



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Compósito amido/melamina com extrato de *Bixa orellana* L. para  
aplicação biológica na cicatrização em feridas**

**Jairelda Sousa Rodrigues**

Tese de doutorado

Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

Orientador

**TERESINA-PI**

**2019**

**Jairelda Sousa Rodrigues**

**Compósito amido/melamina com extrato de *Bixa Orellana* L. para  
aplicação biológica na cicatrização em feridas**

Tese apresentada á Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia em Produtos Naturais.

Orientador Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.

**TERESINA**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

R696c Rodrigues, Jairelda Sousa.  
Compósito amido/melamina com extrato de *Bixa orellana*  
L. para aplicação biológica na cicatrização em feridas / Jairelda  
Sousa Rodrigues. — 2019.  
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade  
Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia  
(RENORBIO), Teresina, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior.”

1. Ciências biológicas – tecnologia. 2. *Bixa orellana* L. –  
propriedades cicatrizantes. I Título.

CDD: 660.6

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNA:** JAIRELDA SOUSA RODRIGUES

**TÍTULO DO PROJETO:** “Compósito amido/melamina com extrato de Bixa orellana L. para aplicação biológica na cicatrização em feridas.”

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

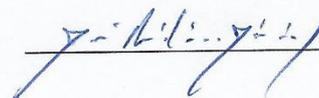
**BANCA EXAMINADORA:**

**CONCEITO**

**ASSINATURA**

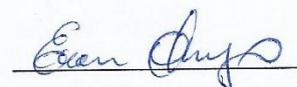
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI  
(Presidente)

SATISFATORIO



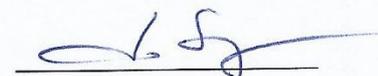
Prof. Dr. Everson Thiago Santos Gerônimo da Silva - UFPI  
(Examinador)

Satisfatório



Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes - UFPI  
(Examinador)

SATISFATORIO



Profa. Dra. Suely Moura Melo – FACID  
(Examinadora)

SATISFATORIO



Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho - UESPI  
(Examinador)

SATISFATORIO



**DATA DA AVALIAÇÃO:** 08 de Abril de 2019.

**HORÁRIO:** 14:00h

**LOCAL:** Auditório do Departamento de Química - UFPI

## Dedicatória

***À minha amada família:***

*Meus pais, José Afonso Rodrigues e Maria das Graças Torres de Sousa Rodrigues;  
Manoel Torres Gomes;*

*Gabriela Torres Sousa Rodrigues; Emanoele Torres Sousa Rodrigues  
Jaira Lúcia Sousa Rodrigues; Jairan Sousa Rodrigues;  
pelo amor incondicional e apoio na minha vida.*

***A vocês, o meu amor eterno.***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida. A quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior, pelo apoio e incentivo, pelo carinho e respeito e pela oportunidade para realização deste trabalho.

Ao amigo Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, pela amizade, presença, suporte e valiosa ajuda prestada na elaboração de experimentos.

Ao amigo Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana, pela valiosa colaboração e imenso desprendimento em ajudar na elaboração de experimentos.

À minha amiga Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosemarie Brandim, pelo apoio e contribuição para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao aluno Nicolas Davidson Sérvulo Rodrigues, pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

À minha amiga Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Suely Moura Melo, pela amizade e valiosa ajuda no desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr Charllyton Luis Sena Costa, pela assistência e preciosa colaboração

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Karinne Sousa de Araújo, pela valiosa orientação e colaboração.

À Direção da Facid-Wyden e UNIFSA pelo incentivo à qualificação profissional e apoio à pesquisa científica.

Aos funcionários do ponto focal UFPI, pela atenção e presteza.

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

**RODRIGUES, J. S.** Compósito amido/melamina com extrato de *Bixa Orellana* L. para aplicação biológica na cicatrização em feridas. 2019. 63 p. Tese orientada pelo prof. Dr., Santos Júnior, J. R. dos (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma fonte natural de corantes vermelhos, além da bixina, estão presentes nas suas sementes outros carotenóides, como a norbixina e o  $\beta$ -caroteno. O extrato de urucum tem sido empregado como anti-hemorrágico, expectorante, laxativo e cicatrizante. No presente trabalho foi desenvolvido um filme polimérico de amido/melamina com extrato de *Bixa orellana* L. adsorvido, para a ação biológica de cicatrização de feridas. Para este propósito, foram sintetizados compósitos com diversas relações de concentração de melamina e com diferentes extratos de urucum. Após a elaboração do filme foi realizado a caracterização por técnicas de UV, TG, DSC e MEV. O Filme caracterizado foi empregado em ação biológica, para ser um agente de cicatrização em feridas. O compósito amido/melamina com extrato de Bixa Orellana apresentou melhor ação que as bases poliméricas separadas, cola amilácia e resina melamina formaldeído. O filme (compósito) de amido/melamina e a cola amilácia apresentaram-se maleável, e a resina melamina formaldeído um material rígido e quebradiço com característica termorrígida o que foi observado nos resultados de Termogravimetria. A formação dos compósitos em diversas relações de concentração e adição de diferentes extratos a 10%, o que apresentou o melhor resultado foi o compósito amido/melamina com 1% de resina melamina. A análise ultravioleta- visível dos compósitos não mostrou as transições características de bixina/norbixina. Somente quando adsorveu o extrato neutralizado com NaOH pode-se observar as transições eletrônicas características do carotenóide. As análises de TG apresentam informações da composição amido melamina/bixina, com diferenciação em temperaturas acima de 350 °C. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram micrografias bem diferenciadas entre a cola amido e resina melamina, esta apresentou fortes tendências de estrutura termoplástica. Quando os compósitos foram aplicados na cicatrização, observou-se que todos os grupos tratados com compósito de extrato de urucum apresentaram diferença significativa comparados ao grupo controle negativo na análise macroscópica. Na análise histopatológica, no sétimo dia formou-se tecido de granulação imaturo com boa deposição de colágeno e processo de re-epitelização avançada nos compósitos. No decimo quarto dia, observou-se uma inflamação leve, caracterizada pela formação de tecido de granulação maduro. Após o vigésimo primeiro dia observou-se formação evoluída de fibrose evidente, onde ocorreu uma deposição de colágeno comparado com o grupo controle. Para o teste de micronúcleo os compósitos mostraram-se não citotóxico em aplicação in vivo. Os compósitos amido/melamina com extrato de urucum, revelaram-se agentes de cicatrização, com respostas que podem ser consideradas significativas na avaliação do tratamento de ação rápida, em feridas.

Palavras chaves: Compósito amido/melamina, *Bixa orellana* L., cicatrização

**RODRIGUES, J. S.** Starch / melamine composite with extract of *Bixa orellana* L. for biological application in wound healing. 2019. 63 p. Thesis oriented by MSc.PhD. Jose Ribeiro dos Santos Junior (Doctorate in Biotechnology) - Federal University of Piauí, Teresina, 2019.

## **ABSTRACT**

Urucum (*Bixa orellana* L.) is a natural source of red dyes, in addition to bixin, other carotenoids such as norbixin and  $\beta$ -carotene are present in its seeds. Urucum extract has been used as anti-hemorrhagic, expectorant, laxative and cicatrizant. In the present work a polymeric starch / melamine film with extract of *Bixa orellana* L. adsorbed for the biological action of wound healing was developed. For this purpose, composites with different concentrations of melamine and different extracts of urucum were synthesized. After the elaboration of the film, the characterization was performed by UV, TG, DSC and MEV techniques. The featured film was used in biological action to be a wound healing agent. The composite starch / melamine with *Bixa Orellana* extract presented better action than the separated polymer bases, glue amylocia and resin melamine formaldehyde. The starch / melamine (composite) film and the amylocea glue were malleable, and the melamine formaldehyde resin was a rigid and brittle material with a thermosetting characteristic which was observed in the results of Thermogravimetry. The formation of the composites in various concentration ratios and addition of different extracts at 10%, which presented the best result was the starch / melamine composite with 1% melamine resin. Ultraviolet-visible analysis of the composites did not show the transitions characteristic of bixin / norbixin. Only when adsorbed the extract neutralized with NaOH can observe the characteristic electronic transitions of the carotenoid. The TG analyzes present information on the composition melamine / bixin starch, with differentiation at temperatures above 350 °C. The Scanning Electron Microscopy analyzes showed very different micrographs between the starch glue and the melamine resin, which presented strong trends of thermoplastic structure. When the composites were applied in the healing, it was observed that all groups treated with urucum extract composite presented significant difference compared to the negative control group in the macroscopic analysis. In the histopathological analysis, on the seventh day, immature granulation tissue was formed with good collagen deposition and advanced re-epithelization in the composites. On day fourteenth, mild inflammation was observed, characterized by the formation of mature granulation tissue. For the micronucleus test the composites were non-cytotoxic in application in vivo. The starch / melamine composites with urucum extract were shown to be healing agents, with responses that may be considered significant in the evaluation of fast acting wound treatment. After the twenty-first day an evolved formation of evident fibrosis was observed, where a deposition of collagen occurred compared to the control group.

Keywords: Starch / melamine composite, *Bixa orellana* L., healing

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Etapa do processo de cicatrização de feridas	20
<b>Figura 2</b>	Estrutura química dos pigmentos de Bixina e Norbixina	23
<b>Figura 3</b>	Equação química de saponificação da Bixina	25
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da Amilose e Amilopectina	26
<b>Figura 5</b>	Gelatinização do amido	28
<b>Figura 6</b>	Equação química da reação de obtenção das resinas de melamina.	29
<b>Figura 7</b>	Extração com solvente orgânico em aparelhagem Soxhlet e recuperação do solvente. (A) Extração contínua das sementes de urucum por 6 horas; (B) Evaporação de solvente por evaporador rotativo e concentração do extrato de urucum.	32
<b>Figura 8</b>	Processo de extração da norbixina pela saponificação das sementes de urucum (A) semente urucum em solução NaOH 5% por 30 min; (B) filtração das sementes; (C) Adição de HCl concentrado até obter pH 4; (D) filtração a vácuo e seca a temperatura de 50°C.	33
<b>Figura 9</b>	Processo de obtenção da cola de amido, (A) mistura homogênea de amido e água em agitação e aquecimento á 60°C; (B) mistura aquosa de amido sob agitação constante até ficar gelatinoso; (C) moldado em placa e seco em temperatura de 40°C.	34
<b>Figura 10</b>	Processo de obtenção da resina melamina- formaldeído (MF) (A) mistura de Melamina e formol sob aquecimento a 60°C; (B) mistura em agitação constante até ficar transparente; (C) moldado em placa e seco a temperatura ambiente.	35
<b>Figura 11</b>	Formação do compósito amido/ melamina/ extrato urucum (A) cola de amido; (B) Resina de melamina 1%; (C) Extrato de urucum a 10% e (D) adicionado em placa e seco.	36
<b>Figura 12</b>	Fluxograma da caracterização do compósito	37
<b>Figura 13</b>	Esquema para o experimento de cicatrização de pele	39
<b>Figura 14</b>	Etapas do preparo cirúrgico para cicatrização de pele	40

<b>Figura 15</b>	Ilustração da análise macroscópica da área lesionada. A área da ferida foi avaliada 0, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia (A, B, C, D) respectivamente.	41
<b>Figura 16</b>	Sequencia ilustrativa da avaliação microscópica da lamina:(A) Remoção do tecido; (B) peça cirúrgica colocada em formol a 10%; (C) realizou colorações histológicas por HE; (D) Leitura em Microscópio Óptico e (E) Lâmina coradas.	42
<b>Figura 17</b>	Representação ilustrativa para o teste de micronúcleo.	44
<b>Figura 18</b>	Espectros de UV-Vis (—) para compósito amido/melamina (R), (—) polímero amido/melamina com extrato de ácido acético urucum (RAC) e (—) polímero amido/melamina com extrato alcoólico de urucum (RAL). (D) extrato de ácido acético urucum (—), extrato etanol de urucum (—) e norbixina extraída do urucum (—).	46
<b>Figura 19</b>	Curvas de TGA (—) para compósito amido/melamina 1%(R1), (—) polímero amido/melamina 1% com extrato de ácido acético urucum (R1AC) e (—) polímero amido/melamina 1% com extrato alcoólico de urucum (R1AL). A temperatura de 25 a 600°C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera oxidante (Ar)	49
<b>Figura 20</b>	Curvas de TGA (—) para compósito amido/melamina 2 e 3%(R2 e R3), (—) polímero amido/melamina 2 e 3% com extrato de ácido acético urucum (R2AC e R3AC) e (—) polímero amido/melamina 2 e 3% com extrato alcoólico de urucum (R2AL e R3AL). A temperatura de 25 a 1000°C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera oxidante (Ar)	50
<b>Figura 21</b>	Curvas de DSC (—) para compósito amido/melamina 1%(R1), (—) polímero amido/melamina 1% com extrato de ácido acético urucum (R1AC) e (—) polímero amido/melamina 1% com extrato alcoólico de urucum (R1AL).	51
<b>Figura 22</b>	Micrografia da cola de amido (A) e resina melamina (B) com aumento de 500x.	52

<b>Figura 23</b>	Micrografia do compósito Amido a 1% melamina (R1) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).	53
<b>Figura 24</b>	Micrografia do compósito Amido a 1% melamina em extrato etanólico de urucum (R1AL) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).	53
<b>Figura 25</b>	Micrografia do compósito Amido a 1% melamina em extrato ácido acético em urucum (R1AC) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).	54
<b>Figura 26</b>	Micrografia do compósito Amido a 1% melamina em norbixina (R1N) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).	55
<b>Figura 27</b>	Resultados micronúcleo agudo, em camundongos com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).	56
<b>Figura 28</b>	Resultados micronúcleo crônico, em camundongos com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).	56
<b>Figura 29</b>	Resultados macroscópicos observados no 7º dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC10). Os resultados foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão comparados ao grupo controle negativo.	57
<b>Figura 30</b>	Resultados histológico observados no 7º dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).	58
<b>Figura 31</b>	Resultados macroscópicos observados no 14º dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). Os resultados foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão comparados ao grupo controle negativo.	59

- Figura 32** Resultados histológico observados no 14<sup>o</sup> dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). 59
- Figura 33** Resultados macroscópicos observados no 21<sup>o</sup> dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC10). Os resultados foram expressos em médias±desvio padrão comparados ao grupo controle negativo. 56
- Figura 34** Resultados histológico observados no 21<sup>o</sup> dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). 56

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CCS	Centro de Ciência Saúde
Gc	Grupo Controle
Gcp	Grupo compósito
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FACIME	Faculdade De Ciências Médicas
HE	Hematoxilina-Eosina
LACE	Laboratório de Cirurgia Experimental
LDL	Lipoproteína de baixa densidade.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
R1	Compósito amido/melamina a 1%
R1AL	Compósito amido/melamina 1% com extrato etanólico de urucum
R1AC	Compósito amido/melamina 1% com extrato ácido acético de urucum
R1N	Compósito amido/melamina 1% com norbixina
TGA	Análise Termogravimétrica
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
2.	REVISÃO LITERATURA.....	19
2.1.	Ferida.....	19
2.2.	Processo de cicatrização.....	19
2.3.	Urucum ( <i>Bixa orellana</i> L.....	21
2.4.	Bixina e norbixina.....	22
2.5.	Amido.....	26
2.6.	Resina Melamina- formol (MF).....	28
3.	OBJETIVO.....	26
3.1.	Geral.....	31
3.2.	Objetivo Especifico.....	31
4.	METODOLOGIA.....	31
4.1.	Obtenção das sementes <i>Bixa orellana</i> L.....	32
4.2.	Obtenção de extratos a partir das sementes de urucum.....	32
4.2.1.	Método 1.....	32
4.2.2.	Método 2.....	33
4.3.	Síntese polímero .....	34
4.3.1.	Polímero amido (cola).....	34
4.3.2.	Resina melamina .....	34
4.3.3.	Síntese dos compósitos .....	35
4.4.	Análise físico-química .....	37
4.4.1.	Análise por Ultravioleta- visível.....	37
4.4.2.	Análise termogravimétrica .....	37
4.4.3.	Análise Calorimetria Exploratória Diferencial.....	38
4.4.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	38
4.5.	Atividade farmacológica .....	38
4.5.1.	Os animais e aspectos éticos .....	38
4.5.2.	Grupo experimental.....	39
4.5.3.	Procedimento cirúrgico experimental.....	39
4.5.4.	Avaliação macroscópica.....	41
4.5.5.	Avaliação microscópica.....	42
4.5.6.	Análise estatística.....	43
3.6.	Teste de micronúcleo.....	43
3.6.1.	Processamento, confecção da lâmina e coloração final.....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1.	Caracterização físico-química.....	46
5.2.	Caracterização térmica.....	48
5.3.	Caracterização morfológica.....	52
5.4.	Avaliação genotóxica.....	55
5.5.	Avaliação da cicatrização.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	62
7.	Referencias .....	63
8.	Apêndice.....	74

## 1. INTRODUÇÃO

As feridas são consequências de uma agressão por um agente ao tecido vivo, podendo ser classificadas, de várias maneiras pelo agente causal do tipo incisas ou cortantes provocados por agentes cortantes. Após ocorrer a lesão a um tecido, imediatamente iniciam-se fenômenos dinâmicos conhecidos como cicatrização, que é uma sequência de respostas dos mais variados tipos de células (epiteliais, inflamatórias, plaquetas e fibroblastos), que interagem para o restabelecimento da integridade dos tecidos. (BALBINO et al., 2005)

A cicatrização é um dos procedimentos mais avaliados, devido complexidade nas etapas e a importância de sua estimulação na recuperação funcional do paciente. A cicatrização das feridas ocorre uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos descritos como inflamação (fase exudativa), reconstrução (fase proliferativa), epitelização (fase regenerativa) e maturação. No decorrer do tempo, o homem sempre utilizou recursos com a função de acelerar o processo cicatricial através do uso de substâncias ou procedimentos (GARROS, 2006).

Vários materiais poliméricos de origem sintética e natural são utilizados, com a finalidade de acelerar a cicatrização em feridas, por apresentarem cinética de degradação conhecida e podem ser sintetizados de forma controlada e reprodutível. Os polímeros sintéticos geralmente não apresentam grupos químicos favoráveis para interação celular e podem ainda liberar subprodutos tóxicos na corrente sanguínea durante sua degradação, o que poderia desencadear reações inflamatórias no paciente ao longo de sua utilização. Para minimizar esse efeito o presente trabalho desenvolveu um filme polimérico a partir do amido com a resina de melamina/formaldeído, incorporado com extrato de urucum para otimizar o processo de cicatrização.

O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza, apresenta-se na forma de grânulos com formato e tamanho dependentes da sua fonte botânica. Em função das suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, os carboidratos possuem grande importância nos mais diversos setores industriais (ROCHA et al., 2008).

Os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, sendo a transição entre elas gradual. A região cristalina é constituída de cadeias laterais da amilopectina, enquanto que os pontos de ramificação e a amilose são os principais componentes das regiões amorfas (PARKER; RING, 2001). A interação entre os componentes das regiões cristalinas e amorfas é influenciada pela razão entre amilose e amilopectina, e pelas características desses polímeros em termos de peso e distribuição molecular e grau e tamanho das ramificações. As cadeias do amido após polimerização, formam filmes muito finos e quebradiço e de fácil solubilização, ocorrendo a necessidade de incorporação de agente impermeável (HOOVER, 2001).

A melamina é uma substancia fracamente alcalina que pode ser hidrolisado em ácido forte ou soluções alcalinas. Desta maneira, a extração pode ser realizada em condições neutras, ácidas ou básicas, entretanto, as extrações ácidas e neutras são de uso mais comum. Suas principais aplicações incluem adesivos para madeira, resinas para têxteis e papel, tinta, vernizes e pó de moldagem, largamente empregado em artigos domésticos. Possui características termoplásticas.

O urucum (*Bixa orellana L.*), é um arbusto tropical, amplamente utilizado como corante nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, de tintas e vernizes. Suas sementes, possuem carotenoides entre a bixina e norbixina onde a maior concentração é a bixina, que compreende mais de 80% dos carotenoides totais, é lipossolúvel e, portanto, sujeita a extração com alguns solventes orgânicos. Sua concentração varia de acordo com o tipo de cultivo, solo e clima (DORNELAS, 2010).

Dentre os principais compostos do urucum estão os compostos fenólicos e os carotenoides e por vezes estão envolvidos com a atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular, podendo agir de modo preventivo contra cânceres, problemas cardiovasculares e envelhecimento (SANTOS et al., 2014)

Esse trabalho, tem como objetivo a confecção de um filme polimérico de amido/melamina com extrato de *Bixa Orellana L.* adsorvido. Inicialmente foi realizada a obtenção de extratos das sementes de urucum (*Bixa orellana*) em diferentes solventes. Posteriormente a formação dos compósitos em diversas

relações de concentração, em seguida a construção dos filmes de compósitos com diferentes concentrações dos extratos. Após a elaboração do filme foi realizada a caracterização por técnicas de UV, TG, DSC e MEV, e sua em animais para verificar ação biológica na cicatrização em feridas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ferida**

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela consiste em duas camadas histológicas de origens diferentes, que se encontram firmemente aderidas uma à outra: a epiderme e a derme (JUNQUEIRA, 2014).

As feridas ocorrem após de uma lesão tecidual, induzidas por traumatismo ou por procedimentos cirúrgicos. A cicatrização inicia como resposta tecidual às lesões. Após ocorrer a lesão a um tecido, imediatamente iniciam-se fenômenos dinâmicos conhecidos como cicatrização, que constitui conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, que envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação. (CLARK, 1995; AMADEU, 2008).

Em feridas superficiais, há proliferação das células da camada basal da epiderme, que produzem um epitélio em baixo da crosta. Então, os fibroblastos, produtores de colágeno, multiplicam-se garantindo força e suporte ao novo tecido. Em feridas profundas, o tecido de granulação é produzido em maiores quantidades e move-se a partir das bordas da lesão, iniciando a contração, com atuação dos miofibroblastos e preenchendo o espaço (ROCHA JUNIOR et al., 2006).

Os principais mediadores que atuam no processo cicatricial são os fatores de crescimento, que são proteínas que se ligam aos receptores da superfície celular, ativando a proliferação e/ou diferenciação celular. Muitos fatores de crescimento são versáteis, estimulando a divisão celular em diferentes tipos de células, enquanto outros são específicos para um tipo particular de célula. Estes processos, muitas vezes, são básicos no funcionamento da célula, tais como: angiogênese, mitogênese, transcrição genética, entre outros (BALBINO et al., 2005).

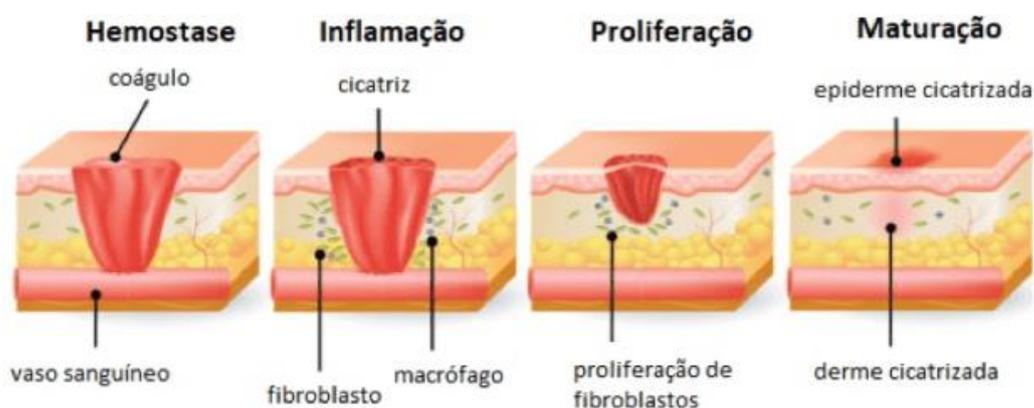
### **2.2 Processo de cicatrização**

A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. Há, inicialmente, a instalação de uma reação inflamatória cujo exsudato de células fagocitárias reabsorve o sangue

extravasado e os da proliferação fibroblástica e endotelial que formam o tecido conjuntivo cicatricial. Posteriormente, o tecido cicatricial sofre remodelação, que resulta em diminuição do volume cicatricial, podendo chegar até seu desaparecimento (PARENTE et al., 2009).

De acordo com a literatura, a cicatrização é classificada como primeira, segunda ou terceira intenção. A cicatrização de primeira intenção, ocorre em ferimentos com perdas mínimas de tecidos e cujas bordas são aproximadas ou fechadas por sutura. A cicatrização de segunda intenção, ocorre quando as bordas da ferida não estão aproximadas, ou seja, não estão apostas, por perda tecidual, como em queimaduras ou em ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação. Nesse caso, o tecido de granulação preenche a ferida e está se contrai e “reepiteliza-se”. Já a cicatrização de terceira intenção (ou primária tardia), ocorre quando a ferida aberta, é fechada secundariamente, dias após a lesão, cicatrizando assim por primeira intenção tardia. (AMORIN, 2005; DANTAS, JORGE, 2005).

**FIGURA 1:** Etapa do processo de cicatrização de feridas



Fonte: <https://www.inovanewsroom.org/ilh/2017/05/wound-healing-center-at-inova-loudoun-treats-complex-wound-and-ostomy-cases/>

Para reparar um dano ocorrido na pele, o organismo sempre age da mesma maneira, passando pelas mesmas etapas, de coagulação, inflamação, reconstrução e contração (Figura 1). Na etapa inicial formação de coágulo pelas

plaquetas, com reforço dos eritrócitos e da fibrina. Há então a desidratação desse coágulo, que acaba funcionando como um protetor, uma tampa para a lesão (SAVIETO, SILVA, 2004). Em seguida a inflamação em 24h, migram neutrófilos e monócitos para as margens da lesão para ingerir bactérias e debris (fragmentos) celulares e liberar enzimas. Aparecem então os clássicos sinais de inflamação: calor, rubor, dor e edema, que facilitam a cicatrização (NOGUEIRA et al., 2005).

A reconstrução se caracteriza pelo desenvolvimento do tecido de granulação, que ocupa o espaço do coágulo. É um tecido conjuntivo frouxo, altamente capilarizado, com leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas e ácido hialurônico, com aparência granulosa, brilhante e vermelha (SAVIETO, SILVA, 2004). A atividade proliferativa vascular é seguida por fibroplasia e acúmulo de fibras colágenas produzidas pelos fibroblastos (ÁLVARES, 1972). A neovascularização (angiogênese) é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes no local da ferida, para que ocorra cicatrização adequada (CAMPOS et al., 2007)

### **2.3 Urucum (*Bixa orellana*)**

O urucuzeiro pertence à família *Bixaceae* possui o nome botânico de *Bixa orellana* L., originada da América Latina, sendo cultivado nos trópicos de todo o mundo, é uma planta perene, não sendo exigente quanto a solos, clima e tratos culturais (SILVA, 2006). É denominada popularmente de urucum ou urucu, no Brasil; “annatto” nos países de língua inglesa; “achiote” nos de língua espanhola; e “roucou” nos países de língua francesa (SANDI, CUEN e BACERRA, 2003).

Dependendo da região de cultivo e da idade da planta, apresenta-se como um arbusto perene grande ou como uma árvore pequena, variando de 2 a 5 metros de altura. A planta exibe grande variabilidade de coloração, com caule, frutos verdes e flores brancas ou caule vermelho, flores rosas e frutos vermelho-escuro (MOREIRA, 2013).

Os frutos são do tipo cápsula ou cachopa, ovoides ou globosos, com 2 a 3 carpelos que variam de 3 a 4 cm de comprimento e 3 a 4,5 cm de diâmetro. Externamente, são revestidos por espinhos moles e possuem coloração variável

entre o verde, vermelho-pálido e roxo. No interior, estão normalmente divididos em duas valvas com um conteúdo de 10 a 50 grãos de sementes (DORNELAS, 2010).

Os grãos são arredondados, revestidos por uma camada pastosa de coloração avermelhada, os quais tornam-se secos, duros e de coloração escura com o amadurecimento. Apresentam diâmetro médio de 0,4 cm. A bixina é o pigmento presente em maior concentração nos grãos, representando mais de 80% dos carotenoides totais do urucum, lipossolúvel e sujeita à extração com alguns solventes orgânicos (FRANCO *et al.*, 2002).

Segundo Oliveira (2005), a composição da semente de urucum apresenta a seguinte distribuição: 40 a 45 % de celulose; 3,5 a 5,5 % de açúcares; 0,3 % a 0,9 % de óleo essencial; 3 % de óleo fixo; 1,0 % a 4,5 % de pigmento; 13 % a 16 % de proteína, como também alfa e beta caroteno além de taninos e saponinas. Apresentam ainda 17,5 % de lipídeos na forma de ácido linolênico,  $\alpha$ -linoléico e oleico e 10,6 % de aminoácidos. As cinzas (5,4 %) apresentaram alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, com reduzido teor de cálcio.

Os extratos de urucum estão sendo empregado na medicina popular, como anti-hemorragico, expectorante na forma de xarope e para gargarejos, como laxativo, estomáquico, cicatrizante e contra dispepsia (LIMA et al, 2001), além de possuir potencial antimicrobiano. As folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago, doenças coronarianas, intestino, afecções respiratórias e urinárias, e também como afrodisíacas (COELHO et al, 2003). Já as sementes secas também são utilizadas em tratamento de doenças hepáticas, tuberculose, de problemas na pele, como antipirética e anti-inflamatória (LIMA et al, 2001).

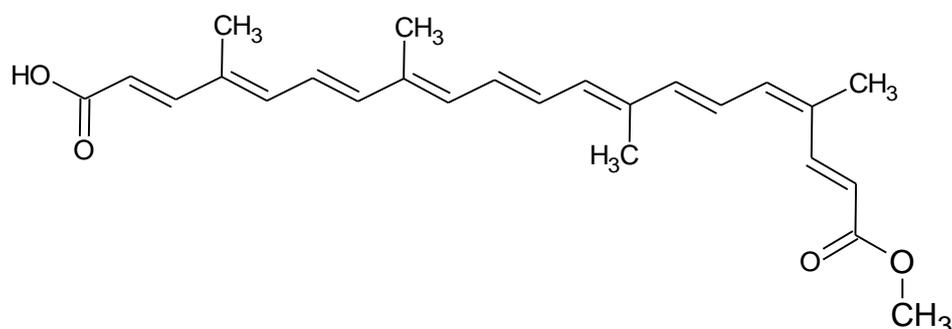
## **2.4 Bixina e norbixina**

O pigmento natural da semente do urucum (*Bixa orellana* L.) é a bixina representando mais de 80% dos carotenoides presentes. A partir dela, são obtidos os demais pigmentos, como norbixina, sal de norbixina e produtos de degradação térmica (BARETH; STROHMAR; KITZELMANN, 2002; KOUL, KOUL; TIKOO, 2003; BAUTISTA et al., 2004). A bixina, é um carotenóide de cor vermelha obtido pela extração da semente do urucum, é empregada como

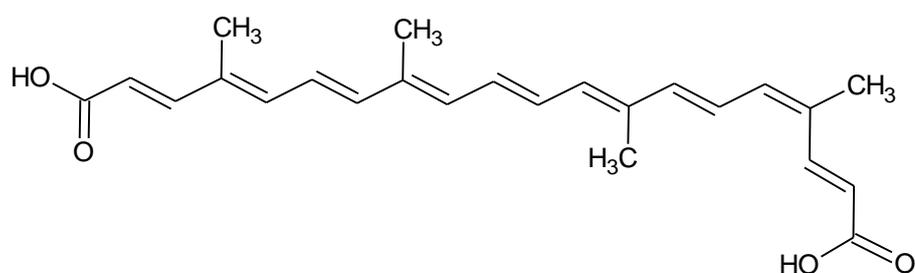
corante natural em várias formulações na indústria alimentícia, tais como em manteigas, queijos, salsichas e sorvetes (CONSTANT et al., 2002; COSTA & CHAVES, 2005; DI MASCIO, DEVASAGAYAM, SIES, 1990; KOUL et al., 2003; SHUHAMA et al., 2003). A bixina é um apocarotenóide monometil éster carboxílico, onde sua estrutura química é composta por uma cadeia isoprênica de vinte e quatro carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, apresentando assim, a fórmula molecular  $C_{25}H_{30}O_4$  (Figura 2). É lipossolúvel, solúvel em clorofórmio, acetona, éter etílico, etanol e insolúvel em água (MERCADANTE e PFANDER, 2001).

Os pigmentos das sementes de urucum podem ser extraídos por processos mecânicos (raspagem), físico-químicos (solventes) ou ainda, utilizando enzimas (ALVES, 2001). A extração por solventes pode ser feita por três métodos básicos, extração alcalina (solução de NaOH ou KOH) em que resulta na conversão da bixina em norbixina, extração com óleo (milho ou soja) e extração através de solventes orgânicos (clorofórmio, etanol, acetona), resultando na forma mais pura dos pigmentos.

**FIGURA 2:** Estrutura química dos pigmentos de Bixina e Norbixina



Bixina



Norbixina

Fonte: Adaptado TOCCHINI; MERCADANTE, 2001

A bixina apresenta a particularidade dentre os carotenoides por ser encontrada naturalmente na configuração *cis* e por possuir em sua molécula dois grupos carboxílicos, sendo um deles um éster metílico. Esta característica confere lipossolubilidade à molécula. Se ocorrer a hidrólise alcalina do agrupamento metílico, obtém-se o sal hidrossolúvel da norbixina (SILVA, 2009).

A norbixina (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) é o derivado desmetilado da bixina que, apesar de ocorrer naturalmente, é quase sempre referida como produto da saponificação da bixina (Figura 3), sendo esta a sua forma de obtenção para fins comerciais (MERCADANTE e PFANDER, 2001).

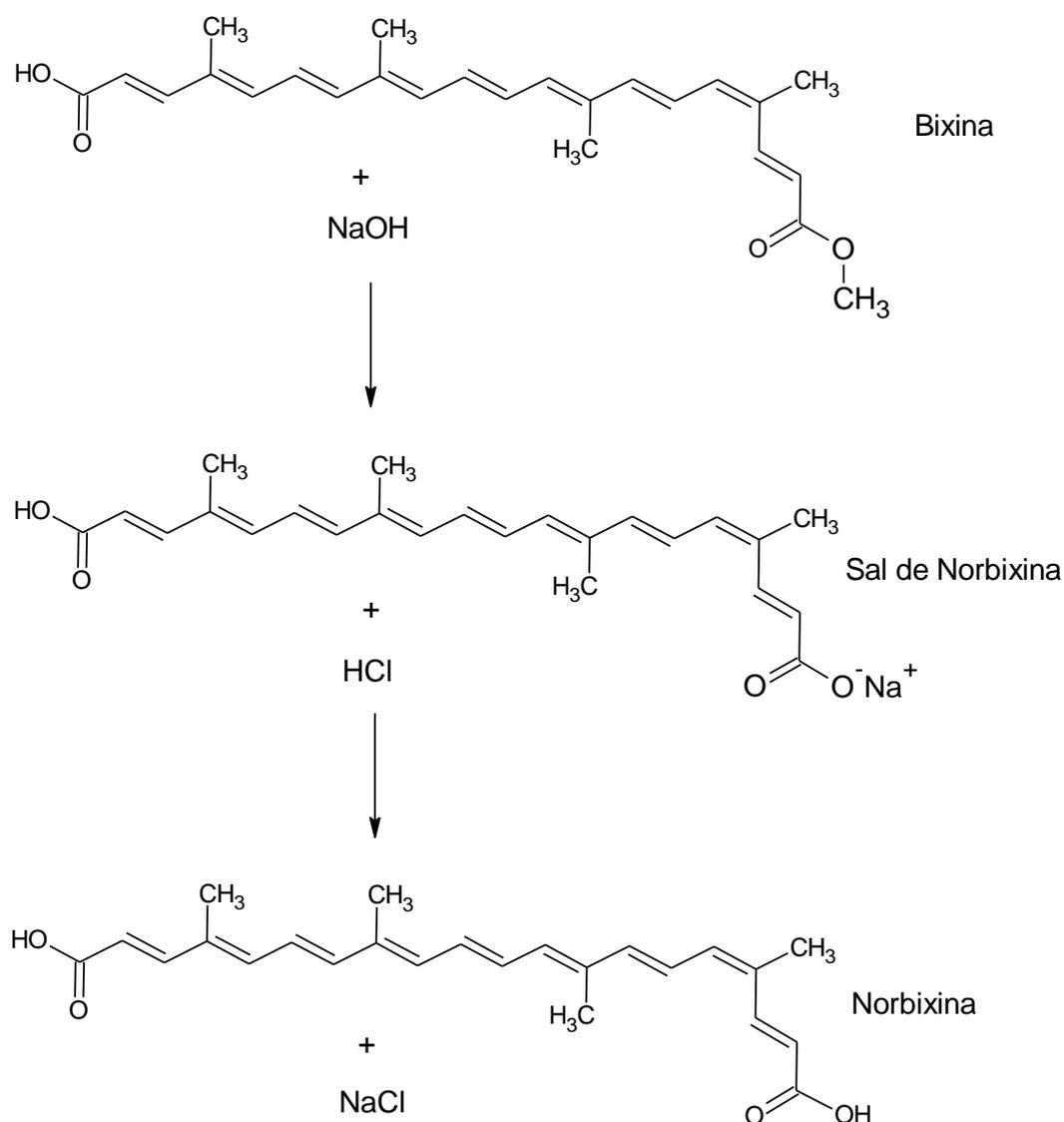
A Bixina e norbixina, podem estar presentes em uma extração, tanto na forma *cis* como na *trans*. (PRENTICE-HERNANDEZ; RUSIG; CARVALHO, 1993; SCOTTER et al., 1998; SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001).

O sal da norbixina, como citado anteriormente, é obtido pela extração alcalina dos pigmentos da semente de urucum, a qual pode ser conduzida com hidróxido de sódio ou de potássio (PIMENTEL; STRINGHETA, 1999; KOUL; KOUL; TIKOO, 2003; SHUHAMA, et al. 2003). O derivado desmetilado da bixina assim obtido é a forma de pigmento normalmente empregada para aplicações em produtos aquosos (PIMENTEL; STRINGHETA, 1999; COSTA; CHAVES, 2005).

Dentre os carotenoides naturais, a bixina é um dos mais eficazes sequestradores da molécula de oxigênio e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres (SANTOS et al., 2007; DI MASCIO, DEVASAGAYAM, SIES, 1990), sendo, portanto, um promissor agente quimioprotetor especialmente contra danos ao DNA induzidos por radicais livres de oxigênio ou compostos capazes de gerar tais moléculas.

A bixina é também um inibidor eficaz da peroxidação lipídica. Moreira et al (2014) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenos, entre estes, o beta-caroteno, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, avaliando a eficácia na inibição dos consequentes efeitos de transformações neoplásicas induzidas quimicamente. De todos os carotenóides testados, o alfa tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação lipídica, seguido pela bixina (ANTUNES, 2004).

**FIGURA 3:** Equação química de saponificação da Bixina



Fonte: Adaptado Silva et al. (2009)

Algumas pesquisas dão suporte científico para o uso popular do urucum, como o estudo conduzido por Coelho *et al.* (2003). Os autores verificaram que tinturas extraídas do caule, flor, folha, fruto e raiz de exemplares de urucum inibiram o desenvolvimento de doze espécies de bactérias estudadas.

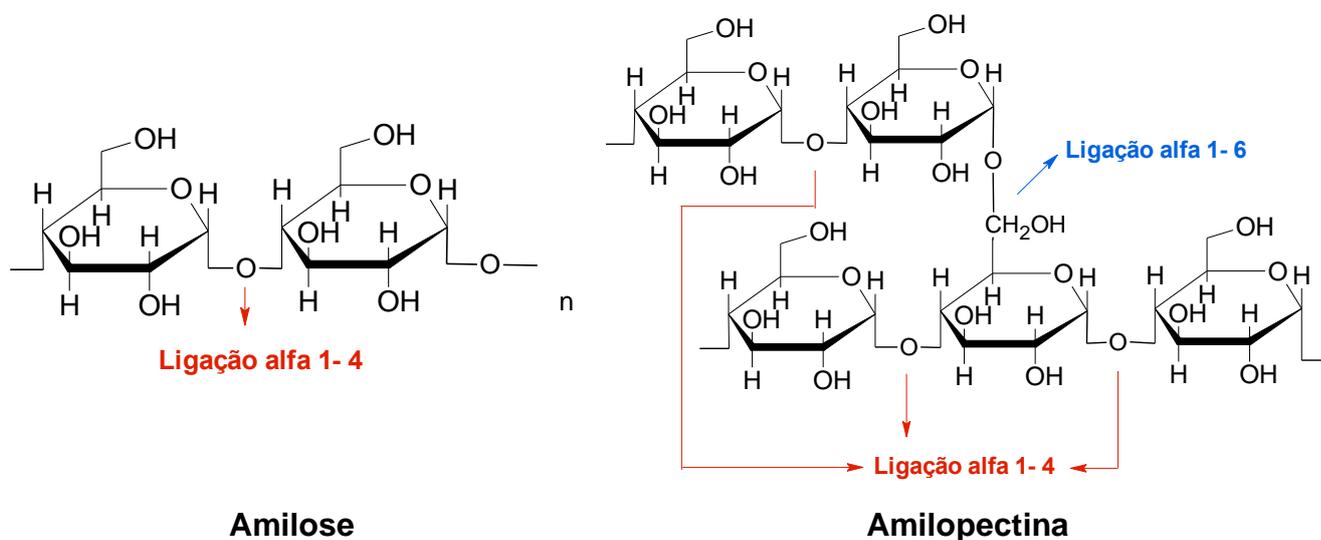
Segundo Lima et al (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina, carotenóides presentes na planta urucum tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas se iniciam após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado, principalmente, pela lipoproteína LDL oxidada e, portanto, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

Os carotenóides possuem muitas funções biológicas, entre elas a ação antioxidante contra os radicais livres. Com isso, o consumo de alimentos ricos em carotenóides na dieta humana, deve ser utilizado para prevenção e tratamento de algumas enfermidades. Entretanto os carotenóides não pode ser aplicado na forma isolado, sendo necessário um suporte para a liberação da substância. Neste trabalho foi utilizado o amido e melamina como base polimérica.

## 2.5 Amido

O amido é um polissacarídeo natural biodegradável, amplamente disponível e de fácil obtenção. Constitui a mais importante reserva de nutrição de todos os vegetais superiores, encontrado principalmente em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos (BOBBIO e BOBBIO, 2003). Os grânulos de amido são misturas heterogêneas de duas macromoléculas, amilose e amilopectina, que diferem no tamanho molecular e grau de ramificação (TESTER, KARKALAS, 2006). A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de glicose ligadas na posição  $\alpha$ -1,4, apresentando pequeno número de ramificações, enquanto a amilopectina é uma molécula altamente ramificada, também composta de unidades de glicose ligadas na posição  $\alpha$ -1,4, mas com 5 a 6% de ligações na posição  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação como representados na Figura 4. (HOOVER, 2001).

**FIGURA 4:** Estrutura química da Amilose e Amilopectina



Fonte: Adaptada LEHNINGER et al., 2014

A compreensão da estrutura dos grânulos de amido é importante no entendimento de suas propriedades físico-químicas, as quais determinam o comportamento do amido natural ou modificado, nos mais diversos processos industriais a que eles normalmente são submetidos (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004)

Quimicamente, o amido é composto de elementos de carbono, hidrogênio e oxigênio. O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, com estruturas e funcionalidade diferentes. Variações nas proporções entre estes componentes e em suas estruturas e propriedades podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais muito diferentes, que podem afetar as suas aplicações industriais.

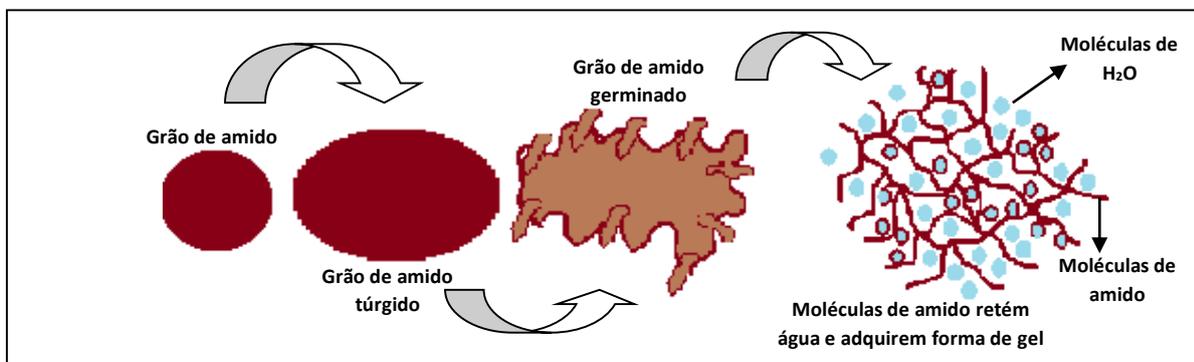
As características de gelatinização do amido estão associadas a vários fatores, incluindo proporção de amilose e amilopectina, tipo de cristalinidade, tamanho e estrutura do grânulo de amido (Figura 5). A amilopectina auxilia para o inchamento do grânulo, enquanto a amilose o dificulta (ROCHA, 2008)

Desse modo, a cristalinidade dos grânulos, normalmente determinada por difração de Raio X, é descrita principalmente em função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina (HOOVER, 2001). As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na água, tornando-o relativamente resistente ao ataque enzimático e químico (FRANCO et al., 2001). Esta estrutura cristalina depende do tipo e grau de associação intermolecular existente entre os componentes do amido (SINGH et al., 2003).

A amilose e a amilopectina podem ser submetidas ao processo de formação do gel, representado da Figura 5, que consiste no aquecimento de uma solução de amido-água até temperatura de 60 – 70 °C. Durante esse fenômeno, ocorre a ruptura das estruturas cristalinas do grânulo de amido, o qual absorve água e entumece irreversivelmente, adquirindo tamanho maior que o original. Após a gelatinização do amido, quando a temperatura é reduzida à temperatura ambiente, ocorre um rearranjo das moléculas por ligações de hidrogênio, fator que favorece a recristalização e a retrogradação. A retrogradação do amido é um fenômeno que deve ser minimizado por se tratar da reconstrução de uma estrutura mais rígida devido às cadeias de amilose ficarem mais disponíveis para

se rearranjam durante a validade do produto alimentício, resultando em maior perda de água do sistema e endurecimento do produto final (MUNHOZ et al.,2004)

Figura 5: Gelatinização do amido



Fonte: Adaptada LEHNINGER et al., 2014

Os filmes poliméricos de amido são muito quebradiços e de fácil dissolução. Para evitar esse inconveniente nesse trabalho uniu-se ao amido a melamina para obter filmes impermeáveis.

## 2.6 Resina Melamina- Formol (MF)

A resina de melamina é obtida pela reação da melamina (2,4,6- triamina- 1,3,5-triazina) com formaldeído na presença de ácido ou álcali (metilolação), obtendo assim, diversos grupos metilol no primeiro estágio (Figura 6). O número de grupos metilol formados é função da relação molar do formol com a melamina. Esta relação é extremamente importante na preparação das resinas correspondentes e as mais comuns estão entre 3 a 6 mols de formol para 1 mol de melamina (HILL; LEE, 1999).

Em uma etapa posterior, é realizada a esterificação (alquilação) dos grupos metilol formados com álcool (ROH) na presença de catalizador ácido, obtendo assim uma resina solúvel em sistemas orgânicos. Os grupos éteres formados são os principais responsáveis pela reação de reticulação nos sistemas termocuráveis. Normalmente, são utilizados como álcool, o metanol, etanol, butanol e isobutanol, que agem também como solvente do meio

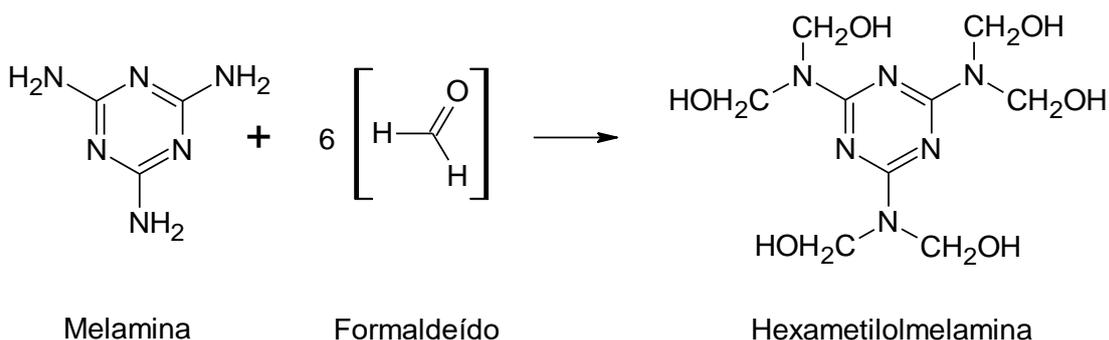
reacional. A escolha do tipo de álcool para esterificação é determinante nas propriedades da resina (WILSON, PFOHI,2000).

Sendo um dos componentes não voláteis da tinta, a resina melamina-formol é utilizada para aglomerar as partículas de pigmento, como também é responsável pela formação do filme. Ela denomina o tipo de tinta ou revestimento empregado na pintura, por exemplo: tinta alquílica, acrílica, vinílica, epóxi, poliéster e outras. Todas as tintas levam o nome da resina básica que as compõe (HIRAYAMA, URBAN,1992).

Antigamente, as resinas eram a base de compostos naturais, vegetais ou animais. Hoje, são obtidas na indústria química ou petroquímica por meio de reações complexas, originando polímeros que conferem às tintas propriedades de resistência e durabilidade muito superiores às antigas (GAMAGE, HILL, LUKEY, 2003).

Antigamente, as resinas eram a base de compostos naturais, vegetais ou animais. Hoje, são obtidas na indústria química ou petroquímica por meio de reações complexas, originando polímeros que conferem às tintas propriedades de resistência e durabilidade muito superiores às antigas (GAMAGE, HILL, LUKEY, 2003).

**FIGURA 6:** Equação química da reação de obtenção das resinas de melamina.



Fonte: Adaptado Yuan et al. 2007

A formação do filme está relacionada com o mecanismo de reação química do sistema polimérico utilizado, embora outros componentes como solventes, pigmentos e aditivos tenham influencia no sentido de retardar, acelerar ou até inibir essas reações.

A resina e as possíveis combinações entre resinas representam o principal componente em qualquer tinta. As propriedades físico-químicas da tinta, como aplicabilidade, secagem, cura, durabilidade, adesão, resistência química e mecânica, flexibilidade e dureza, são governadas basicamente pela natureza das resinas (LUKEY, HILL, 2002). Algumas variações menores dessas propriedades podem ser conseguidas pela modificação de outros componentes da formulação, mas cabe ao sistema de resinas a maior influência. A durabilidade deste sistema de resinas também funciona como fator limitante da estabilidade da tinta e merece especial atenção para obtenção de um produto com bom desempenho. (GARCIA, et. Al., 2000)

Considerando que os filmes de tinta formados podem ser obtidos a partir de dois mecanismos básicos de secagem, pode-se classificar as resinas utilizadas em duas grandes classes, as termoplásticas e as termo fixas. Com o uso das resinas termoplásticas, o filme é obtido somente por evaporação de solvente. Já as resinas termo fixas são obtidas por reações de polimerização do sistema de resinas associadas com a evaporação de solvente (HILL; LEE, 1999). As propriedades dos filmes termofixos são superiores aos termoplásticos, com relação a brilho, resistência química, resistência mecânica, durabilidade e outras.

A resina de melamina formaldeído eterificada tem sido largamente usada como agente reticulante em tintas termocuráveis por mais de 60 anos. Os sistemas poliéster/melamina e acrílico/melamina tem sido muito utilizado na indústria de tintas de altos sólidos, tanto na forma pigmentada como na forma de verniz. Já o revestimento acrílico/melamina é mais empregado na indústria automobilística. Diversos filmes poliméricos contendo medicamentos tem sido utilizado em processo de cicatrização (RODRIGUES, 2012).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 GERAL**

Construir um filme de (bixina/norbixina) /amido/melamina com extrato de *Bixa Orellana L.*, amido e resina de melamina, para utilização em processo de cicatrização em lesão de pele.

#### **3.2 OBJETIVO ESPECIFICO**

- Obter os extratos das sementes de urucum (*Bixa Orellana*) em diferentes solventes
- Produzir filmes de amido/melamina a partir de diferentes relações de concentração em massa de amido e melamina
- Formar os compósitos em diferentes relações de concentração, (bixina/norbixina) e os filmes amido/melamina
- Caracterizar os filmes por técnica de UV, TG, DSC e MEV.
- Aplicar os filmes dos compósitos em animais para verificar ação biológica na cicatrização em feridas e ação genotóxicos.

## 4 METODOLOGIA

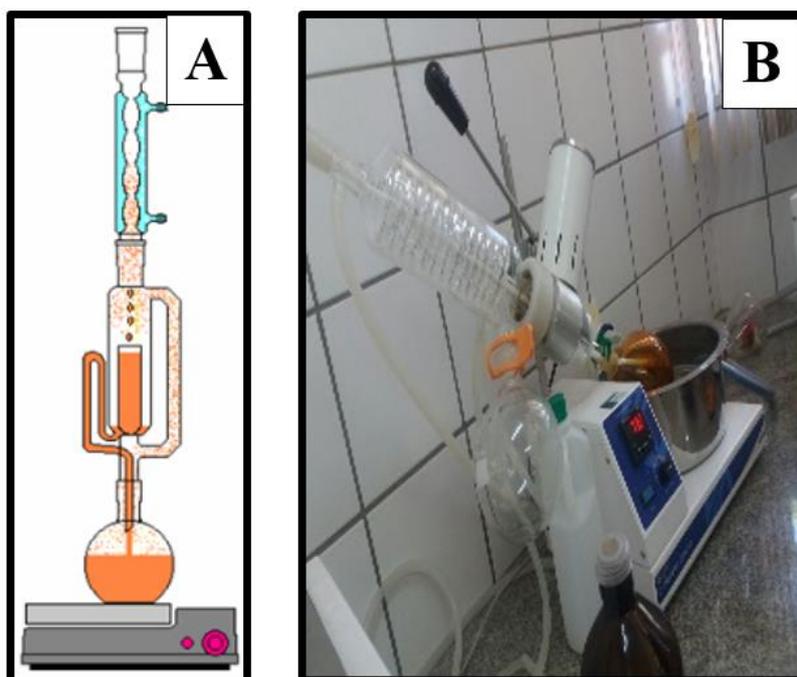
### 4.1 Obtenção das sementes *Bixa orellana* L

As sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) foram adquiridas na região do povoado David Caldas, município de União-PI sobre os dados de localização - 4° 44'42.8 S 42° 53'10.9 W. As sementes foram coletadas no turno da manhã e secas a temperatura ambiente no mês de dezembro de 2015.

### 4.2 Obtenção de extratos a partir das sementes de urucum

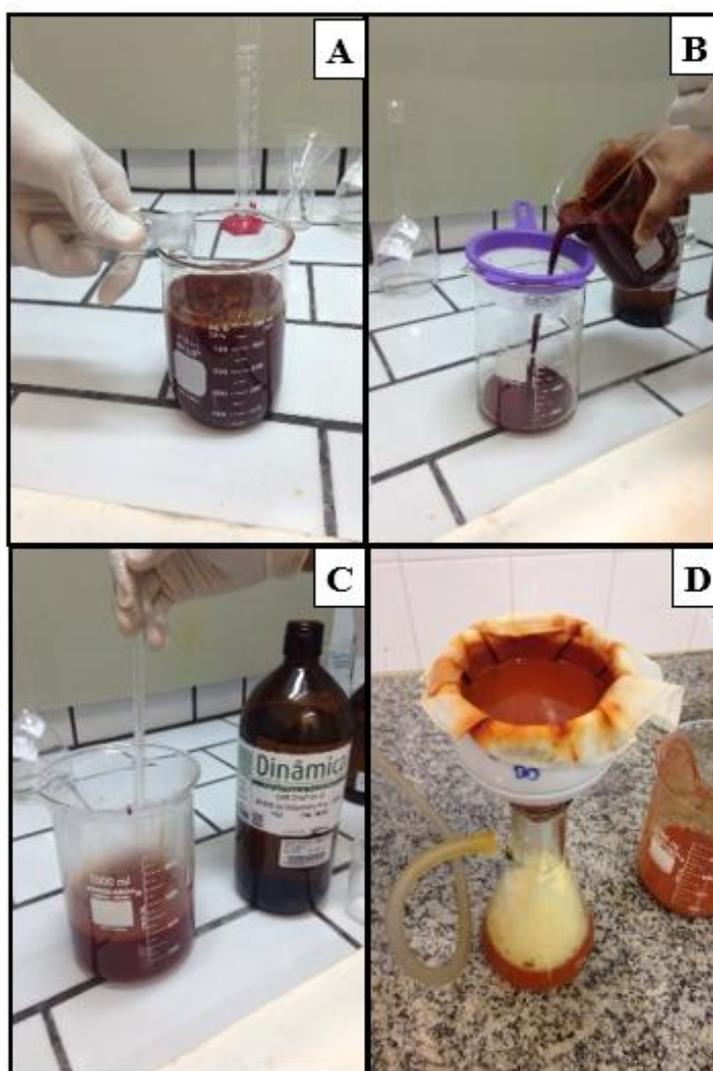
**4.2.1. Método 1:** Duas amostras de sementes de urucum (100 g) foram submetidas a extração, uma com ácido acético (400 mL) e outra com etanol (100 mL), em aparelhagem Soxhlet por um período de 6 h como mostra a Figura 7A. Separou-se as sementes, evaporou-se os solventes em evaporador rotativo (Figura 7B) e armazenou-se em frasco âmbar.

**FIGURA 7:** Extração com solvente orgânico em aparelhagem Soxhlet e recuperação do solvente. (A) Extração contínua das sementes de urucum por 6 horas; (B) Evaporação de solvente por evaporador rotativo e concentração do extrato de urucum.



**4.2.2. Método 2:** Amostras de sementes de urucum (10 g) foram submetidas a extração, uma com 40 mL de solução de NaOH 5% por 30 min, sob agitação frequente a uma temperatura de 40 °C. Separaram-se as sementes por filtração, adicionou-se HCl concentrado à mistura alcalina até pH 4, filtrou-se usando papel de filtro previamente pesado, lavou-se o sólido com água destilada até o pH neutro e secou-se o extrato em estufa a 70 °C por 30 min. (Figura 8)

**FIGURA 8:** Processo de extração da norbixina pela saponificação das sementes de urucum (A) semente urucum em solução NaOH 5% por 30 min; (B) filtração das sementes; (C) Adição de HCl concentrado até obter pH 4; (D) filtração a vácuo e seca a temperatura de 50°C.

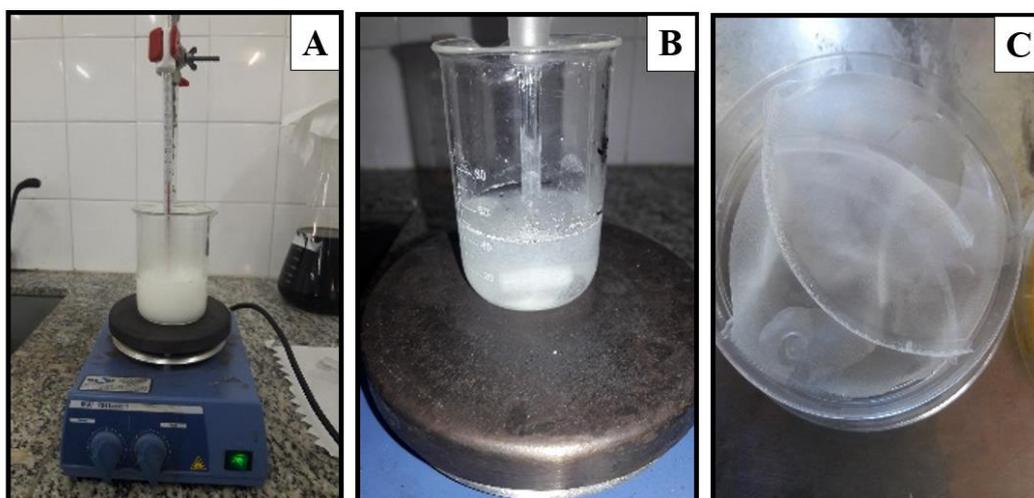


### 4.3 Síntese polímero

#### 4.3.1 Polímero amido (cola)

Para o preparo da polimerização do amido (Figura 9), pesou-se a massa de amido referente à proporção e à mesma foi adicionada água correspondendo ao dobro da massa de amido. Após ficar homogêneo, colocou-se a mistura em aquecimento lento e controlado, sob agitação constante para evitar a formação de aglomerado de amido. A gelatinização iniciou-se em torno de 60 °C passando de uma mistura opaca para transparente.

**FIGURA 9:** Processo de obtenção da cola de amido, (A) mistura homogênea de amido e água em agitação e aquecimento á 60°C; (B) mistura aquosa de amido sob agitação constante até ficar gelatinoso; (C) moldado em placa e seco em temperatura de 40°C.

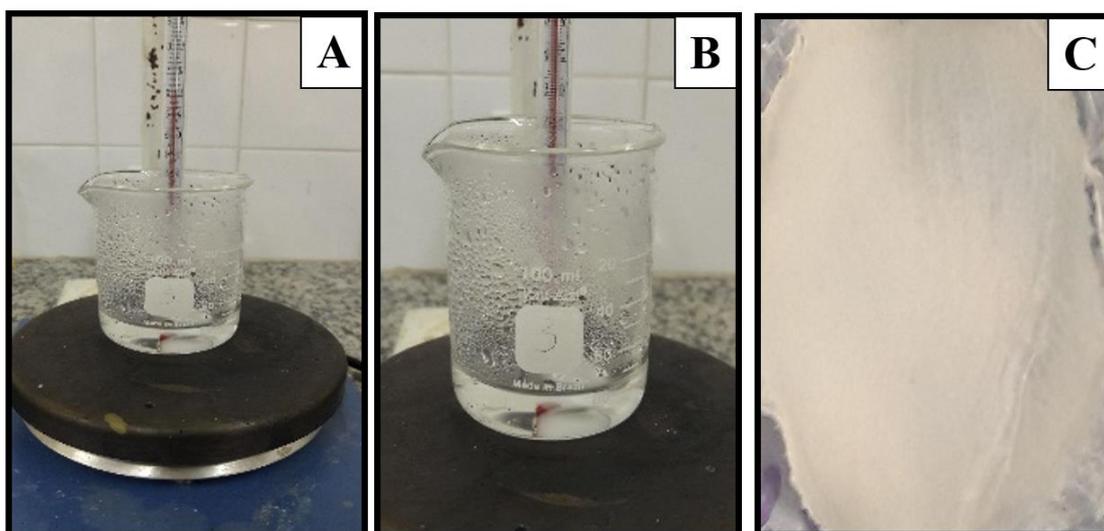


#### 4.3.2 Resina de melamina

Para a síntese da resina (Figura 10), misturou-se em recipiente, sob agitação constante, a melamina e o formol (37% em massa de formaldeído) em proporção molar de 1:6, após o aquecimento controlado em torno de 60 °C, a

mistura começou a ficar transparente, onde toda a melamina foi solubilizada em formol.

**FIGURA 10:** Processo de obtenção da resina melamina- formaldeído (MF) (A) mistura de Melamina e formol sob aquecimento a 60°C; (B) mistura em agitação constante até ficar transparente; (C) moldado em placa e seco a temperatura ambiente.

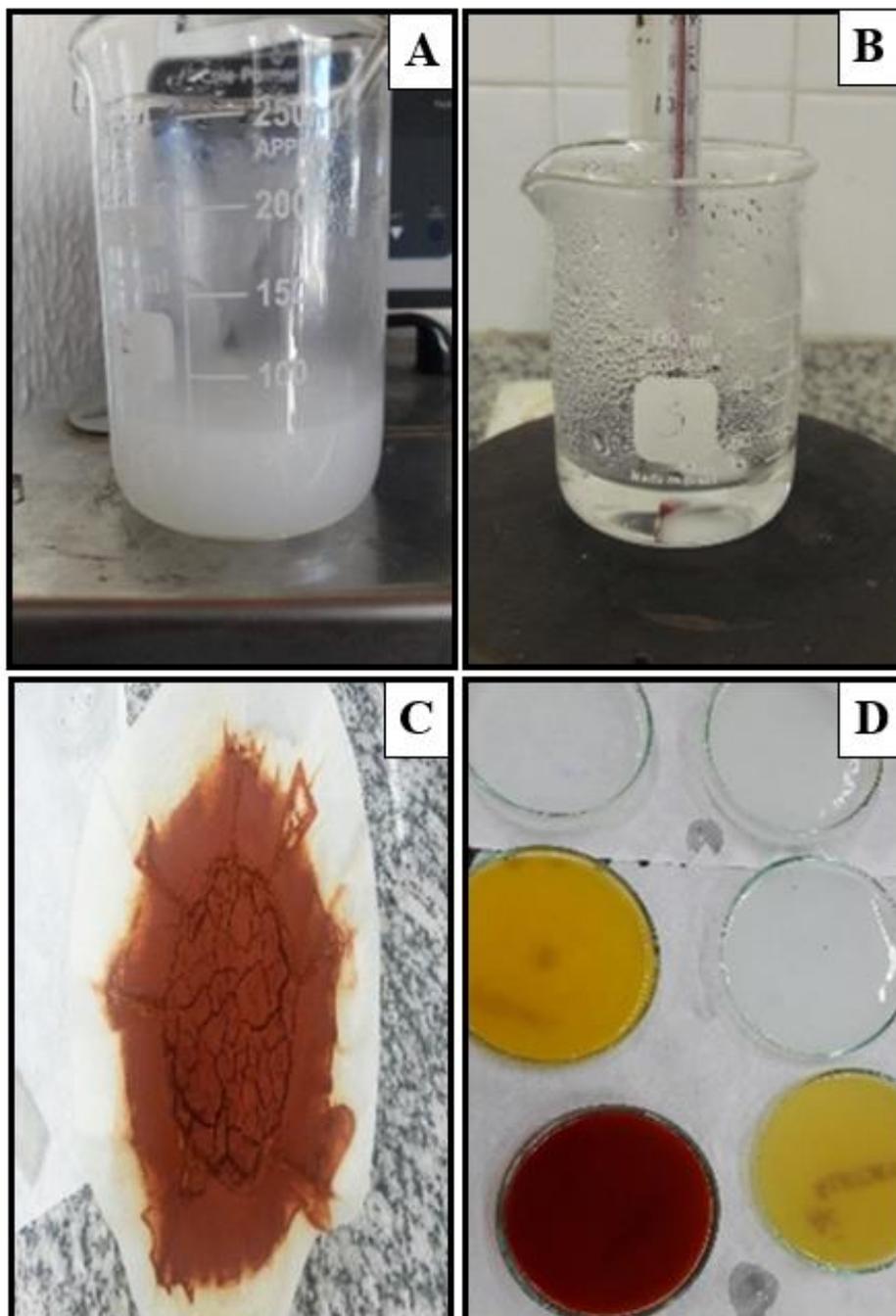


#### 4.3.3 Síntese dos compósitos

Para a preparação dos compósitos, realizou-se a mistura da cola de amido com a resina de melamina a 1, 2 e 3% da massa da cola. Sob agitação e à temperatura ambiente, após ficar homogêneo, adicionou-se os extratos de urucum 10% em massa, agitou-se até ficar totalmente incorporado (Figura 11). Em seguida, colocou-se em uma placa estéril para a moldagem, e deixou-se secar à temperatura ambiente.

Esse processo de formação de compósito e sua aplicação gerou a patente de inovação intitulado “ PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana* L., E SUA APLICAÇÃO COMO CICATRIZANTE EM LESÕES CUTÂNEAS”, com o número BR 10 2019 004032-7, em apêndice (resumo e reivindicação).

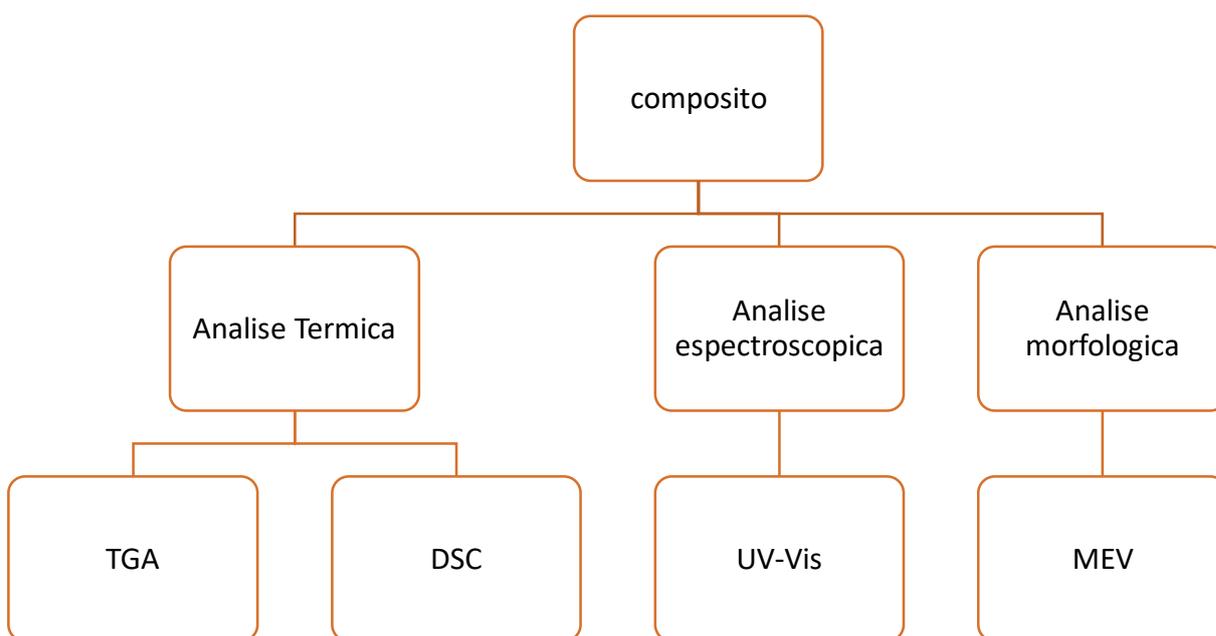
**FIGURA 11:** Formação do compósito amido/ melamina/ extrato urucum (A) cola de amido; (B) Resina de melamina 1%; (C) Extrato de urucum a 10% e (D) adicionado em placa e seco.



#### 4.4 Análise físico-química

Os compósitos produzidos foram caracterizados por análise térmica, análise espectroscopia e morfológica como mostra o esquema na figura 12 abaixo.

**FIGURA 12:** Fluxograma da caracterização do compósito



##### 4.4.1 Análise por Ultravioleta-visível

Os filmes poliméricos foram analisados por espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta/visível, para a qual utilizou-se o espectrofotômetro de duplo feixe marca Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10S UV-VIS. Foram preparadas soluções de 0,001 mol/L de extrato de urucum e do polímero.

##### 4.4.2 Análise termogravimétrica

Nas análises de TGA desta pesquisa, foram utilizadas amostras, contendo cerca de 8,0 mg de fragmentos do material polimérico. As amostras foram colocadas na termobalança do aparelho e submetidas a um aquecimento

progressivo, na faixa de temperatura entre 25°C e 1000°C com velocidade de 10 °C/min e resolução de 5,0 %/min. O equipamento utilizado foi o TGA 51 THERMOGRAVIMETRIC ANALYZER da marca SHIMADZU, operando em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min).

#### **4.4.3 Análise Calorimetria Exploratória Diferencial**

No que diz respeito à instrumentação, a análise DSC foi realizada no aparelho TA INSTRUMENTS modelo DSC-60 PLUS DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETER da marca SHIMADZU, operando na faixa de temperatura de 25 a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min).

#### **4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Analisou-se a microestrutura dos filmes por microscopia eletrônica de varredura, utilizando-se o microscópio eletrônico (MEV), utilizando-se amostras em fragmentos para o polímero, cujas superfícies dessas amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro (metalizador). O alvo metálico foi bombardeado por átomos de gás argônio, utilizando um SPUTTER COATER, da marca BALZERS, modelo SCD 50. O aparelho utilizado foi um microscópio computadorizado de nome SUPERSCAN SCANNING ELECTRON MICROSCOPE da marca SHIMADZU, Modelo SS X-550, com aceleração de voltagem de 10 e 20 kV.

### **4.5 Atividade farmacológica**

#### **4.5.1 Os animais e aspectos éticos**

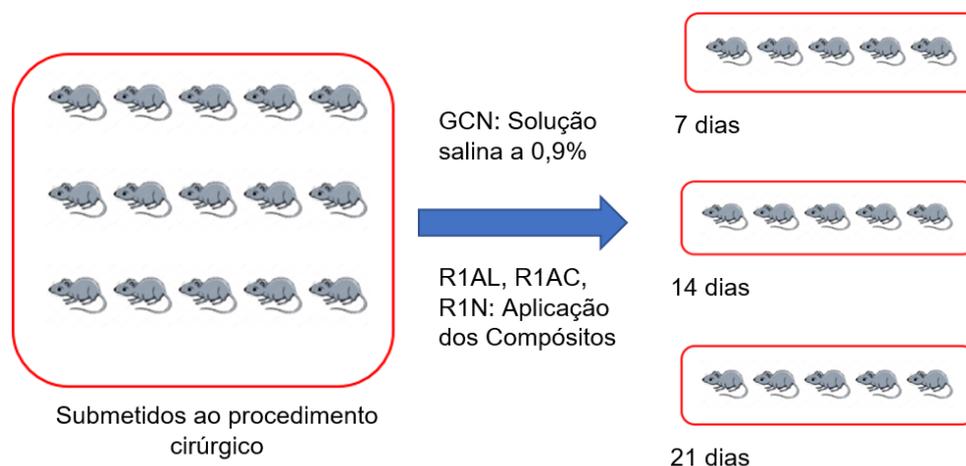
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí com nº 0124/2017, parecer em apêndice. Foram utilizados setenta e cinco ratos machos Wistar com 2-3 meses (*Rattus norvegicus albinus*), pesando  $250 \pm 25$  g foram utilizados e alojados em gaiolas de polipropileno contendo ração e água *ad libitum* em um ciclo claro/escuro de 12/12 h. O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da FACIME/CCS. O grupo experimental era

composto por 60 animais, divididos aleatoriamente em quatro grupos (Controle negativo, R1AL, R1AC, R1N), e os grupos por sua vez foram divididos em três subgrupos, de acordo com o período de observação (7, 14 e 21 dias de pós-operatório), com uma amostra de 5 animais em cada subgrupo.

#### 4.5.2 Grupo experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 15 indivíduos: Grupo Controle negativo (GCN), Grupo compósito com extrato etanólico (R1AL), Grupo compósito com extrato ácido acético (R1AC), Grupo compósito com bixina (R1N). O GCN corresponde aos animais submetidos ao tratamento cirúrgico com aplicação de solução salina a 0,9%, e os R1AL, R1AC e R1N, correspondem ao grupo de ratos submetidos ao tratamento cirúrgico e aplicação do biopolímero. Cada grupo foi dividido em três subgrupos de 5 animais de acordo com o período de avaliação (7, 14 e 21 dias de pós-operatório) como demonstra a Figura 13.

**FIGURA 13:** Esquema para o experimento de cicatrização de pele

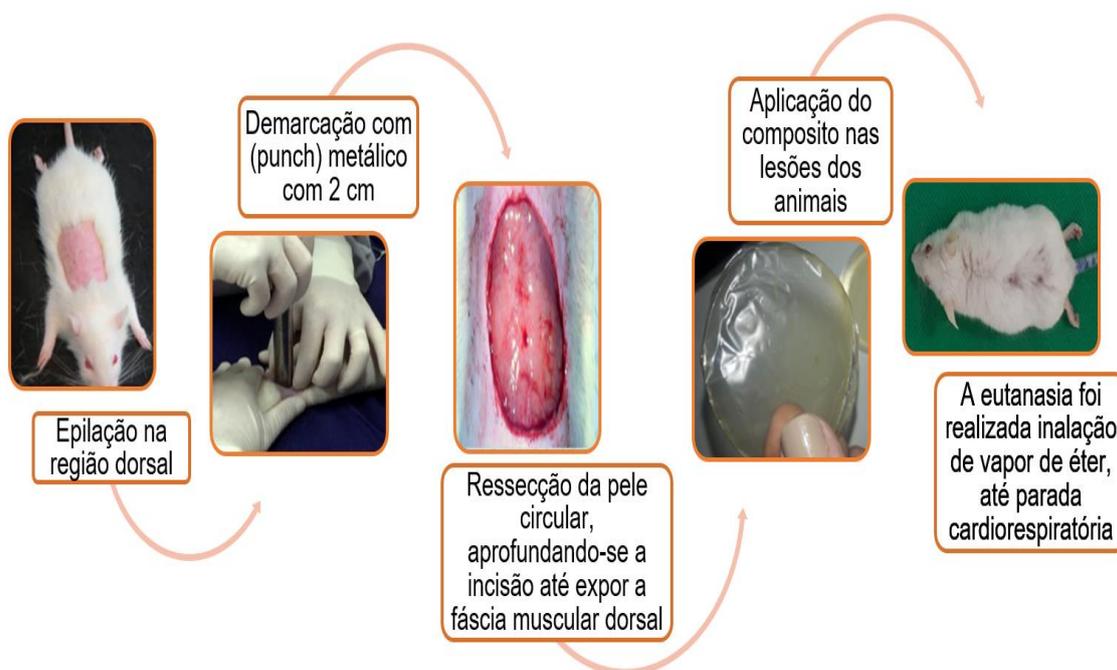


#### 4.5.3 Procedimento cirúrgico experimental

A Figura 14 ilustra o preparo cirúrgico em etapas: Os animais foram previamente pesados e receberam por via subcutânea, um pré-tratamento com atropina na dose de 0,04 mL para cada 100 g de peso corpóreo, aguardando

repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. Foi administrada droga anestésica por via intramuscular, cloridrato de cetamina 10% utilizando a dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo e cloridrato de xilazina 2% com dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo.

**FIGURA 14:** Etapas do preparo cirúrgico para cicatrização de pele.



Após a anestesia, realizou-se epilação na região dorsal, em área de 24 cm<sup>2</sup> (6,0 cm de comprimento x 4,0 cm de largura), localizada caudalmente a uma linha imaginária que passasse pelos membros anteriores. No centro da área epilada, foi realizada demarcação na pele de cada rato por rotação da borda cortante de demarcador (*punch*) metálico com 2 cm de diâmetro. Foi realizada a ressecção de segmento de pele circular, seguindo a demarcação do *punch*, aprofundando-se a incisão até expor a fáscia muscular dorsal.

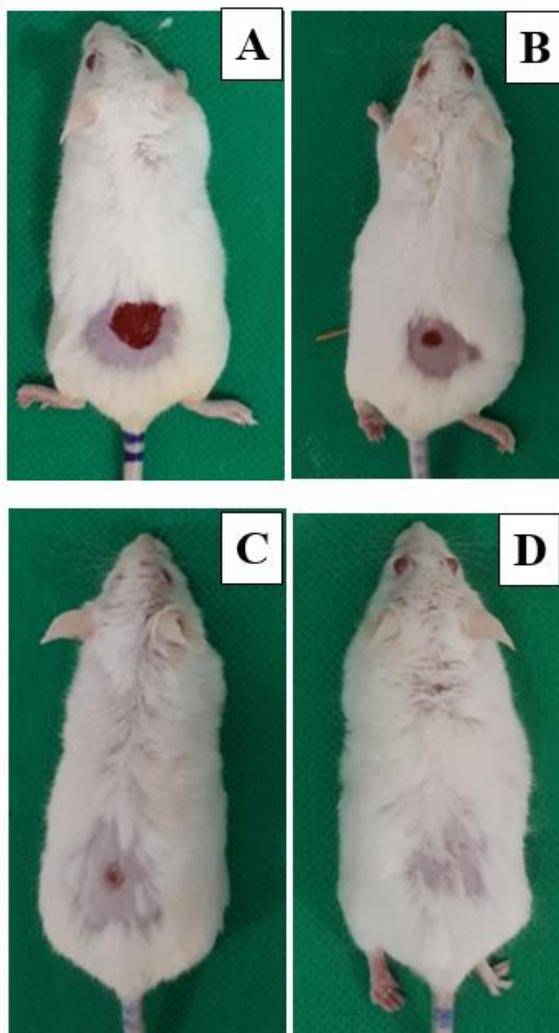
Concluída a hemostasia, realizou-se a primeira administração tópica, na ferida operatória cruenta. O composto foi posicionado sobre a ferida, excedendo seus bordos, com as extremidades sendo fixadas com o auxílio de 4 gotas de metil metacrilato, para garantir adesão perfeita, nos animais dos grupos R1AL, R1AC e R1N. Colocou-se 0,1 mL de solução salina por meio de seringa de 1,0 mL, sem agulha, nos animais do GCN. Todos os animais foram sacrificados nas datas programadas, por uma overdose de anestesia (pentobarbital de sódio 100

mg/kg, por via intraperitoneal) e eutanasiados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Animais Experimentação (CONCEA)

#### 4.5.4 Avaliação macroscópica

A Figura 15 esquematiza a análise macroscópica das feridas operatórias. A área da ferida foi macroscopicamente avaliada 0, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia usando as imagens capturadas com uma câmera digital (Nikon Coolpix P100, com 10,3 megapixels resolução), sem flash e usando luz, fixado em um tripé a uma distância de 20 cm da ferida.

**FIGURA 15:** Ilustração da análise macroscópica da área lesionada. A área da ferida foi avaliada 0, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia (A, B, C, D) respectivamente.

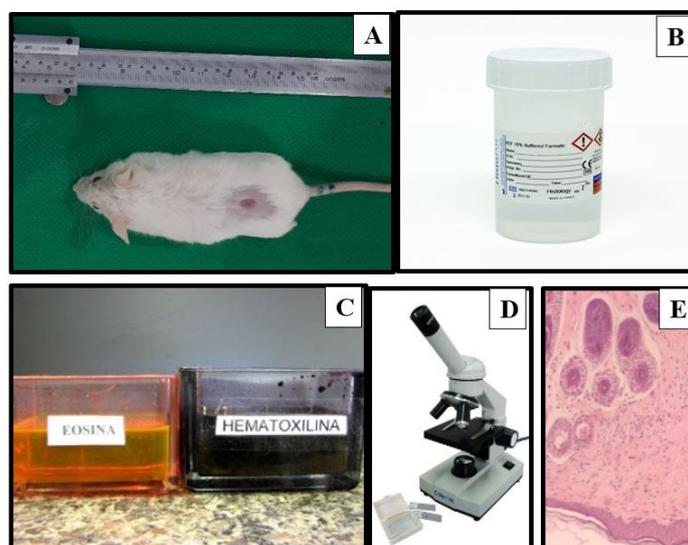


A Morfometria Macroscópica foi realizada utilizando o software ImageJ para calcular a área da ferida nos diferentes períodos experimentais; os resultados foram expressos como a percentagem de regressão de ferida da pele. A área inicial será comparada com a final em todas as amostras dos diferentes grupos, com delimitação da periferia da ferida.

#### 4.5.5 Avaliação microscópica

Esquema representativo na Figura 16 da avaliação microscópica das laminas onde, cada ferida cirúrgica foi dissecada com margem de 1,0 cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, sendo a peça cirúrgica colocada em recipiente plástico com formol a 10%. Realizou-se colorações histológicas utilizando-se o corante Hematoxilina-Eosina (HE) para analisar morfológicamente os tecidos, para observação de fibras colágenas. Para proliferação vascular, células polimorfonucleares, células mononucleares, proliferação fibroblástica e fibras colágenas foram atribuídas quatro graduações: ausente, discreta, moderada e acentuada. Para a reepitelização foram três categorizações: ausente, parcial e completa.

**FIGURA 16:** Sequencia ilustrativa da avaliação microscópica da laminas:(A) Remoção do tecido; (B) peça cirúrgica colocada em formol a 10%; (C) realizou colorações histológicas por HE; (D) Leitura em Microscópio Óptico e (E) Lâmina coradas



#### **4.5.6 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se *One-Way* ANOVA. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias, e desvio padrão das três experiências independentes. O resultado foi considerado positivo quando houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Para avaliar em conjunto os efeitos dos grupos (GCN, R1AL, R1AL e R1N), do tempo (7, 14 e 21 dias) e para a interação entre eles foi realizada o teste ANOVA com dois fatores para a variável numérica área (cm<sup>2</sup>). As comparações das áreas médias das feridas dos animais do GCN em cada um dos períodos de dias do estudo.

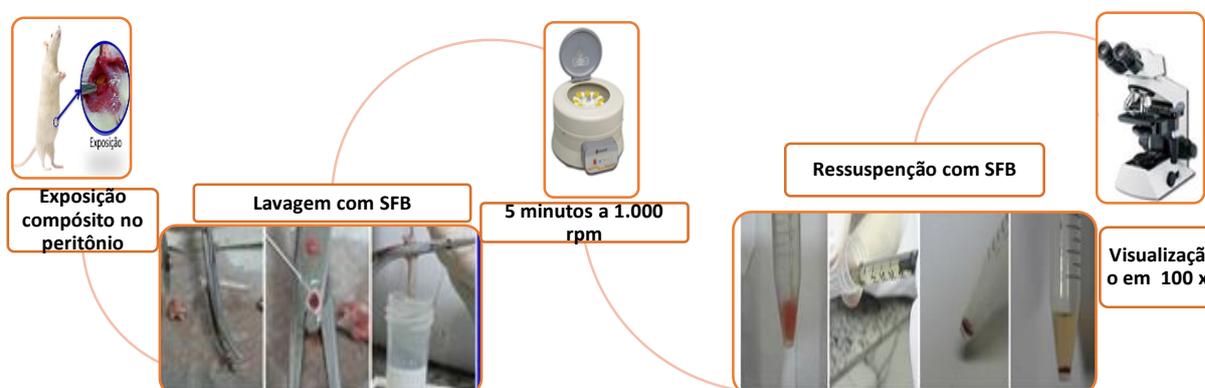
#### **4.6 Teste do micronúcleo**

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Experimentação e Mutagenicidade (LABEMUT) e Laboratório de Biologia Molecular e de Estudos de Injúrias Biológicas (LABMINBIO) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI). O grupo exposto (E), composto por 15 ratos, cada grupo de compósitos R1AL, R1AL e R1N era composto por 5 ratos, foi introduzido no peritônio através de uma Laparotomia e estavam devidamente anestesiados. Foram submetidos à eutanásia 72 horas após o início do experimento. Foi coletado material da medula óssea de cada rato após a eutanásia para realização do teste do micronúcleo em eritrócito policromático, para avaliação do grau de genotoxicidade. O Controle negativo (CN) era composto por 05 ratos nos quais foram realizados somente uma Laparotomia. A duração e a execução foram processadas paralelamente ao estudo de micronúcleos. Para o Controle positivo (CP), cinco ratos receberam injeções por via I.P. com dose única de ciclofosfamida numa concentração de 50 mg/Kg por animal. A duração e a execução foram processadas paralelamente ao estudo de micronúcleos.

### 3.6.1 Processamento, confecção da lâmina e coloração final

A Figura 17 apresenta o processamento e confecção das lâminas em que as células de medula óssea foram coletadas imediatamente após o sacrifício dos animais. Para isso, utilizamos uma seringa de 01 ml para a coleta. Esta seringa foi preenchida com Soro Fetal Bovino (SFB).

**FIGURA 17:** Representação ilustrativa para o teste de micronúcleo



Introduziu-se a agulha na abertura de uma extremidade do fêmur e injetou o SFB pelo canal, empurrando o componente medular em direção à outra extremidade, posicionada em um tubo *Falcon*, previamente marcado com o código do animal. Ressuspendeu-se o material da medula em SFB, até atingir uma homogeneidade. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1.000 rpm e descartou o sobrenadante ao fim do procedimento com Pipeta *Pasteur*. Completou-se a amostra com 0,5 mL de SFB e ressuspendeu até a homogeneização.

Preparou-se os esfregaços pingando 02 gotas da suspensão na extremidade fosca de uma lâmina (previamente marcada com o código do animal) e, com auxílio de outra lâmina inclinada em um ângulo de 45 graus. Após a confecção do esfregaço secou-se as lâminas ao ar livre. Foram confeccionadas 2 lâminas por animal. A coloração foi realizada 24h após a confecção das lâminas em *Giemsa* por 3 minutos. Para análise das lâminas, foi realizada em campo cego num aumento de 100x (objetiva de imersão) curto espaço de tempo,

pelo mesmo observador. Determinou-se a frequência de micronúcleos em 2.000 células PCEs por animal. Todo o protocolo é baseado em (HAYASHI et al., 1990; HAYASHI et al., 1994; HAMADA et al., 2015).

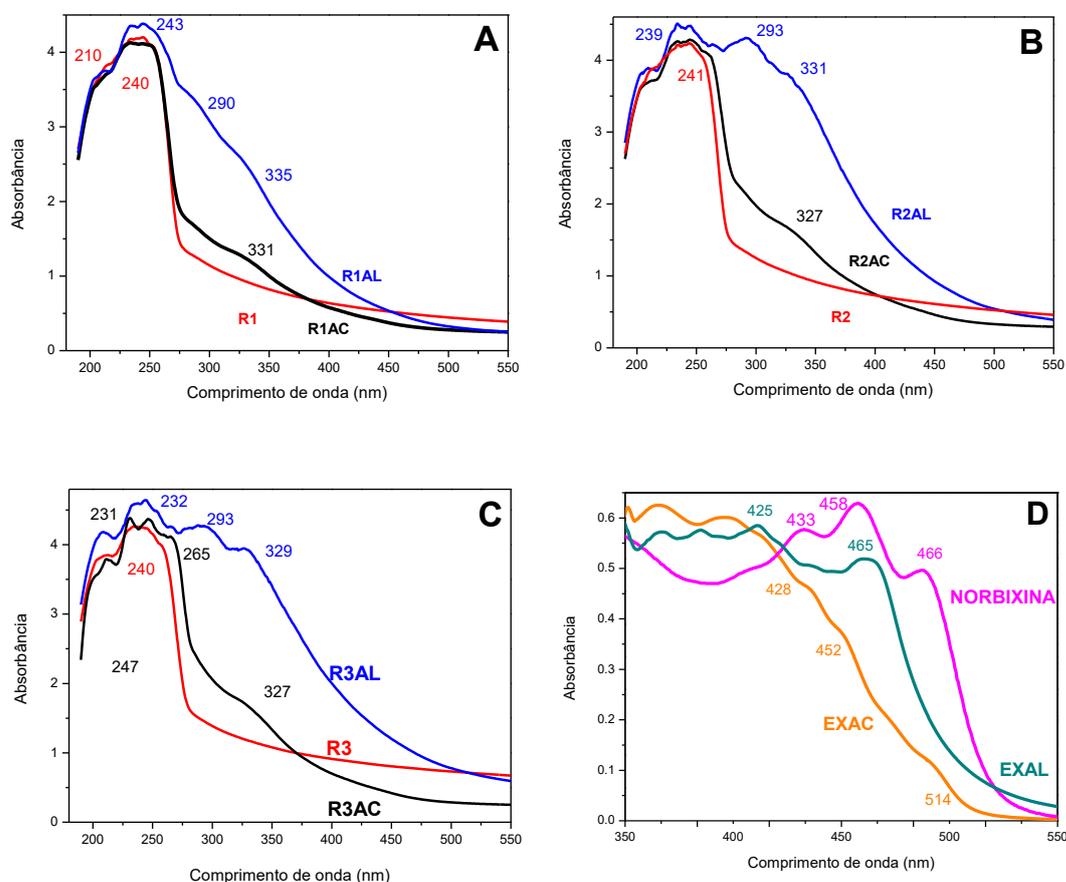
Os dados foram analisados utilizando *One-Way* ANOVA e teste Tukey. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias, ou seja, desvio padrão das três experiências independentes. O resultado foi considerado positivo quando houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização físico-química

A Figura 18 apresenta os espectros do ultravioleta visível dos filmes poliméricos em diferentes concentrações da resina melamina e dos extratos de urucum. No conjunto dos compósitos a 1% de melamina observou-se que os polímeros R1, possui duas bandas de absorção de uma aproximadamente em  $210\text{ cm}^{-1}$  de menor intensidade e outra em  $240\text{ cm}^{-1}$  de maior intensidade característico da transição  $n-\pi^*$  da triazina e outra banda em  $210\text{ cm}^{-1}$  ocorreu devido a transição eletrônica de  $\pi$  para  $\pi^*$  (CHENA et al.,2009, YAOZU et al., 2015).

**FIGURA 18.** Espectros de UV-Vis (—) para compósito amido/melamina (R), (—) polímero amido/melamina com extrato de ácido acético urucum (RAC), (—) polímero amido/melamina com extrato alcoólico de urucum (RAL), extrato de ácido acético urucum (—), extrato etanol de urucum (—) e norbixina extraída do urucum (—).



Em comparação entre os espectros de UV-Vis da R1AL e do R1AC mostrou uma diferença significativa nas transições, como mostra a Figura 18A, foi possível observar o pico em aproximadamente  $240\text{ cm}^{-1}$  característico do polímero R1. Ainda pode-se observar no espectro de absorção da R1AL uma banda discreta na região do ultravioleta em  $290\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a transição eletrônica  $n-\pi^*$  da carbonila presente na norbixina que corroboram com os resultados encontrados por Santos *et al* (2014) no espectro do UV-vis da norbixina dissolvidos em clorofórmio. Já para o espectro do polímero R1AC, não foi possível visualizar essa banda sugerindo uma menor concentração dos pigmentos de norbixina no extrato de ácido acético (CARDOSO, 2017).

Os gráficos da Figura 18B e 18C mostrou espectro de absorção no ultravioleta dos polímeros em diferentes concentrações de melamina 2 e 3% representados por R2 E R3, respectivamente. É possível observar uma banda de absorção em  $293\text{ cm}^{-1}$  para o compósito R2AL E R3AL. Segundo Santana (2009) essa absorção na região do ultravioleta é característico de transições  $n-\pi^*$  de grupos cromóforos da carbonila de polímeros. A transição responsável por essa absorção é a excitação eletrônica de um par isolado do átomo de oxigênio (um elétron “não ligante”  $n$ ) a um orbital vazio antiligante  $\pi^*$  da ligação dupla  $C=O$ . (ATKINS, 2012). Outra banda de absorção entre 330 a 339 é referente a transições  $n-\pi^*$  de grupos cromóforos azo dos polímeros (PAIVA,2010; SILVESTEIN,2007)

Na Figura 18D apresentam os espectros do ultravioleta visível dos extratos de urucum em etanol, ácido acético e uma solução de norbixina dissolvida em etanol. É notório que existem três Picos de absorção UV-Vis centrados em 433, 458 e  $489\text{ cm}^{-1}$ , na solução de norbixina que está em acordo com a literatura (RIOS, MERCADANTE, 2004). Essas absorções são provavelmente atribuíveis às transições eletrônicas  $\pi-\pi^*$  características das ligações duplas conjugadas da norbixina (SCOTTER *et al*,. 2002). No espectro do extrato de ácido acético observou-se duas suaves bandas em 398 e  $425\text{ cm}^{-1}$ , porem o gráfico de UV-vis para o extrato etanólico apresentou três bandas com definições intermediarias em 392,431 e  $469\text{ cm}^{-1}$  referente as ligações insaturadas conjugadas dos carotenoides de norbixina. Segundo Briton *et al*, (1995) a maioria dos carotenóides absorvem luz na faixa de comprimento de entre 400 e 500 nm e o espectro na região do visível da maior parte dos

carotenóides aparecem não como um único pico, mas três, devido as transições do nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado.

## **5.2 Caracterização térmica**

Com a finalidade de avaliar a estabilidade térmica dos compósitos sintetizados, as amostras desses materiais foram analisadas e caracterizadas por Termogravimetria, em que acompanhou a perda de massa dessas amostras em função da temperatura. Os resultados obtidos, no que diz respeito ao polímero de melamina/amido com diferentes concentrações e com os extratos de norbixina estão apresentados na Figura 19.

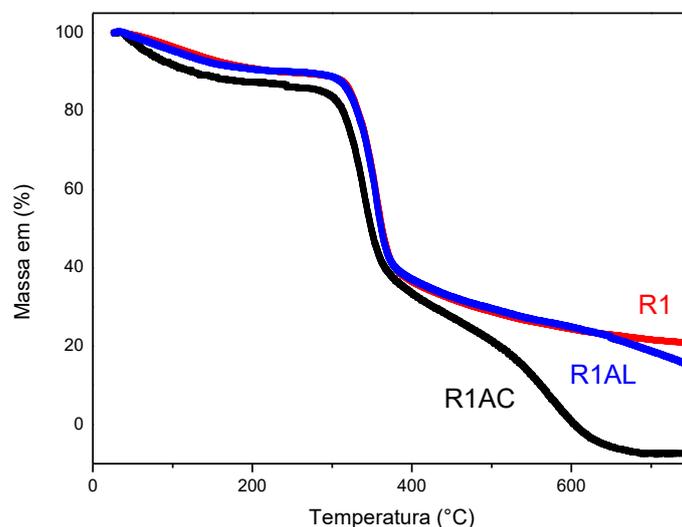
A análise termogravimétrica é uma análise fundamental na caracterização de filmes poliméricos, para R1 observou-se três estágios de temperaturas de decomposição, o primeiro evento sofreu perda de massa em torno de 11 % na faixa de 56 a 128 °C, característico da umidade presente na amostra. A partir desta temperatura, inicia-se o segundo estágio, que consiste na perda de massa rápida de 57 %, que é concluído na faixa de temperatura de 372 °C. Entretanto, ainda restaram 13,7% de resíduos da amostra, resultado de materiais que não conseguiram volatilizar a temperatura final de análise, tais como cinzas (CRUZ, 2015).

Para o polímero R1AL o primeiro estágio de 42 a 101 °C consiste na degradação de 13,8% dos produtos de menor massa molar que são susceptíveis à evaporação, como a molécula da água. Já no segundo estágio, observa-se a degradação térmica rápida dos produtos com maior massa molar, com a perda de massa molar de 56,3% na faixa de 318,4 a 359,5°C. A partir dessa temperatura até 615,5°C apareceu um terceiro estágio com a perda de massa lenta em torno de 34,5% e restando 1,2% de resíduos da amostra inicial.

Na análise térmica do polímero R1AC, o primeiro estágio acontece com a perda de 13,97% em temperatura próxima de 114 °C referente a eliminação de água e matérias voláteis. O segundo estágio tem uma perda de massa rápida de 50,32% pela degradação do amido, originada pela condensação de molécula de água, e perda dos grupos funcionais e quebra das ligações intermoleculares,

entre 318 a 357°C (SILVA, 2003). Uma perda de massa lenta de 39,88% inicia em 610°C referente a carbonização do amido, com a quebra de ligações entre carbonos afetando as cadeias poliméricas desse composto. Após essa temperatura obteve uma perda de 5,4% de massa residual.

**FIGURA 19.** Curvas de TGA (—) para compósito amido/melamina 1%(R1), (—) polímero amido/melamina 1% com extrato de ácido acético urucum (R1AC) e (—) polímero amido/melamina 1% com extrato alcoólico de urucum (R1AL). A temperatura de 25 a 1000°C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera oxidante (Ar).

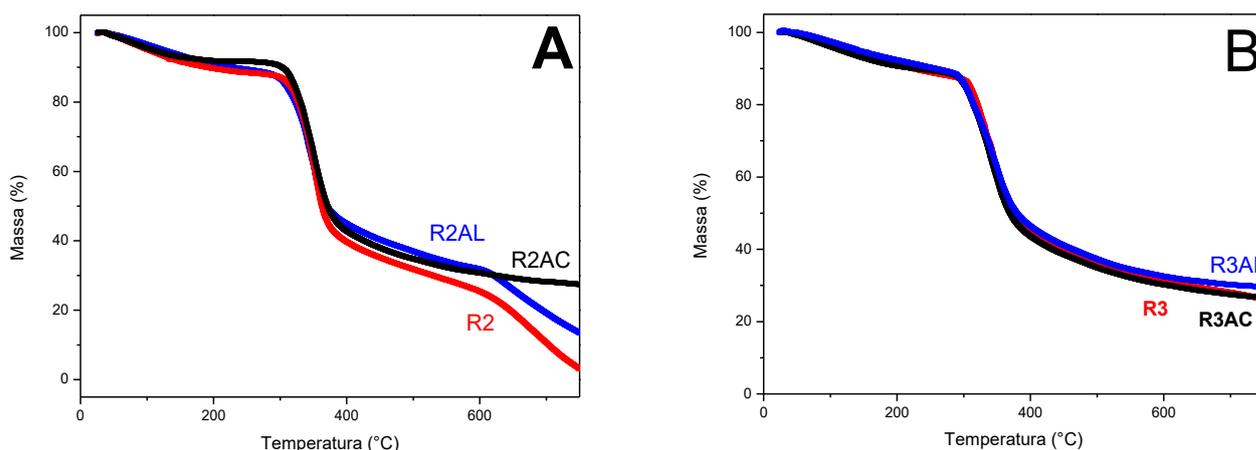


Observa-se na Figura 20, que as estabilidades térmicas da R2 e do R2AL são praticamente iguais até aproximadamente 176 °C. Até esta temperatura, ocorrem eventos térmicos relacionados à perda de água por evaporação (uma perda de massa de cerca de 11% para ambos os materiais). Para o R2AL, essa água residual pode estar associada ao seu caráter higroscópico da norbixina (LIMA et al., 2001), enquanto que para o R2 esse comportamento pode estar relacionado à perda de moléculas de água (desidratação) oriundas do processo de policondensação (LILI, 2007).

O segundo processo de degradação ocorre em cerca de 319 °C, para R2AL, enquanto que para o R2 esse mesmo processo tem início em aproximadamente 327°C. Nesse processo de decomposição do R2, o percentual

de massa remanescente cai para cerca de 50% e se dá até cerca de 367°C. Em seguida, ocorre a terceira decomposição, culminado com um percentual de massa remanescente em torno de 38,6% e temperatura de aproximadamente 756 °C para R2 e para R2AL tem uma perda de massa de 13% a temperatura de 406°C onde, a partir de então, verifica-se somente a presença das substâncias oriundas da decomposição das substâncias orgânicas liberadas durante a policondensação do polímero. (MIRANDA, 2015).

**FIGURA 20.** Curvas de TGA (—) para compósito amido/melamina 2 e 3%(R2 e R3), (—) polímero amido/melamina 2 e 3% com extrato de ácido acético urucum (R2AC e R3AC) e (—) polímero amido/melamina 2 e 3% com extrato alcoólico de urucum (R2AL e R3AL). A temperatura de 25 a 1000 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera oxidante (Ar).



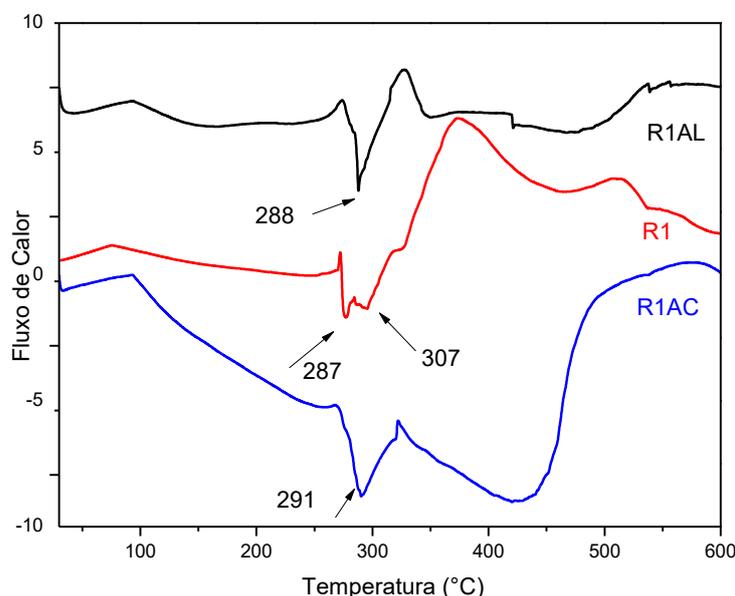
Para o polímero R2AC ocorre apenas duas etapas de decomposição a primeira em torno de 80°C com a desidratação do polímero com uma perda de massa de 8,4%. A segunda decomposição ocorre rapidamente com a maior perda de massa em torno de 48% na temperatura próxima de 371°C e deixando um resíduo de 18% até a temperatura final.

As curvas Termogravimétricas na Figura 20B, mostram que os polímeros com 3% de melamina (R3) se decompõem em três etapas. A primeira perda de massa de aproximadamente 11,9% para todas as amostras analisadas ocorre entre 37 e 194°C sendo atribuída a volatilização de solventes e água que compõem a formulação do polímero, o qual ocorre em uma única etapa. Após a

volatilização, a perda de massa rápida de 52% observada em todas as amostras é devida a decomposição térmica do compósito entre 304 e 377°C. A terceira etapa se caracteriza pela presença de resíduos as cinzas. Em todas as amostras, os resíduos apresentaram valores entre 11,36 a 23,65% num intervalo de temperatura de 412 a 576 °C (DOMINGO, 2014, SULAN, 2008).

A Figura 21 apresenta a curva de DSC do compósito de amido melamina 1% (R1) entre 287 a 307°C no qual pode ser observado pico endotérmico, relacionado ao processo de fusão da parte cristalina da matriz polimérica do amido e ao processo de evaporação da água residual, a qual atua como plastificante do material, e à decomposição total do anel melamínico aromático da resina melamina formaldeído presente no compósito (ALIC, 2012; SALUAN, 2008).

**FIGURA 21.** Curvas de DSC (—) para compósito amido/melamina 1%(R1), (—) polímero amido/melamina 1% com extrato de ácido acético urucum (R1AC) e (—) polímero amido/melamina 1% com extrato alcoólico de urucum (R1AL).



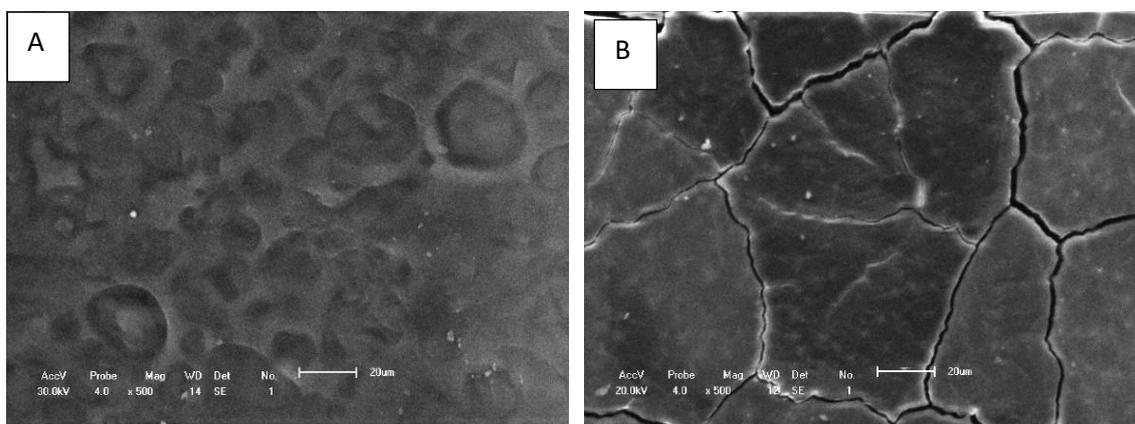
Um segundo evento, exotérmico, em aproximadamente 380°C refere-se pontos de reticulação química da resina melamínica e degradação dos principais componentes do compósito (MELO, 2001, PAIVA, 2001).

Para o compósito R1AL e R1AC apresentou-se picos endotérmicos em 288 e 291°C respectivamente sugerindo uma fusão do compósito nessa temperatura, e na sequência a sua decomposição (MARCOLINO, 2011).

### 5.3 Caracterização morfológica

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta que permite a obtenção de informações estruturais das amostras como a homogeneidade ou a presença de rupturas e falhas. A Figura 22 apresenta as micrografias das duas bases poliméricas separadas, os quais constituem as formulações das proporções mássicas dos referidos compósitos estudadas neste trabalho.

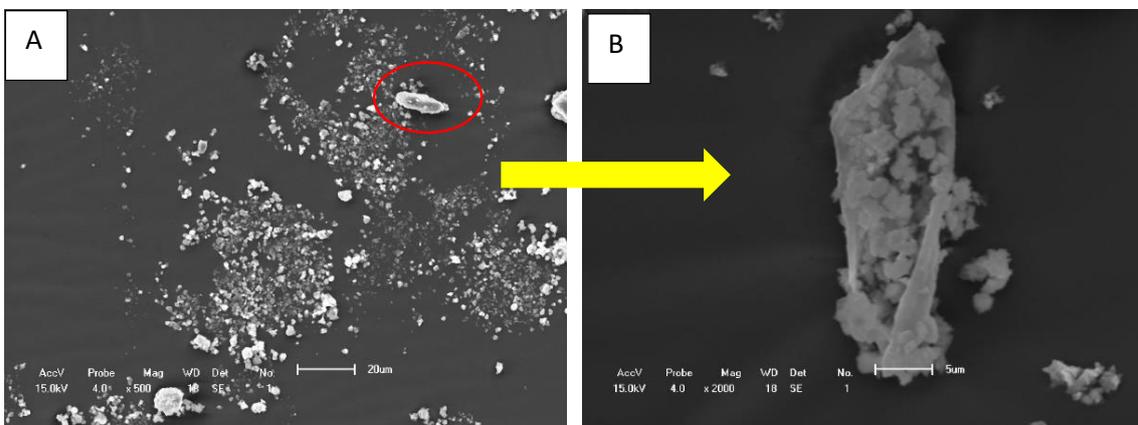
**FIGURA 22:** Micrografia da cola de amido (A) e resina melamina (B) com aumento de 500x.



A Figura 22A, refere-se a cola amido em meio aquoso. Observou-se uma superfície lisa e homogênea na cola produzido com amido, com formações circulares não uniformes de tamanhos variados e sem a formação de aglomerados. O aspecto visual do filme é transparente, sugerindo homogeneidade dos componentes nesta composição com característica termoplástica. A Figura 22B refere-se a resina melamina formaldeído onde apresentou-se uma estrutura com fissuras desordenadas característicos de um material termorrígido

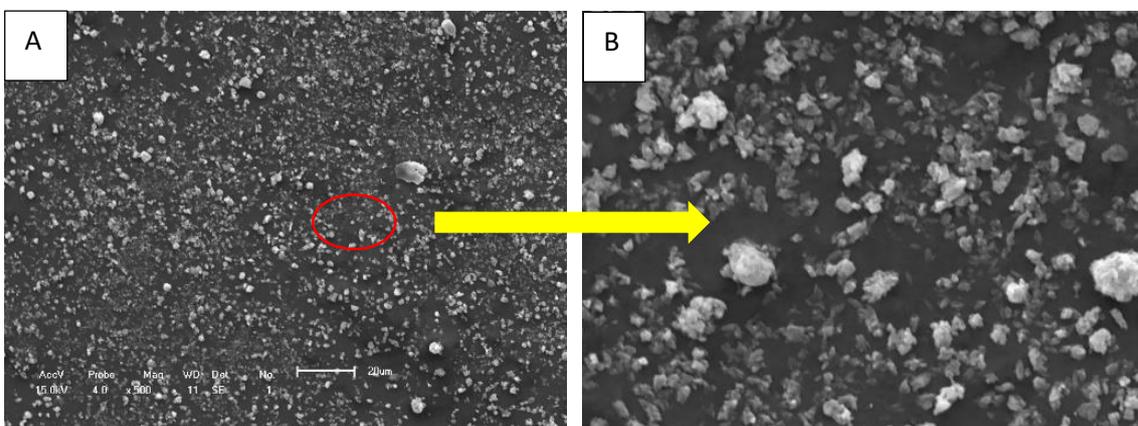
Na imagem gerada a partir da R1 (Figura 23: A e B), nota-se que as partículas dos materiais apresentam uma grande variedade de tamanhos e formas, sendo a maioria delas de agregada de forma aglomerada. No entanto, a maior ampliação da imagem (Figura 23 B) revela que muitas dessas partículas são, na realidade, compostas de pequenos grânulos de melamina e amido presente na resina e cola amilácia.

**FIGURA 23:** Micrografia do compósito Amido a 1% melamina (R1) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).



A Figura 24 refere-se a R1AL, nota-se que as partículas dos materiais apresentam uma grande variedade de tamanho e formas comparada com a matriz polimérica R1.

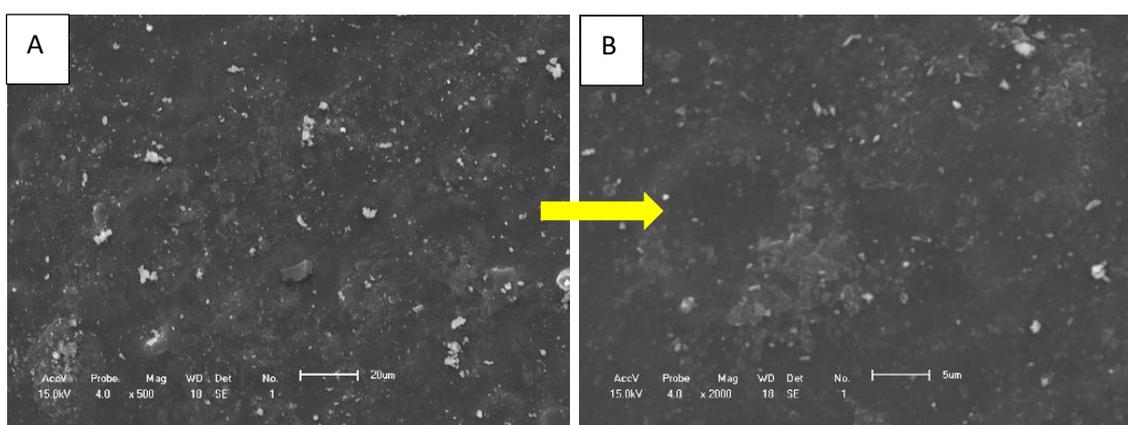
**FIGURA 24:** Micrografia do compósito Amido a 1% melamina em extrato etanólico de urucum (R1AL) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).



A grande quantidade de partículas (Figura 24B), são referentes a presença dos carotenoides, tais como bixina e norbixina presente no extrato de urucum e grânulos de melamina contido no processo de formação da resina.

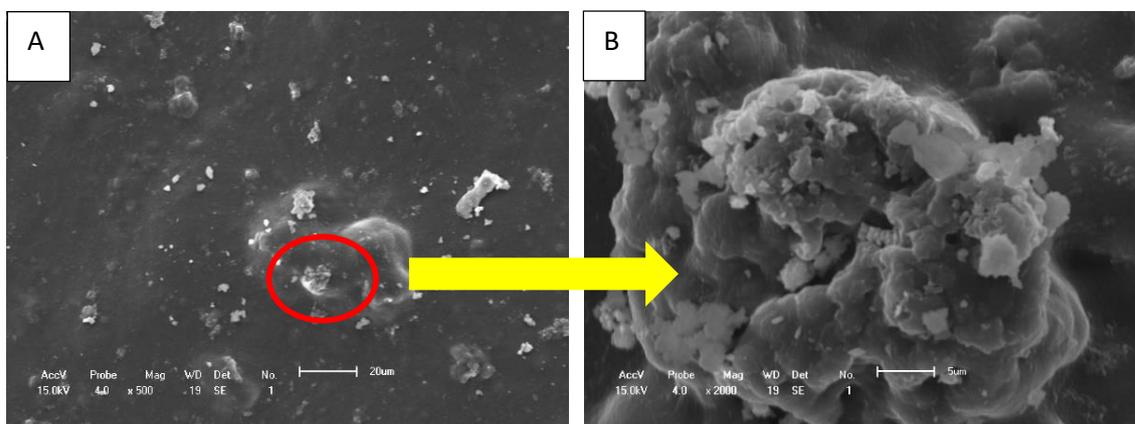
A Figura 25 refere-se a R1AC, apresentou-se aspecto visual uniforme e translúcido, com aumento 500x o compósito mostrou-se pequena quantidade de partículas com tamanho e formas variada, característico de filme relativamente homogêneo, devido ácido acético do extrato, promove uma melhora na etapa de polimerização da melamina e impede a aglomeração do amido presente no compósito.

**FIGURA 25:** Micrografia do compósito Amido a 1% melamina extrato ácido acético urucum (R1AC) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).



O compósito R1N adicionado a norbixina solida, apresentou-se características opacas e superfície uniforme. Na micrografia da Figura 26 observou-se que o compósito, apresentaram partículas com aspecto granular, com tamanho variados, agrupadas em formas variadas, com o aumento de 2000x a Figura 26B, mostra-se a presença de agregados, sulcos e lamelas. Onde essas características podem estar associadas ao estado de agregação da norbixina, que foi analisada sob a forma de pó.

**FIGURA 26:** Micrografia do compósito Amido a 1% melamina norbixina (R1N) com aumento de 500x (A) e com aumento de 2000x (B).



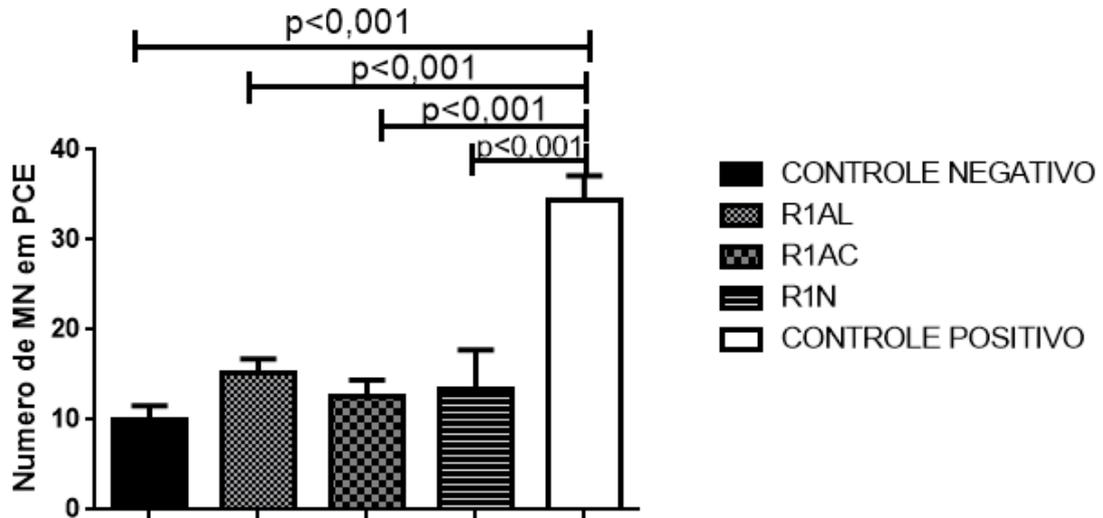
Entretanto, na análise micrográfica, não representa um padrão para o carotenoide bixina e norbixina, devido à variedade de solventes utilizados no processo de extração dos carotenoides (RIOS, 2004, MIRANDA 2015). Após a caracterização do filme amido/melamina estes foram utilizado nos processos de cicatrização em lesão de pele.

#### 5.4 Avaliação genotóxica

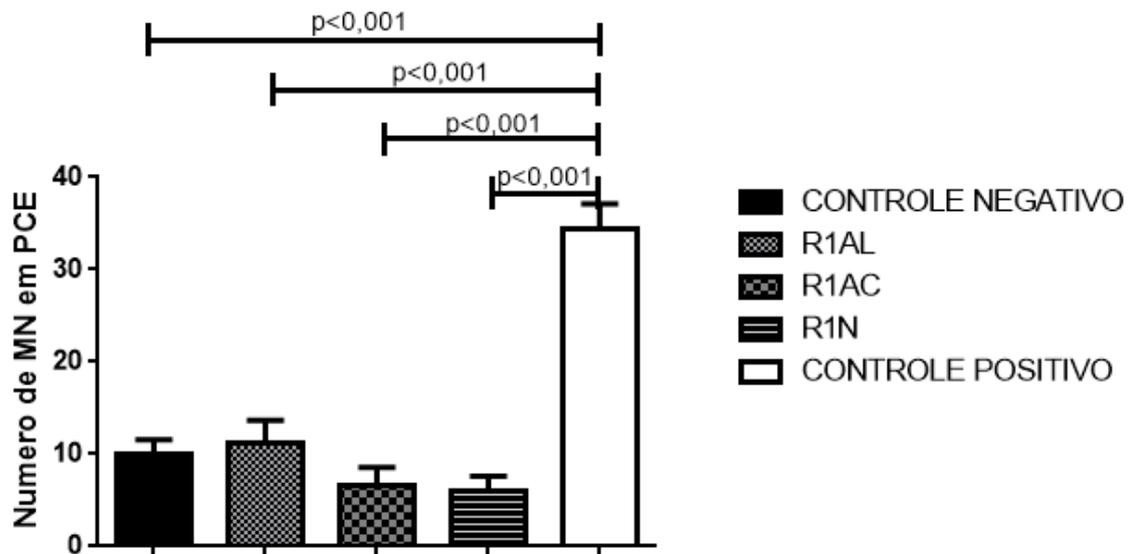
Este ensaio avaliou o potencial genotóxico do compósito amido/melamina com extrato de urucum, em células de medula óssea de *Rattus norvegicus*. A Figura 27 mostra que o processo de exposição aguda aos compostos (R1AL, R1AC E R1N) não aumentou significativamente a mutagenicidade quando comparado ao controle negativo. Quando comparado ao controle positivo, detectou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,001$ ).

O teste do micronúcleo crônico (Figura 28), mostrou que os compostos não alteram a incidência de eritrócitos policromáticos, sugerindo que a membrana não possui toxicidade genética em ratos. É que a membrana não possui toxicidade biológica. (SANTOS, 2008). O procedimento de exposição aos compostos não aumentou, significativamente, a mutagenicidade quando comparado ao controle negativo ( $p > 0,001$ ).

**FIGURA 27:** Resultados micronúcleo agudo, em camundongos com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).



**FIGURA 28:** Resultados micronúcleo crônico, em camundongos com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).

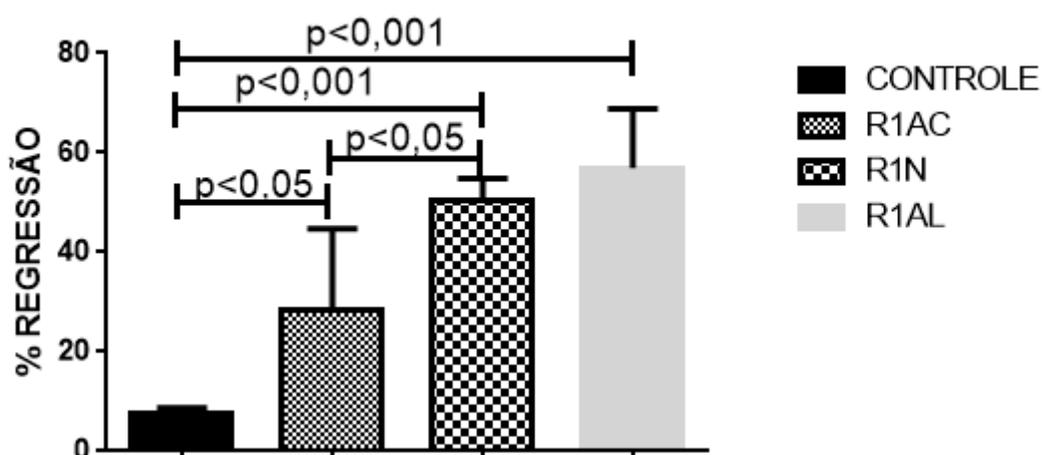


## 5.5 Avaliação da cicatrização

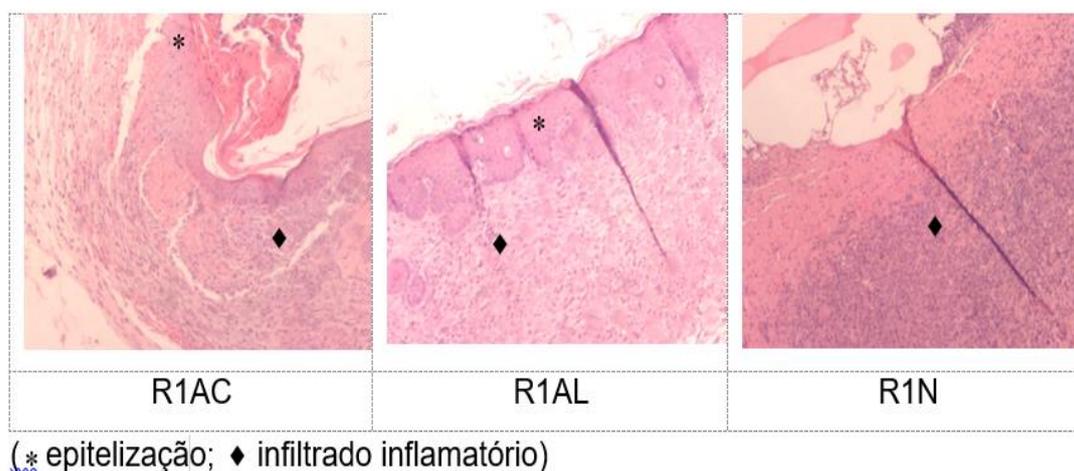
A avaliação histológica da cicatrização de feridas na área da cirurgia experimental dos grupos mostrou diferenças qualitativas detectáveis na coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE). A análise descritiva histológica baseou-se nos critérios, de infiltrado inflamatório, formação de tecido de granulação, deposição de fibras colágenas (fibrose) e reepitelização do tecido lesado.

No 7º dia após a lesão provocada na pele dos animais, observou-se na Figura 29, que todos os grupos tratados com compósito de extrato de urucum apresentaram diferença significativa se comparados ao grupo controle negativo, com  $p < 0,001$  para R1AL e R1N, e,  $p < 0,05$  para R1AC.

**FIGURA 29:** Resultados macroscópicos observados no 7º dia após a lesão provocada em ratos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão comparados ao grupo controle negativo.



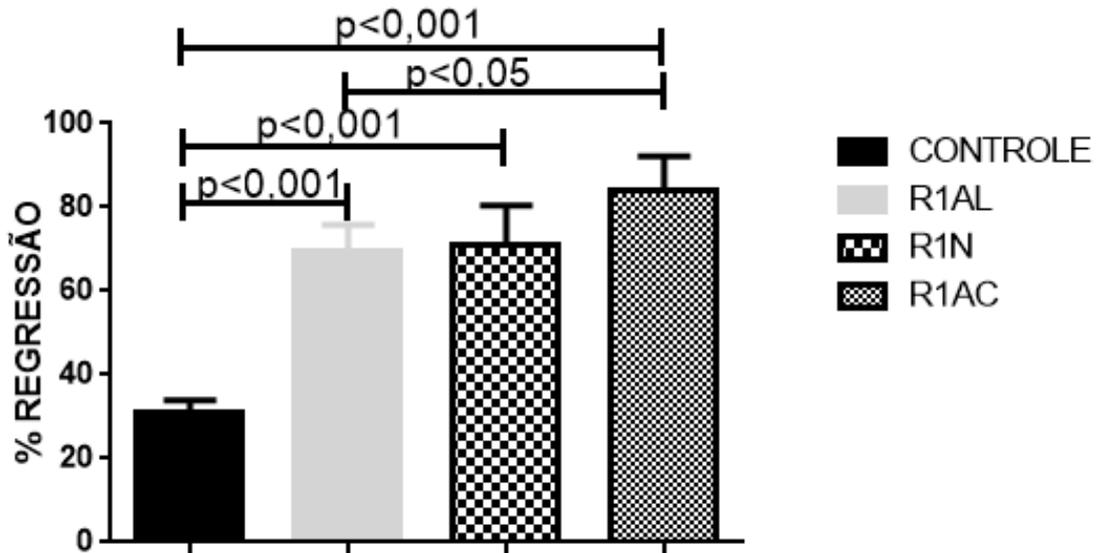
**FIGURA 30:** Resultados histológicos observados no 7º dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).



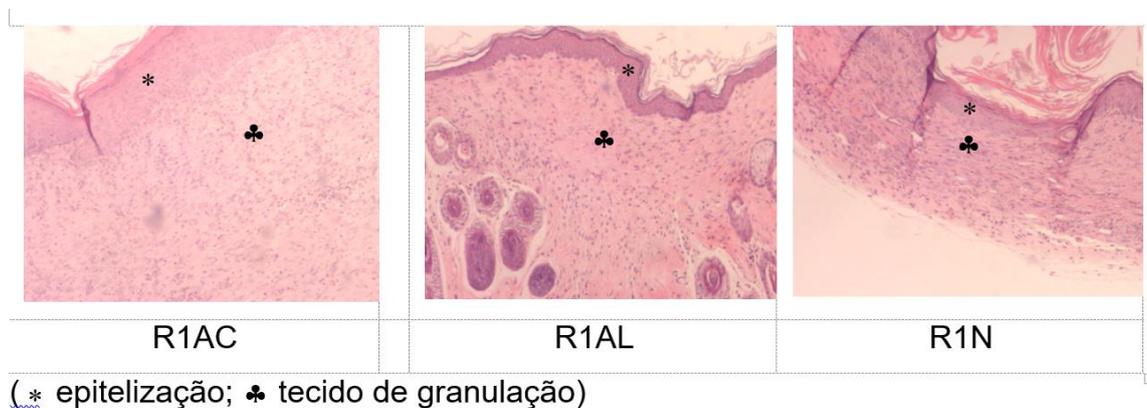
Na análise microscópica, (Figura 30) observou-se, nesta fase, a presença de infiltrado inflamatório intenso nas amostras de todos os grupos. Nas áreas das feridas dos animais do grupo R1AL, havia proliferação fibroblástica e de neovasos, com deposição inicial de colágeno e reepitelização avançada da epiderme. No grupo R1AC, foi possível observar formação de tecido de granulação imaturo e sinais de reepitelização ocorrendo das bordas íntegras da epiderme, a qual apresentou-se recoberta por crosta de espessura variável, composta por material fibrino-hemorrágico e restos necróticos.

No grupo R1N, não foi verificada sinais de reepitelização, mas havia presença de tecido de granulação imaturo, permeado por uma matriz extracelular edemaciada, com deposição de inicial de colágeno. Na fase da fibroplasia que ocorre após 48 horas da lesão, os fibroblastos se multiplicam e produzem o colágeno. Há também nesta fase, intensa proliferação endotelial, tendo como consequência a formação de tecido de granulação (CAMPOS, 2007).

**FIGURA 31:** Resultados macroscópicos observados no 14º dia após a lesão provocada em ratos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). Os resultados foram expressos em médias±desvio padrão comparados ao grupo controle negativo.



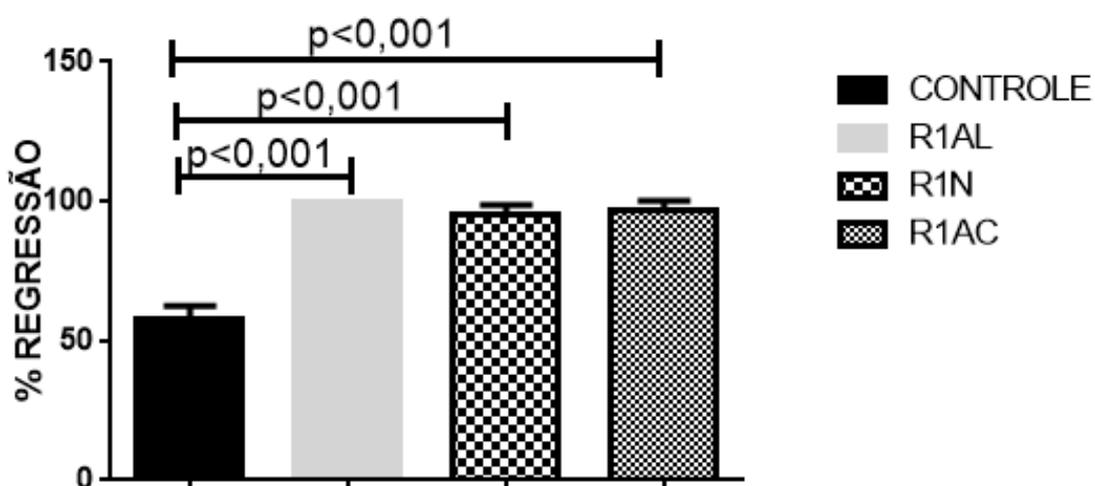
**FIGURA 32:** Resultados histológico observados no 14º dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).



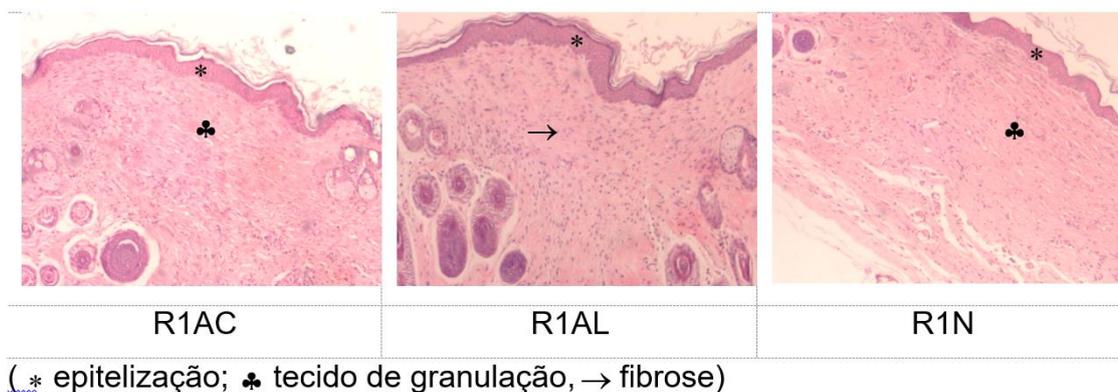
Observou-se a Figura 31, que passados 14 dias que os grupos tratados apresentaram redução da ferida com diferença significativa ( $p < 0,001$ ) se comparados com o grupo controle. No entanto, só houve diferença dentro dos grupos tratados apenas entre R1AL e R1AC ( $p < 0,05$ ). Nos extratos de urucum já foram identificados a presença de flavonoides, em geral, quando ingeridos, interferem em alguns processos fisiológicos do organismo, como a absorção de ferro e de vitaminas, estimulando a cicatrização, apresentando ação anti-inflamatória, regenerativa de cartilagens, ossos e auxiliam na vasodilatação (CHEN; ZANG; XIE, 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006).

No 14º dia, todos os grupos exibiram reepitelização total da epiderme. Também, se observou que a área da cicatriz estava preenchida por tecido de granulação maduro, permeado por fibroblastos e exsudato inflamatório moderado. Porém, no grupo R1AL, a cicatriz mostrou-se mais densa, com infiltrado inflamatório leve (Figura 32).

**FIGURA 33:** Resultados macroscópicos observados no 21º dia após a lesão provocada em ratos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC). Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão comparados ao grupo controle negativo.



**FIGURA 34:** Resultados histológico observados no 21<sup>o</sup> dia após a lesão provocada em camundongos e tratados com compósito em extrato alcoólico (R1AL), compósito em norbixina (R1N) e compósito em extrato ácido acético (R1AC).



No 21<sup>o</sup> dia observou-se que não houve diferença entre os grupos tratados, no entanto, todos ainda apresentaram diferença significativa ( $p > 0,001$ ) se comparados ao grupo controle negativo (Figura 33). Batista et al. (2010) estudou a ação da polpa de pequi sobre feridas cutâneas em ratos, sendo observada aceleração do processo de cicatrização. Esta polpa contém quantidades expressivas de  $\beta$ -caroteno, licopeno, carotenoides totais (BRANDÃO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006) e compostos fenólicos (LIMA et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2008).

Após 21 dias, verificou-se cicatrização da área lesada em todas os animais do estudo; sobretudo nas amostras do grupo R1AL, o qual demonstrou matiz extracelular mais densa quando comparada aos demais grupos (Figura 34).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A construção do filme polimérico de amido/melamina com extrato de *Bixa orellana* apresenta características físico-química melhores que as bases poliméricas separadas, cola amilácia e resina melamina formaldeído (MF).

A partir da gelatinização do amido forma-se a cola de amido. A resina de Melamina e formol é obtida a partir da reação de melamina e formol, pela adição de ácidos.

A partir das sementes de urucum (*Bixa Orellana*), obteve-se os extratos com etanol, ácido acético e por hidróxido de sódio com neutralização. Os extratos apresentaram boa adesão nos filmes de compósitos (R1Al, R1AC e R1N).

Os compósitos obtidos com a mistura de “cola de amido”, resina de Melamina e extratos de semente de *Bixa orellana*, apresentaram-se como filmes finos e maleáveis.

A caracterização físico química dos compósitos mostra a presença dos constituintes utilizados na formação dos mesmos.

Aplicação dos filmes compósitos amido/melamina com extrato de urucum, revelaram-se como agente cicatrizante em lesão de pele.

O filme de compósito amido/melamina com extrato de urucum não é citotóxico, portanto, é segura para aplicações in vivo.

Este trabalho apresenta grandes contribuições para a produção biotecnológica regional, por ser um estudo sobre a utilização de compósito na cicatrização de pele obtidos a partir de produtos naturais, o urucum, o amido e melamina, que são de fácil aquisição e baixo custo.

## REFERENCIAS

ALIC, B., SEBENIK, U., & KRAJNC, M. Microencapsulation of butyl stearate with melamineformaldehyde resin: Effect of decreasing the pH value on the composition and thermal stability of microcapsules. **Polymer Letters**, 6, 826–836, 2012.

ALVARES S. **Contribuição para o estudo histométrico e histoquímico do processo de reparação de lesão obtidas experimentalmente na pele de ratos albinos**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo.1972

ALVES, R. W. **Extração e purificação de corantes de urucum**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 2001.

AMERICAN CYANAMID COMPANY. KIRSCH, A. J. 50 Year of Amino Coatings Resins,. Philadelphia, 1985 - Library of Congress Catalog Card no 86-72839. Brasileiro Filho G. Patologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2000.p.62-5.

ANTUNES, Lusânia Maria Greggí and BIANCHI, Maria de Lourdes Pires. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Rev. Nutr.** [online]. 2004, vol.17, n.1, pp.89-96. ISSN 1415-5273. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000100010>.

ATKINS, Peter., **Princípios de química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Peter Atkins, Lorreta Jones; tradução técnica: Ricardo Bicca deAlencastro. – 5ª ed. – Porto Alegre: Bookman, 2012.

BALBINO C.A., PEREIRA L.M. & CURI R.. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazil J. of Pharmaceutic Science**. 41(1):27-51, 2005.

BARBUI A. 2006. History of wounds healing, p.25-78. In: Brunicardi F.C., Seymour I., Schwarts D.L., Dun D.K. & Andersen R.E. Schwartz's Surgery. Companion handbook, Ontario.

BECHARA, E. J. H.; STEVANI, C. V., em anais do 7º Congresso Internacional de Tintas, São Paulo, 2001, Vol. I.

BELIVACQUA RG, MODOLIN MLA, ALMEIDA CG, CHAPCHAP P. Cicatrização. In: Goldenberg S, Bevilacqua RG, editores. **Manual de Cirurgia**. 2ª ed. São Paulo: EPU/ Springer; 1981. p. 99-116.

BERRY D.B. & SULLINS K.E. 2003. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. **Am J Vet Res.** 64:88–92.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. 3. ed. rev. atual. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 228 p.

BRANSKI R.C., ROSEN C.A., VERDOLINI K. & HEBDA P.A. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice.** 19(2):283-289, 2005.

CAMPOS, A, C. L.; BORGES, B. A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. ABCD, **arq. bras. cir. dig.**, São Paulo, v. 20,n. 1,p. 51-58, Mar. 2007. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-67202007000100010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202007000100010&lng=en&nrm=iso)>. access on 25 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>.

CAPELLA, S.O.; TILLMANN, M.T.; FÉLIX, A.O.C.; FONTOURA, E.G.; FERNANDES, C.G.; FREITAG, R.A.; SANTOS, M.A.Z.; FÉLIX, S.R.; NOBRE, M.O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas; estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 68, N. 1, p. 104-112, 2016.

CARDOSO, E. S. **Síntese e caracterização de poliéster obtido a partir do produto natural norbixina, Glicerol e Anidrido Ftálico.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Materiais, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Teresina, 2017.

CARVALHO P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos. 72p, 2002.

CARVALHO, J. F. R. P. de; CARVALHO, C. R. de; OTONI, W. C. Regeneração in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 887-895, Dec. 2005 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01006762200500060007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01006762200500060007&lng=en&nrm=iso)>. Access on 25 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000600007>.

CAVALCANTE L.C., MOREIRA M.C., MOTA O.M.L., TURATTI E., VIANA F.A.C. & PEREIRA S.L.S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Braz J Periodontol.** 22(1):69-73, 2012.

CHAN, E. Y., GRIFFITHS, S. M., & CHAN, C. W. "Public-health risks of melamine in milk products," **The Lancet**, 372, 1444-1445, 2008.

CHENA, C.; YANGA, S.; GUOB., Y.; SUNA, C.; GUS, C.; XUC, BIN. Photolytic destruction of endocrine disruptor atrazine in aqueous solution under UV irradiation: Products and pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v.172,p.675-684, 2009.

CHU, G.; JONES, F. N. Low-Temperature Curing Higher-Solids Polyester Coatings with Melamine-Formaldehyde Resin Crosslinkers. **Journal of Coatings Technology**, v.65, n. 819, p. 43-48, 1993.

COELHO, A.M.S.P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (urucum). **Revista Lecta** [Bragança Paulista], v.21, n.1/2, p.47-54, 2003.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

COSTA, C.K. **Estudo Fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e Aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2007.

COTRAN RS, KUMAN V, COLLINS T. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 95-9.

CRUZ, D. N. **Síntese e caracterização de poliéster obtido a partir do produto natural norbixina e propileno glicol**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Materiais, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Teresina, 2015.

CUNHA, F.G. **Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leite de jorro**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

DÁRIO G.M. **Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos**. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

DEALEY C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. São Paulo: Atheneu; 2001. 216p.

DEMCZUK, J. B. **Estabilidade e aplicação do corante de urucum no estado do Paraná**. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação. Curitiba, 2012. 132 f, 2012.

DI MASCIO, P.; DEVASAGAYAM, T.P.; SIES, H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Trans.**, v.18, p.1054-1056, 1990.

DOMINGO, E. DO C. **Determinação de melanina em leite em pó por infravermelho próximo e espectrometria de massas / Elisângela do Carmo Domingo**. – Lavras: UFLA, 2014. 80 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

DORNELAS, C. S. M. **Estudo de maturação, métodos de descachopamento e determinação do teor de bixina em sementes de urucuzeiro**. Tese de Doutorado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

EHRlich H.P. & DIEZ T. Role for gap junctions intercellular communications in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**. 11:481-489, 2003.

ELIAS, M.E.A.; SCHROTH, G.; MACEDO, J.L.V.; MOTA, M.S.S.; D'ANGELO, S.A. Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana* L.) in agroforestry on an Amazonian ferralsol. **Experimental Agriculture**, v.38, p.277-289, 2002.

FERREIRA, Cláudia Natália et al . O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo , v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-)

84842010000500016&lng=en&nrm=iso>. access  
on 25 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>.

FRANCO, C. F. O.; FABRI, E. G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLI, M. H.; HARDER, M. N. C.; RUCKER, N. G. A. Urucum: sistemas de produção para o Brasil. João Pessoa: **EMEPA**, 2008.

FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINELLI, I. S. C. Urucum: agronegócio de corantes naturais. João Pessoa: **EMEPA**, 2002.

FRANCO, C. M. L. et al. **Propriedades do Amido. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido.** Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1.

GAMAGE, N. J. W.; HILL, D. J. T.; LUKEY, C. A.; POMERY, P. J. Factors Affecting the Photolysis of Polyester-melamine Surface Coatings. **Polymer Degradation and Stability**, v.81, p. 309-326, 2003.

GARCIA, D.; SANDLER, S. R.; BRENNAN, J.; BOUSQUET, O. Evaluation of Alkane Sulfonic Acid Catalysts and Derivates for Curing Activity in a Melamine/Acrylic Polyol Coating Formulation Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Coatings Technology**, v.72, n. 908, p. 89-93, 2000.

GARROS, I. de C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir. Bras.** [online]. 2006, vol.21, suppl.3, pp.55-65. ISSN 0102-8650. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000900009>.

HAMADA, S.; OHYAMA, W.; TAKASHIMA, R.; SHIMADA, K. MATSUMOTO, K.; KAWAKAMI, S. Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 780-781, p. 2–17, 2015.

HARRIS AK, STOPAK D, WILD P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. **Nature**. 1981; 290:249-51.

HAYASHI, M. J. T. MACGREGOR, D. G. GATEHOUSE, I. D. ADLER, D. H. BLAKEY, AND S. D. DERTINGER. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation research**, v. 312, n. 3, p. 293–304, 1994.

HAYASHI, M. T. MORITA, Y. KODAMA, T. SOFUNI, AND M. ISHIDATE JR. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation research**, v. 245, n. 4, p. 245–249, 1990.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. Natural Food Colorants. 2. ed. Glasgow: **Blackie Academic & Professional**, 1996. p. 40-79.

HILL, L. W.; LEE, S. Effect of Melamine-Formaldehyde Structure on Cure Response of Thermoset Coatings. **Journal of Coatings Technology**, v.71, n. 897, p. 127-133, 1999

HIRAYAMA, T.; URBAN, M. W. Distribution of Melamine in Melamine/Polyester Coatings; FT-IR Spectroscopic Studies. **Progress in Organic Coatings**, v.20, p. 81-96, 1992.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

KOUL, V. K.; KOUL, S.; TIKOO, C. L. Process optimization for extraction and purification of bixin from annatto. **Indian Journal of Chemical Technology**, New Delhi, v. 10, p. 545-547, 2003.

LAWRENCE WT, NORTON JA, SPORN MB, GORSCHBOTH C, GROTENDORST GR. The reversal of na Adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors. **Ann Surg**. 1986; 203:142-7.

LEHNINGER, Albert Lester; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LILI, ZHAO. **Síntese e caracterização do copolímero tribloco anfifílico biodegradável poli(L,L-lactídeo-stat- $\epsilon$ -caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(L,L-lactídeo-stat- $\epsilon$ -caprolactona)**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2007.

LIMA, L. R. P. et al. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LUKEY, C. A.; HILL, D. J. T.; POMERY, P. J. UV Photolysis of Melamine Formaldehyde Crosslinkers. **Polymer Degradation and Stability**, v.78, p. 485-490, 2002.

MAJOLO, C. **Atividade Antibacteriana in vitro de Diferentes Acessos de *Bixa orellana* L. (Urucum) e sua Relação com o Teor de Bixina Presente nas Sementes**. Dissertação de em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2009.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P., MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **Anais Bras Dermatol**.78(4):393-408, 2003

MARCOLINO, V. G.M. ZANIN, L.R. DURRANT, M. T. BENASSI, G. MATIOLI, Interaction of curcumin and bixin with  $\beta$ -cyclodextrin: complexation methods, stability, and applications in food, **J. Agric. Food Chem**. 59 (2011) 3348-3357.

MARCOLINO, V. **Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2008).

MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Caracterização de um Novo Carotenóide Minoritário de Urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, 21(2): 193-196, maio-ago, 2001.

MIRIAN SOUSDALEFF, GRACIETTE MATIOLI, Microencapsulação de norbixinato de potássio e curcumina com maltodextrina: avaliação da estabilidade e aplicação em alimentos, **Food Technology and Biotechnology**.2011

MODOLIN M, BEVILACQUA RG. Cicatrização das feridas: síntese das aquisições recentes. **Rev Bras Clin ter**. 1985; 14:208-13.

MONETTA L. **Análise evolutiva do processo de cicatrização em úlceras diabéticas, de pressão e venosas com uso de papaína** (Dissertação de mestrado em Enfermagem). Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1998. 192f.

MOREIRA, V. S.. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de urucum (*Bixa orellana* L.) in natura e encapsulado**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2013. 87p.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y. K.. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 24, n. 3, p. 403-406, Sept. 2004 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612004000300018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000300018&lng=en&nrm=iso)>. access on 25 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000300018>

NODA, T. et al. Physicochemical properties and amylopectin structure of large, small and extremely small potato starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 245-251, 2005.

NOGUEIRA, R.M.B., KITAMURA E.A. & AGUIAR O.M. 2005. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. **Nos Clín.** 8(43):25-28.

NURDEN, A. T, NURDEN, P, SANCHEZ, M, ANDIA, I. Platelets and wound healing, **Fort Biocience**, may 1;13: 3532-48, 2008

O'HANLON-NICHOLS T. Commonly asked questions about wound healing. **Am J Nurs**, New York 1995 abr; 95(4): 22-4.

OLIVEIRA, J. S. de. **Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (Bixa orellana L.)** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005. 215p.

PARENTE, LML; SILVA, MSB; BRITO, LAB; LINO-JÚNIOR, RS; PAULA, JR; TREVENZOL, L. MF. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v.11, n.4, p.383-391, 2009

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010

PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 53-57, 1999.

RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z. Optimization of the conditions to obtain bixin crystals and for extraction and saponification to quantify bixin in extruded snacks by HPLC. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2004.

ROCHA JUNIOR A.M., OLIVEIRA R.G., FARIAS R.E., ANDRADE L.C.F & AERESTRUP F.M. 2006. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, 81(2):150-156.

ROCHA, Thaís Souza; DEMIATE, Ivo Mottin and FRANCO, Célia Maria Landi. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca (Arracacia xanthorrhiza). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]. 2008, vol.28, n.3, pp.620-628. ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300018>.

RODRIGUES, S. et al. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. **Journal of functional biomaterials**, v. 3, p. 615-641, 2012.

SALUAN, F., VROMAN, I. (2008). Influence of core materials on thermal properties of melamine-formaldehyde microcapsules. **European Polymer Journal** 44, 849-860.

SANCHEZ-NETO, R., BARONE, B., TEVES, D.C., SIMÕES, M. J, NOVO, N. F., JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cir Bras.** 1993; 8:18-23.

SANDI, M. P., CUEN, M. BACERRA, R. El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **Biodiversitas**, Año 7, nº46, 7-11, enero 2003.

SANTANA, R. C., Análise instrumental aplicada a polímeros: material de apoio à disciplina de análise instrumental aplicada a polímeros. Projeto UFRGS EAD (2009). Disponível em: [https://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise\\_instrumental/index.html](https://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/index.html) (acesso: Janeiro/2017)

SANTOS MOREIRA, VIVIANE, HOJO REBOUÇAS, TIYOKO NAIR, BATISTA DE MORAES, MARIA OLÍMPIA, REBOUÇAS SÃO JOSÉ, ABEL, VIANA DA SILVA, MARCONDES. Atividade antioxidante de urucum (Bixa orellana L.) in natura e encapsulado. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha** [en línea] 2014, 15 (Diciembre-Sin mes) : [Fecha de consulta: 14 de enero de 2019] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81333269011> ISSN 1665-0204

SANTOS, G.C.; MENDONÇA, L.M.; ANTONUCCI-PASSOS, G.A.; ANTUNES, L.M.G.; SANTOS, A.C.; BIANCHI, M.L.P. Efeitos do extrato de urucum sobre a citotoxicidade e genotoxicidade da cisplatina em células PC12. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.20, n.2, p.108, 2007.

SANTOS. L. F. et al, Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. **Dyes and Pigments** 110 (2014) 72 e79.

SAVIETO, Roberta Maria; SILVA, Maria Júlia Paes da. Toque terapêutico na cicatrização de lesões da pele de cobaias. **Rev. bras. enferm.**, Brasília , v.

57, n. 3, p. 340-343, June 2004 . Available from  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672004000300017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672004000300017&lng=en&nrm=iso)>. access  
on 25 Mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672004000300017>.

SCHEEPERES, M.L. (1993). Investigation of melamine-Formaldehyde cure by Fourier transform Raman spectroscopy. **Vibrational Espectroscopy**, 6, 55-59.

SHUHAMA, I. K.; AGUIAR, M. L.; OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **Journal of Food Engineering, Kidlington**, v. 59, n. 1, p. 93-97, 2003.

SILVA, MANOEL LUIZ da **Extração de corantes de urucum (Bixa orellana L.) utilizando sistema de recirculação de solventes**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2006

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C. Fatores que Influenciam a Reação de Saponificação dos Pigmentos do Urucum. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 33, Edição Especial, p.1892-1897, 2009.

SILVA, P.I.; NACHTIGALL, AM; STRINGHETA, PC. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (Bixa orellana L.), **Ciências Agrotécnicas Lavras**, v. 33, Ed. Especial, p. 1892-1897, 2009.

SILVESTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 7th ed., LTC, 2007

SIMÕES MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Jr. L, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Rev Paul Med**. 1986; 104:132-5.

SIMÕES MJ, Uzunian A, Mora AO, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. **Rev Paul Med**. 1985; 103:123-6.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.219-231, 2003. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T6R-47P91J18&\\_user=687358&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000037899&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687358&md5=67bd8088b31cbd3db1b2c8039fb2d091](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6R-47P91J18&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=67bd8088b31cbd3db1b2c8039fb2d091). Doi:10.1016/S0308-8146(02)00416-8.

SINHA, S.; Bhadra, S.; Khastgir, D. (2009). Effect of dopant type on the properties of polyaniline. **Journal of Applied Polymer Science**, 112, 5, 3135-3140.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **J Sup Flu**, v. 100, p. 175-183, 2015.

TAHAM, T.; SILVA, D. O.; BARROZO, M. A. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. **Sep Pur Technol.**, v.158, p.313-321, 2016.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, v. 130, n. 1-2, p. 39-54, 2006.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e Determinação, por CLAE, de Bixina e Norbixina em Coloríficos, **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(3): 310-313, set. /dez. 2001.

TRCHOVÁ, M., MORÁVKOVÁ, Z., ŠEDĚNKOVÁ, I., STEJSKAL, J. (2012). Spectroscopy of thin polyaniline films deposited during chemical oxidation of aniline. **Chemical Papers**, 66, 415–445, DOI:10.2478/s11696-012-0142-6.

TSVETKOV, V.E.; ZUEVA, M.Y. The influence of the content of melamine on the synthesis and modified impregnating oligomers. **Polymer Science**, 5, 157-159, 2012.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 2006, vol.33

WILSON, R. C.; PFOHI, W. F. Study of Crosslinking Reactions of Melamine-Formaldehyde Resins with Hydroxyl Functional Polyester by Generalized 2-D Infrared Epectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 23, p. 13-22, 2000.

YAOZU LIAO, JENS WEBER, AND CHARL F. J. FAUL. Fluorescent Microporous Polyimides Based on Perylene and Triazine for Highly CO<sub>2</sub>-Selective Carbon **Materials Macromolecules**, 48, 2064, 2015.

YUAN L., LIANG G-Z., XIE J-Q., HE S-B. Synthesis and characterization of microencapsulated dicyclopentadiene with melamine–formaldehyde resins. **Colloid and Polymer Science**, 285, 781–79. DOI: 10.1007/s00396-006-1621-5, 2007.

# APÊNDICE



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*AVALIAÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE AMIDO COM URUCUM (BIXA ORELLANA L) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E POSSÍVEIS EFEITOS NA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO (RATOS MUS MUSCULUS).*" Protocolo número 0124/2017, sob responsabilidade de *ROSEMARIE BRANDIM MARQUES*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11,794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

VIGENCIA DO PROETO	10 MESES
ESPÉCIE /LINHAGEM	RATO HETEROGÊNICO/WISTAR
N. DE ANIMAIS	50
PESO/IDADE	250G/2-3 MESES
SEXO	MACHO
ORIGEM	BIOTÉRIO FACIME

TERESINA, 18 DE OUTUBRO DE 2017

  
MÉDICO VETERINÁRIO -CRMV 648

Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho  
Coordenador CEUA-UESPI  
port. 1347

## REIVINDICAÇÕES

### 1) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.* caracterizado por ser realizado em três

fases, onde são obtidas as três camadas do filme cicatrizante (FC), assim:

- ✓ para a preparação da cola de amido (I), uma massa de amido (1), entre 80 e 98% da massa do produto, é pesada (E1) e à ela é adicionada (E2) água destilada (A), em um volume referente ao dobro da massa, sendo a mistura (2) homogeneizada (E3); então, a mistura homogeneizada (3) ser aquecida (E4), sobre uma chapa de aquecimento, em um processo lento e controlado, sob agitação constante para evitar a formação de aglomerados de amido, até 60°C, quando há gelatinização (E5), sendo a camada de amido (CA) obtida e reservada;
- ✓ para a preparação do metilol de melamina (II), são adicionados (E6) em um recipiente, sob agitação constante, a melamina (4) e a solução de formol (5), sendo essa constituída de 37% em massa de formaldeído solubilizada em água destilada (A), numa proporção molar de 1:6, melamina (4) : solução de formol (5); sendo a mistura (6) aquecida (E7), sob agitação constante, até 60°C, para a obtenção de uma solução transparente, a camada metilol melamina (CM);
- ✓ para a obtenção do filme de amido – metilol melamina – extrato de *Bixa orellana L.* (III), a camada de amido (CA) e a camada de metilol melamina (CM) são adicionadas (E8) ao recipiente, sendo mantidas sob agitação e à temperatura ambiente, para homogeneização (E9); então, o extrato de *Bixa orellana L.* (EB) é adicionado (E10) à mistura homogeneizada (7), numa proporção entre 1 e 10% em massa de amido, sendo a nova mistura (8) agitada (E11) para incorporação total do componente; posteriormente, a mistura obtida (9) é vertida (E12) em uma placa estéril, e, em seguida, seca (E13) em estufa, a 35°C, sendo obtido o filme cicatrizante (FC) em placa de Petri.

- 2) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.***, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar três camadas, as quais são adicionadas, obrigatoriamente, na ordem a seguir, para a obtenção do filme cicatrizante (FC): camada de metilol melamina (CM), camada de amido (CA) e camada de extrato de *Bixa orellana L.* (CB).
- 3) FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.***, obtido de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser constituído em:
- ✓ camada de metilol melamina (CM): numa proporção entre 1 e 10% da massa do produto;
  - ✓ camada de amido (CA): numa proporção entre 80 e 98% da massa do produto, e;
  - ✓ camada de extrato de *Bixa orellana L.* (CB): numa proporção entre 1 e 10% da massa do amido.
- 4) APLICAÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.***, obtido de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** se dar localmente, sobre as lesões cutâneas a serem tratadas.

## RESUMO

### **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.*, FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE *Bixa orellana L.* E SUA APLICAÇÃO COMO CICATRIZANTE EM LESÕES CUTÂNEAS**

A presente invenção descreve um processo de obtenção de filme cicatrizante (FC), a partir de um processo com simples etapas de execução, o qual é composto por três fases de execução (I, II e III), onde um compósito obtido da polimerização de melamina, a camada de metilol melamina (CM), na presença de amido solúvel, camada de amido (CA), é adicionado de extrato de *Bixa orellana L.* (EB), sendo, em seguida, colocado sobre uma placa de Petri, para secagem (E13) e formação do filme cicatrizante (FC), apresentando como agentes ativos a bixina e a norbixina, presentes no extrato do urucum (EB), que são considerados agentes cicatrizantes; dessa maneira, a aplicação do filme em lesões cutâneas promove a aceleração e melhora do processo de cicatrização.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA**  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10*  
*Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 14:04 horas do dia 27/02/2019, sob o número de Protocolo do INPI: 870190019953 o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado “**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE Bixa orellana L., FILME AMIDO-MELAMINA COM EXTRATO DE Bixa orellana L. E SUA APLICAÇÃO COMO CICATRIZANTE EM LESÕES CUTÂNEAS**”, com o número **BR 10 2019 004032-7**, desenvolvida pelos inventores:

JOSÉ RIBEIRO DOS SANTOS JÚNIOR  
JAIRELDA SOUSA RODRIGUES

Teresina, 27 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos

*Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia*