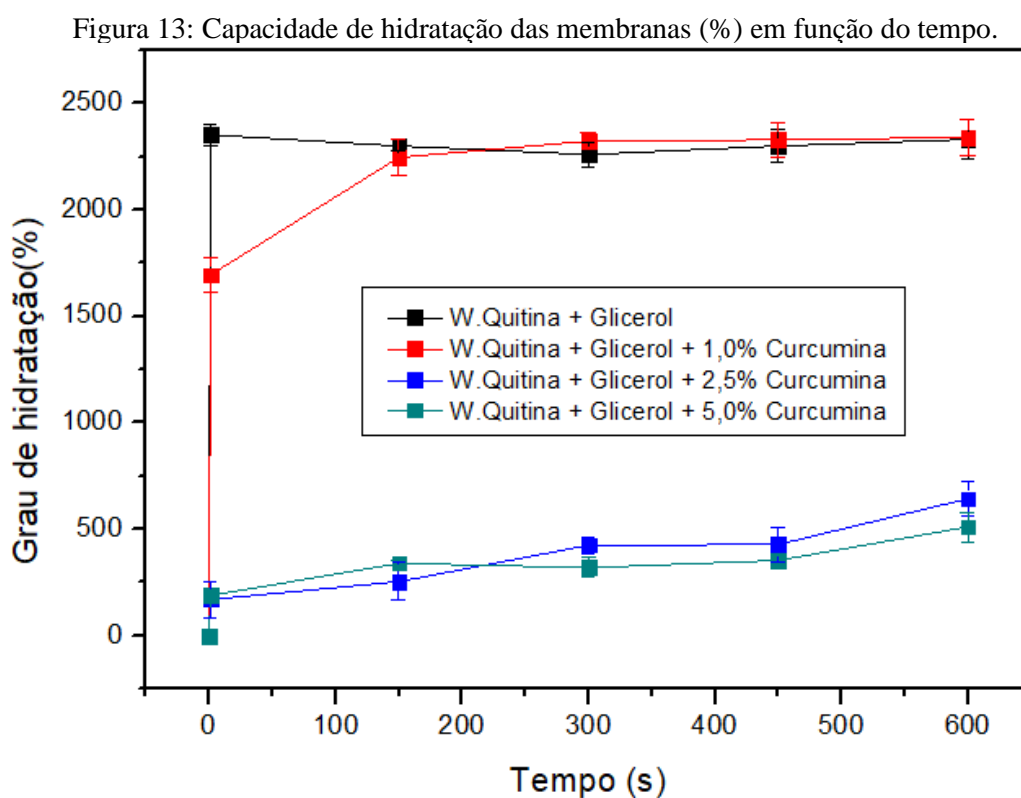
Os resultados obtidos mostram que as membranas possuem alta porosidade, sendo os valores próximos de 90%. Adicionalmente, as membranas obtidas não apresentaram diferença significativa nos valores de porosidade. A porosidade necessária de um curativo é dependente do tipo de lesão da pele considerada. Em geral uma porosidade adequada para curativos é de cerca de 80% ou mais, isso é mostrado em estudos anteriores (IKEDA et al.; 2014).

Considerando que a porosidade média das membranas produzidas está na faixa de 90%, temos que a aplicação como curativo é muito promissora em comparação com o ideal apresentado. Adicionalmente, a porosidade pode ser ajustada para valores desejados com a adição de curcumina na composição da membrana.

4.1.4 Capacidade de hidratação

Levando em consideração a aplicação como curativo, é necessário que as membranas absorvam o exsudado dos ferimentos. Assim a análise do grau de hidratação é de extrema importância, pois um ambiente úmido favorece a cicatrização de lesões. Manter o equilíbrio de umidade em ferimentos favorece a degradação do tecido morto e auxilia no crescimento de novos vasos sanguíneos (CHOW, KHOR; 2000)

Os resultados da análise do grau de hidratação em função do tempo estão abaixo na Figura 13.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados na Figura 12 revelam que a incorporação de curcumina nas concentrações 2,5 e 5 % resultou na redução da capacidade de hidratação das membranas. As membranas de *whiskers* de quitina com glicerol (WQ+G) e as membranas com 1 % de curcumina (WQ+G+1,0%) não apresentam diferença no grau de hidratação, ambos próximos a 2300%, ao passo que as formulações com 2,5% (WQ+G+2,5%C) e 5,0% (WQ+G+5,0%C) de curcumina a hidratação caiu para valores entre 600-500%. Esse comportamento pode ser atribuído ao caráter hidrofóbico da curcumina presente na matriz polimérica, o qual reduz a interação com o meio aquoso e, conseqüentemente, na menor capacidade de hidratação (KAEWNOPPARAT et al.; 2009).

Outro ponto relevante que foi observado nesta análise foi a estabilidade das membranas. Quanto menos curcumina em sua composição, as membranas se apresentavam menos estáveis em solução tampão (PBS) com pH 7,4. Por esse motivo a análise foi feita até 10 minutos em solução, devido a visível desintegração das membranas sem curcumina e com 1,0% de curcumina.

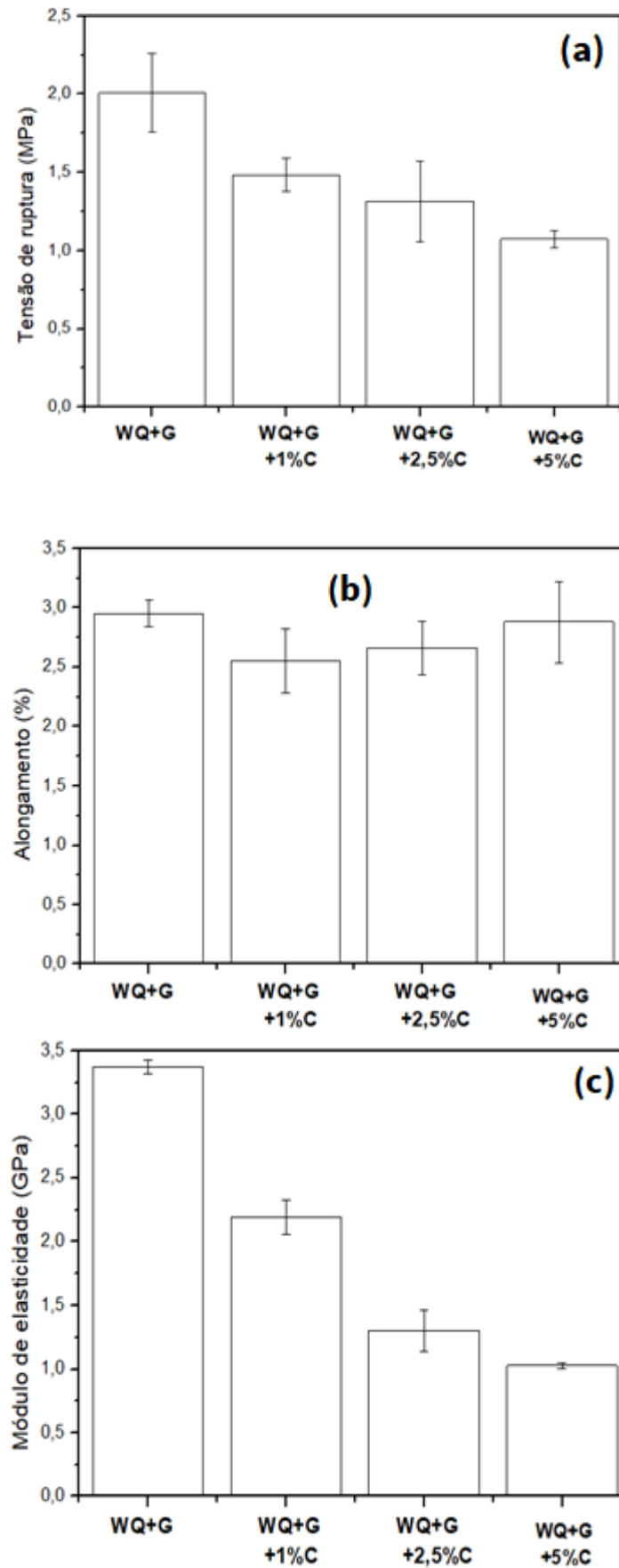
Com o que foi exposto temos que as membranas apresentam propriedades que qualificam seu potencial para a aplicação como curativo. E, além disso, conforme se aumenta a concentração de curcumina nas membranas menor é o grau de hidratação. Desse modo podem ser formuladas membranas que tenham grau de hidratação específicos conforme a necessidade.

4.1.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas são muito importantes para curativos, pois este tem que prover suporte para crescimento celular e sua proliferação, bem como resistir às tensões decorrentes da aplicação para a qual foram designados (IKEDA et al.; 2014).

Nesse contexto, as propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas através de ensaios de tração. Os resultados extraídos das curvas de tensão em função da deformação foram, a tensão na ruptura, alongamento e o módulo de elasticidade, sendo os valores obtidos apresentados nas Figuras 14 a, b e c, respectivamente.

Figura 14: Propriedades (a) Tensão de ruptura, (b) Alongamento e (c) Módulo de elasticidade.



Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado na Figura 14, aumento na concentração de curcumina levou à redução progressiva nos valores do módulo de elasticidade e de tensão na ruptura, ao passo que o alongamento na ruptura não foi afetado pela presença da curcumina. Esses resultados indicam que houve aumento da rigidez das membranas.

Uma hipótese que pode ser considerada é que a adição de curcumina nas membranas causou uma interação com os *whiskers* de uma maneira não desejada. As membranas se tronaram mais rígidas e frágeis, pode ser devido a aglomeração de *whiskers* ou mesmo de curcumina, esses aglomerados tendem a deixar o material mais suscetível a fratura.

Outra hipótese a ser considerada é que o caráter hidrofóbico da curcumina fez com que menos água seja absorvida pelas membranas, causando um aumento na rigidez do material.

Os valores de propriedades mecânicas para a pele humana variam muito dependendo de vários fatores como idade, sexo e região, mas é esperado valores de módulo de elasticidade de 0,42-20 MPa, de alongamento de 10%-115% e de tensão de ruptura de 2,5 a 30 MPa. (SUGIHARA et al.; 1991; PAILLER-MATTEI, BEC, ZAHOUANI; 2008; EDWARDS, MARKS; 1995).

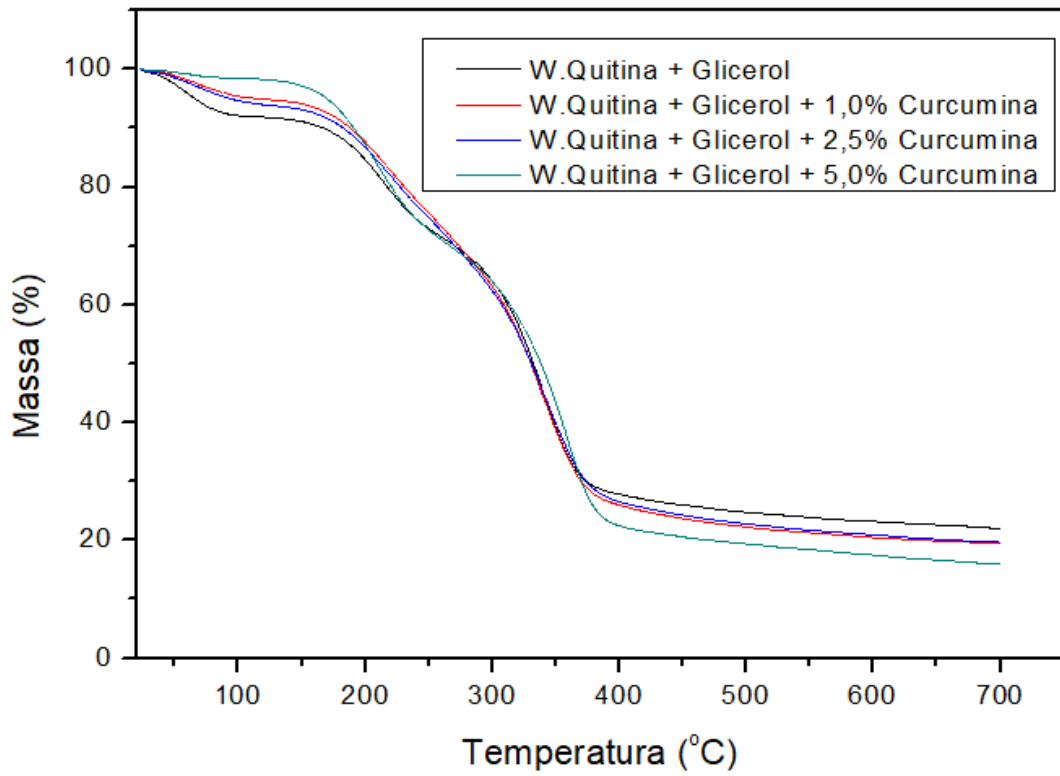
Para concluir comparando os valores encontrados com os esperados de um curativo temos que as membranas apresentam valores abaixo dos esperados. Comparando com os valores apresentados da pele temos um bom parâmetro para avaliar sua utilização com curativos.

Seria necessário reajustar as concentrações ou mesmo procurar outras alternativas para que as membranas desse trabalho apresentem propriedades mecânicas adequadas para que possam ser utilizadas como curativos.

4.1.6 Termogravimetria

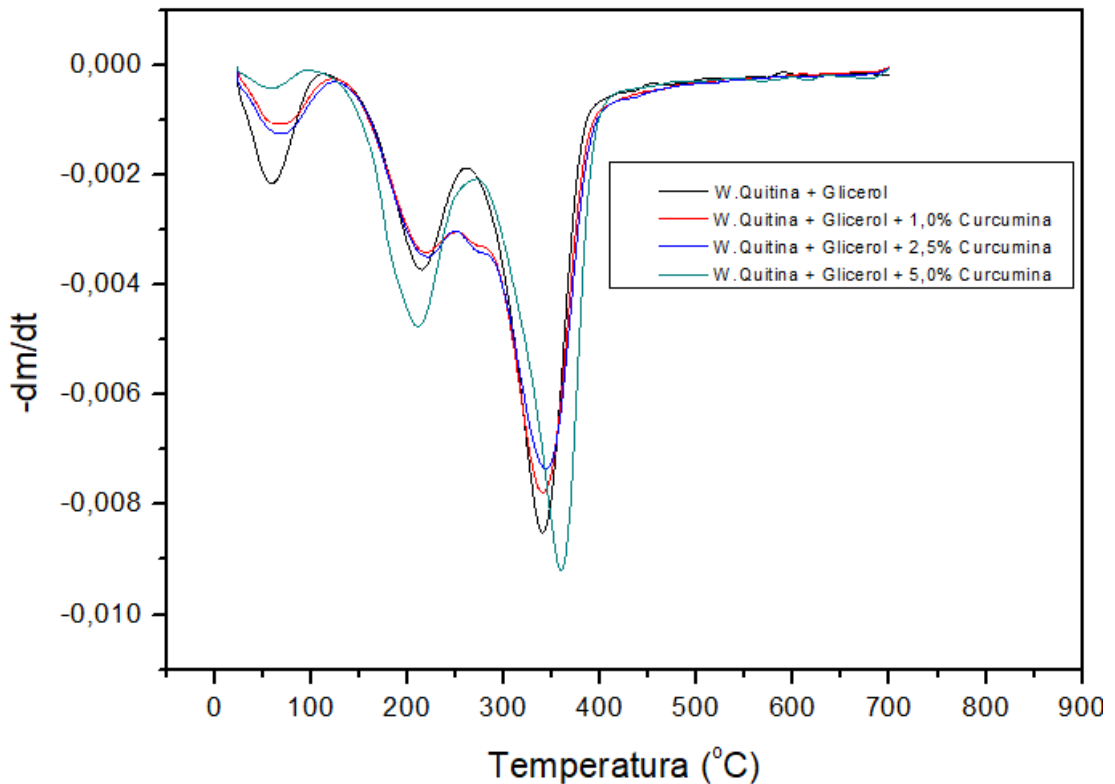
As curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivativa (DTG) das membranas porosas estão apresentadas nas Figura 15 e 16, respectivamente, sendo que todas apresentam três eventos térmicos principais, cujos dados estão listados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Figura 15: Curva de TG para as membranas porosas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 16: Curva de DTG para as membranas porosas.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1: Primeiro estágio de perda de massa.

| Amostra | Primeiro estágio | | |
|------------|------------------|-------------|----------------|
| | Faixa (°C) | Tonset (°C) | Δm (%) |
| WQ+G | 22-130 | 63 | 8,04 |
| WQ+G+1,0%C | 22-130 | 64 | 5,17 |
| WQ+G+2,5%C | 22-130 | 66 | 6,15 |
| WQ+G+5,0%C | 22-130 | 64 | 5,85 |

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2: Segundo estágio de perda de massa.

| Amostra | Segundo estágio | | |
|------------|-----------------|-------------|----------------|
| | Faixa (°C) | Tonset (°C) | Δm (%) |
| WQ+G | 150-250 | 214 | 19,04 |
| WQ+G+1,0%C | 150-250 | 217 | 19,54 |
| WQ+G+2,5%C | 150-250 | 219 | 19,12 |
| WQ+G+5,0%C | 150-250 | 214 | 21,38 |

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3: Terceiro estágio de perda de massa.

| Amostra | Primeiro estágio | | |
|------------|------------------|-------------|----------------|
| | Faixa (°C) | Tonset (°C) | Δm (%) |
| WQ+G | 300-500 | 340 | 46,96 |
| WQ+G+1,0%C | 300-500 | 339 | 49,87 |
| WQ+G+2,5%C | 300-500 | 343 | 50,61 |
| WQ+G+5,0%C | 300-500 | 350 | 52,2 |

Fonte: Autoria própria.

O primeiro evento ocorre no intervalo entre 22-130°C e corresponde à evaporação de água das membranas, sendo verificado que menor perda de massa nas membranas contendo curcumina, o pode ser atribuído ao caráter hidrofóbico desse composto natural e menor capacidade de adsorção de água das vizinhanças.

O segundo evento térmico ocorre entre 150-250°C e está associado à degradação do glicerol. Como esperado, as membranas não apresentaram diferença nos valores de perda de massa nesse evento devido ao fato de apresentarem o mesmo percentual de glicerol (SCHLEMMER, SALES, RESCK; 2010).

O terceiro evento térmico corresponde à degradação térmica da quitina e da curcumina, sendo constatado aumento no valor da Tonset e maior perda de massa nas amostras contendo maior percentual de curcumina, em função da menor estabilidade térmica desse composto (LACKKOWSKI, SOUSDALEFF; 2013).

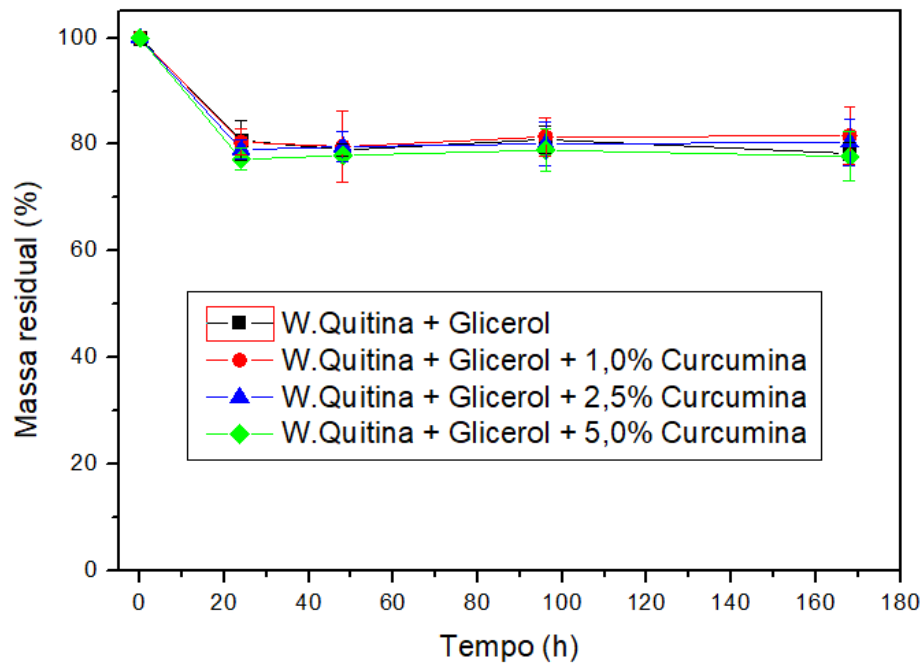
4.1.7 Degradação enzimática

Estudar a degradação do material em condições simuladas de aplicação, consiste em uma análise importante para avaliar o tempo de vida útil após aplicação no paciente. Neste estudo de degradação foi utilizado a lisozima, enzima que atua no mecanismo de defesa contra bactérias e é capaz de degradar materiais à base de quitina e quitosana. Essa enzima está presente nos fluidos corpóreos como saliva e lágrimas, além de estar em grande parte dos tecidos. Quando um tecido é lesionado e está na fase de inflamação, a concentração de lisozima

é aumentada para auxiliar na remoção de restos celulares e bacterianos (COSTA et al.; 2015; KIM et al.; 2013).

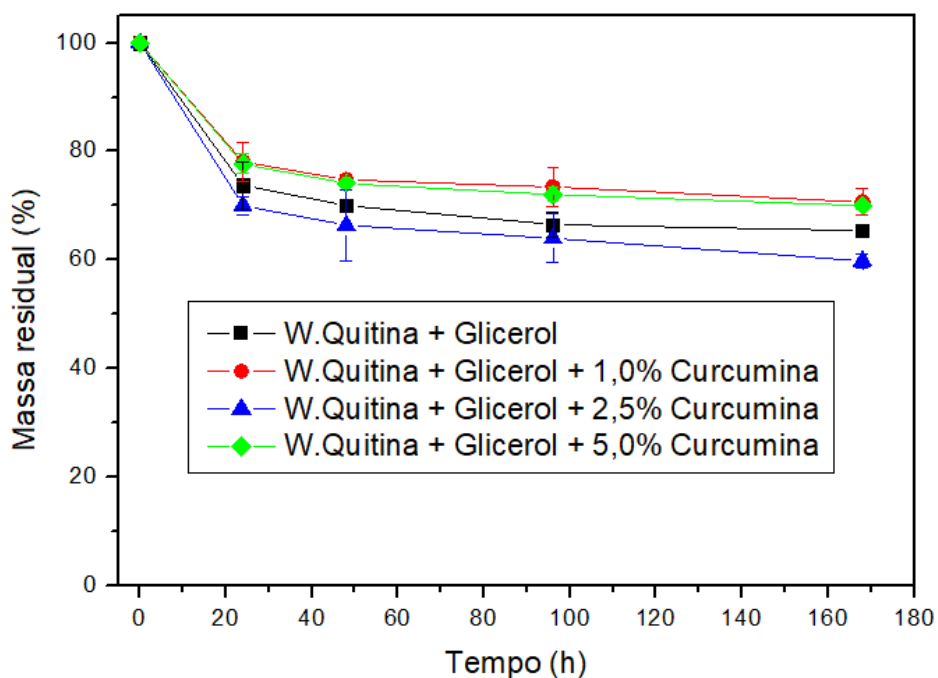
Nesse sentido foi avaliado a estabilidade das membranas na ausência e na presença de lisozima por período de 7 dias, sendo os resultados obtidos apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Figura 17: Massa residual das membranas incubadas em tampão PBS.



Fonte: Autoria própria.

Figura 18: Massa residual das membranas incubadas em tampão PBS e lisozima.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos desta análise revelam que na ausência de lisozima (Figura 17) não houve diferença significativa no perfil de perda de massa das membranas em função da composição, sendo que após 7 dias de análise a massa residual para todas as amostras foi de próxima a 80 %. A perda de massa semelhante pode ser devido a dissolução de parte do glicerol no tampão PBS, assim isso independe do teor de curcumina.

Por outro lado, o perfil de degradação das membranas alterou na presença de lisozima (Figura 18). Na Tabela 4 temos os valores de massa residual em comparação com 7 dias de incubação das amostras.

Tabela 4: Degradação das membranas após 7 dias de incubação.

| Amostra | Massa residual PBS (%) | Massa residual PBS (lisozima) (%) |
|------------|------------------------|-----------------------------------|
| WQ+G | 78,28±2,02 | 65,75±1,17 |
| WQ+G+1,0%C | 81,59±5,31 | 70,68±2,54 |
| WQ+G+2,5%C | 80,34±4,43 | 59,81±1,24 |
| WQ+G+5,0%C | 77,72±4,61 | 69,95±0,72 |

Fonte: Autoria própria.

As amostras contendo 1% e 5% de curcumina apresentaram massa residual próxima a 70 % após 7 dias de análise, ao passo que a amostra contendo 2,5 % de curcumina e amostra composta somente whiskers de quitina e glicerol apresentaram massa residual próxima de 60% e 65 %, respectivamente.

Na incubação com lisozima, a perda de massa devido a dissolução do glicerol se soma aquela devido à ação da lisozima, que promove a degradação da beta-quitina, gerando fragmentos solúveis. Assim podemos dizer que a curcumina provoca a inibição parcial da ação da lisozima.

Essa inibição parcial pode ser devido a dois fatores. O primeiro seria o aumento da hidrofobicidade do material, isso faz com que a interação com a lisozima seja menor e conseqüentemente menor a suscetibilidade à degradação. A segunda hipótese seria em relação a interação entre quitina e a curcumina, essa interação reduzirá a quantidade de sítios disponíveis para a ação da lisozima.

5 Conclusões

Todo o procedimento para a obtenção de membranas porosas à base de *whiskers* de quitina com glicerol e curcumina foi desenvolvido com sucesso. Assim fez-se necessário a avaliação das propriedades dessas membranas, características morfológicas e físico-químicas. Toda as análises foram para avaliar o efeito da adição de da concentração de curcumina nas membranas produzidas.

Para a caracterização dos *whiskers*, foi verificada sua concentração em suspensão, que foi de $34,67 \pm 0,17$ mg por grama de suspensão. Para a caracterização das membranas obtidas foram feitas análises de espectroscopia no infravermelho, propriedades mecânicas, capacidade de hidratação, porosidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e degradação enzimática empregando lisozima.

Os resultados apresentados até aqui mostram que a presença de curcumina resultou em membranas porosas com diferentes propriedades físico-químicas.

Morfologicamente (em relação a tamanho de poros, sua distribuição e forma) as membranas não apresentavam diferenças visíveis. Levando em conta a quantidade de poros nas membranas, temos valores muito próximos conforme o aumento de curcumina na membrana. Os resultados obtidos mostram que as membranas possuem alta porosidade, sendo os valores próximos de 90%.

Quanto ao grau de hidratação este foi muito afetado com a adição de curcuminas nas membranas. As membranas sem e com 1% de curcumina não apresentaram muita diferença, cerca de 2300% de grau de hidratação. Já as membranas de 2,5% e 5,0% apresentaram grau de hidratação entre 650-500%.

Em relação às propriedades mecânicas, a tensão de ruptura (MPa) sofre uma queda com a adição de curcumina na composição da membrana porosa. A queda foi de aproximadamente 1 MPa comparando a membranas sem curcumina ($2,01 \pm 0,25$ MPa) e as membranas com 5% de curcumina ($1,07 \pm 0,05$ MPa). O alongamento das membranas não sofre alteração com o acréscimo de curcumina nas membranas, os valores encontrados estão próximos de 3 %. Por fim, o módulo de elasticidade sofre uma queda com a adição de curcumina, de $3,37 \pm 0,05$ GPa (membrana sem curcumina) para $1,03 \pm 0,02$ GPa para as membranas com 5% de curcumina.

Os ensaios de suscetibilidade à degradação enzimática indicaram que as membranas contendo 1% e 5% de curcumina foram mais estáveis em meio aquoso na presença de lisozima, sendo os valores de massa residual após 7 dias de análise próximas a 70,0%, ao passo que a massa residual das membranas sem curcumina e com 2,5 % de carga apresentaram valores de

massa residual iguais a 65 % e 60 %, respectivamente. Apesar de ensaios biológicos adicionais que avaliem a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana serem necessários, os resultados obtidos no presente estudo indicam que as membranas produzidas apresentam potencial para serem utilizadas como curativos no tratamento de lesões de pele que liberam grande quantidade de exudado em função da elevada porosidade e capacidade desses materiais.

6 Perspectivas

Para dar continuidade no trabalho realizado até aqui e avaliar o uso das membranas produzidas como curativos, algumas análises são necessárias e de interesse para seu melhor entendimento e avaliação.

Algumas análises que podem ser realizadas:

- Estudo de liberação de curcumina;
- Estudo da citotoxicidade das membranas produzidas;
- Atividade antimicrobiana;
- Funcionalização das membranas.

7 Referências

- AKCELRUD, Leni. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. Editora Manole Ltda, 2007.
- ANAND, Preetha et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BEATRIZ, Adilson; ARAÚJO, Yara Jaqueline Kerber; LIMA, Dênis Pires de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.
- BIMONTE, Sabrina et al. Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 433, 2016.
- BISPO, Viviane M.; MANSUR, Alexandra AP; MANSUR, Herman S. Caracterização por espectroscopia de infravermelho de filmes de quitosana com diferentes quantidades de agente reticulante. **Foz do Iguaçu, PR, Brasil**, 2009.
- CALLAM, Christopher S. et al. Computational analysis of the potential energy surfaces of glycerol in the gas and aqueous phases: Effects of level of theory, basis set, and solvation on strongly intramolecularly hydrogen-bonded systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 47, p. 11743-11754, 2001.
- CALLISTER, William D. et al. **Materials science and engineering: an introduction**. New York: John wiley & sons, 2007.
- CAMPANA-FILHO, Sergio P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α -e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644, 2007.
- CHANG, Peter R. et al. Starch-based composites reinforced with novel chitin nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 80, n. 2, p. 420-425, 2010.
- CHAUSSARD, Géraldine; DOMARD, Alain. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 559-564, 2004.
- CHOW, Kok Sum; KHOR, Eugene. Novel fabrication of open-pore chitin matrixes. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 1, p. 61-67, 2000.
- COSTA, C. Z. et al. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 259-267, 2015.

DA SILVA, Gervásio Paulo; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

DUFRESNE, Alain. Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4111-4128, 2010.

DUMITRIU, Severian (Ed.). **Polymeric biomaterials, revised and expanded**. Crc Press, 2001.

DUTTA, Pradip Kumar; RAVIKUMAR, M. N. V.; DUTTA, Joydeep. Chitin and chitosan for versatile applications. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, v. 42, n. 3, p. 307-354, 2002.

EDWARDS, Christopher; MARKS, Ronald. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375-380, 1995.

ENCICLOPÉDIA Britânica. São Paulo: Encyclopaedia Britannica do Brasil, 2010.

FIAMINGO, Anderson; CAMPANA-FILHO, Sergio Paulo. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate polymers**, v. 143, p. 155-163, 2016.

FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European journal of Pharmaceutics and BioPharmaceutics**, v. 45, n. 3, p. 221-229, 1998.

GOPALAN NAIR, Kalaprasad; DUFRESNE, Alain. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 657-665, 2003.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta materialia**, v. 48, n. 1, p. 263-277, 2000.

GRIFFITH, Linda G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 961, n. 1, p. 83-95, 2002.

GUPTA, Neal S. (Ed.). **Chitin: formation and diagenesis**. Springer Science & Business Media, 2010.

HOLZAPFEL, Boris Michael et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

IKEDA, Takeshi et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

JAYAKUMAR, Rangasamy et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate polymers*, v. 82, n. 2, p. 227-232, 2010.

JAYARAMA REDDY, Venugopal et al. Nanofibrous structured biomimetic strategies for skin tissue regeneration. **Wound Repair and regeneration**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2013.

JOÃO, Carlos FC et al. Bio-inspired production of chitosan/chitin films from liquid crystalline suspensions. **Carbohydrate polymers**, v. 155, p. 372-381, 2017.

KAEWNOPPARAT, Nattha et al. Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. **World academy of science, engineering and technology**, v. 55, p. 229-234, 2009.

KANT, Vinay et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 322-330, 2014.

KIM, Hee-Je et al. Curcumin dye extracted from *Curcuma longa* L. used as sensitizers for efficient dye-sensitized solar cells. **International Journal of electrochemical science**, v. 8, n. 6, p. 8320-8328, 2013.

KORRAPATI, Purna Sai et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 747-765, 2016.

LACZKOWSKI, I.; SOUSDALEFF, M. Microencapsulação de curcumina com maltodextrina, avaliação da estabilidade e aplicação em alimentos. **Memories: VIII Encontro de Produção Científica e Tecnológica, Campo Mourão-PR**, 2013.

LEUNG, Mandy HM; KEE, Tak W. Effective stabilization of curcumin by association to plasma proteins: human serum albumin and fibrinogen. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5773-5777, 2009.

MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; WALTER, N. M. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. **Nature**, v. 184, n. 4686, p. 632, 1959.

MARTIN, Ivan; WENDT, David; HEBERER, Michael. The role of bioreactors in tissue engineering. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2004.

MARTINI, Frederic H.; NATH, Judi L.; BARTHOLOMEW, Edwin F. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 2001. **Pentice Hall: New Jersey**, p. 538-557, 2015.

MINCEA, M.; NEGRULESCU, A.; OSTAFE, V. Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review. **Rev. Adv. Mater. Sci**, v. 30, n. 3, p. 225-242, 2012.

MIQUEL, J. et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 34, n. 1, p. 37-46, 2002.

MOGOȘANU, George Dan; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International journal of pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127-136, 2014.

MOHANDAS, Annapoorna et al. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. **Bioactive materials**, v. 3, n. 3, p. 267-277, 2018.

O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

PAGLIARO, Mario et al. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 24, p. 4434-4440, 2007.

PAGLIARO, Mario; ROSSI, Michele. **The future of glycerol**. 2008.

PAILLER-MATTEI, C.; BEC, S.; ZAHOUANI, H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. **Medical engineering & physics**, v. 30, n. 5, p. 599-606, 2008.

PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

RATNER, Buddy D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Elsevier, 2004, cap. History of Biomaterials.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROBERTS, George AF. **Chitin chemistry**. Macmillan International Higher Education, 1992.

SHEVCHENKO, Rostislav V.; JAMES, Stuart L.; JAMES, S. Elizabeth. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2009.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; THARANATHAN, R. N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1113-1122, 2007.

SUGIHARA, T. et al. The extensibility in human skin: variation according to age and site. **British journal of plastic surgery**, v. 44, n. 6, p. 418-422, 1991.

SUYATMA, Nugraha E. et al. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3950-3957, 2005.

TCHEMTCHOUA, Victor T. et al. Development of a chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3194-3204, 2011.

WANG, Feng et al. Quantitative determination of proteins based on strong fluorescence enhancement in curcumin-chitosan-proteins system. **Journal of fluorescence**, v. 22, n. 2, p. 615-622, 2012.

WANG, Mei et al. Hierarchical porous chitosan sponges as robust and recyclable adsorbents for anionic dye adsorption. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 18054, 2017.

WANG, Zhengxiang et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.

WIBOWO, Singgih et al. Surimi wash water treatment for protein recovery: effect of chitosan–alginate complex concentration and treatment time on protein adsorption. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 665-671, 2005.

ZENG, Jian-Bing et al. Chitin whiskers: An overview. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2011.