



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

ANA LUIZA RESENDE PIRES

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS FLEXÍVEIS DENSOS E
POROSOS VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS PARA
POTENCIAL APLICAÇÃO EM LESÕES DE PELE**

**DEVELOPMENT OF DENSE AND POROUS FLEXIBLE DEVICES FOR
THE CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE COMPOUNDS
EXTRACTED FROM PLANTS FOR POTENTIAL APPLICATION IN
SKIN LESIONS**

Campinas – São Paulo

Março/2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

ANA LUIZA RESENDE PIRES

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS FLEXÍVEIS DENSOS E POROSOS VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM LESÕES DE PELE

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: ÂNGELA MARIA MORAES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA LUIZA RESENDE PIRES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA MORAES.

Campinas – São Paulo

Março/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P665d Pires, Ana Luiza Resende, 1984-
Desenvolvimento de dispositivos flexíveis densos e porosos visando a liberação controlada de compostos bioativos extraídos de plantas para potencial aplicação em lesões de pele / Ana Luiza Resende Pires. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientadores: Ângela Maria Moraes e Mara Elga Medeiros Braga.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

Em regime Interinstitucional com: Universidade de Coimbra, Portugal.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Membranas. 4. Compostos naturais. 5. Feridas e lesões - Tratamento. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Braga, Mara Elga Medeiros. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em outro idioma: Development of dense and porous flexible devices for the controlled release of bioactive compounds extracted from plants for potential application in skin lesions

Palavras-chave em inglês:

Chitosan

Alginate

Membranes

Natural compounds

Wounds and Injuries - Treatment

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Mary Ann Foglio

Mariana Aitenhofen da Silva

Rodrigo Alvarenga Rezende

Ivan Hong Jun Koh

Data de defesa: 24-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Ana Luíza Resende Pires e aprovada em 24 de março de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes
Faculdade de Engenharia Química/Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Mary Ann Foglio
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva
Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal de São Carlos

Dr. Rodrigo Alvarenga Rezende
Divisão de Tecnologias Tridimensionais/Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh
Departamento de Cirurgia/Universidade Federal de São Paulo

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora,
consta no processo de vida acadêmica da aluna

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo constante em todos os momentos e por permitir que eu tenha ao meu lado um Espírito de luz e protetor que me guia e guarda.

À professora Dr^a. Ângela Maria Moraes pelos anos compartilhados de muito trabalho, por ser profissional e exigente o suficiente para me ajudar a amadurecer e crescer e, também, pela amizade, carinho e respeito que cultivamos.

Ao meu pai, Chico Pires, que sempre fortalece minha caminhada com apoio e admiração de pai e amigo, ratificando o sentido da fé e da nossa união. À minha mãe, Maria Luiza, que mesmo não estando presente fisicamente como gostaríamos, ensina-me que as missões que Deus nos designa é uma oportunidade única para nosso crescimento espiritual.

Aos meus amados irmãos, Guto e Rafinha, pelo companheirismo, união, orgulho, apoio e amor incondicional.

À minha Dindinha Paulina, por estar diariamente presente em minha vida, auxiliando em todos os momentos com dedicação, amor e amparo. Minha Dindinha é única!

A toda minha grande família pela torcida e exemplos magníficos de fé, humildade, honestidade e união. Nossa família é maravilhosa! Meu carinho especial ao meu vovô Chiquinho e vovó Vandinha pela herança de ternura e amor. Ao tio Marco Túlio por auxiliar na revisão da minha tese com tanto carinho.

Ao Ivan pelo constante incentivo, compreensão, paciência, amor compartilhado e por ser um companheiro e tanto.

À família Argentin que sempre me acolheu com muito carinho.

Aos amigos e amigas de Minas Gerais que por anos torceram por mim e pelo meu retorno. Um carinho especial à Marina por sempre ser minha companheira e amiga de todas as horas.

Aos grandes amigos que cultivei no estado de São Paulo durante minha jornada. Um carinho especial e toda minha gratidão e sincera amizade às amigas que estenderam aos laços da pós-graduação: Cecília Westin (Gugu), Andréa (Oxy), Renata, Fernanda, Dani (minha afilhadinha), Sidizinha e Karine. Às amigas que dividiram comigo o mesmo teto, principalmente, Mari, Bruninha, Alliny, Larissa, Nathália, Juliana, Bárbara, Gabi e Kah.

Aos amigos e colegas de laboratório pela boa convivência e cafezinhos quentinhos na hora

certa. Meu agradecimento sincero pelo nosso grupo de pesquisa: Cecília Bueno, Itiara, Márcia, Sérgio, Rafael Trinca, Lucas e, mais uma vez, às grandes amigas Fer, Re, Gugu e Oxy. Considero que o nosso grupo de pesquisa é composto por pessoas únicas e especiais, as quais não se privam em ajudar ao outro com satisfação e desejos de crescimento em conjunto. Isto é raro!

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Às alunas de iniciação científica Liana Motta e Amanda Piton, pelo aprendizado e trabalho desenvolvido durante minha supervisão.

À equipe da professora Dra. Mary Ann Foglio por ceder, gentilmente, o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot e por disponibilizar ajuda em todos os momentos.

Ao Dr. Jacobo Montelongo pela colaboração nos estudos de quantificação de grupamentos amina e carboxílicos e também na aplicação de modelo semi-empírico para analisar a liberação do composto bioativo.

Ao LABMOCA, especialmente ao Dr. Ibsen, que gentilmente disponibilizou o laboratório para análises de citotoxicidade. À Cecília por me auxiliar integralmente com tanto carinho nas análises.

Aos professores e pesquisadores da Universidade de Coimbra, Portugal, Dr. Hermínio Sousa, Dr^a. Mara Braga e Dr^a. Ana Dias pela oportunidade de desenvolvermos um trabalho em conjunto. Aos colegas de laboratório do Departamento de Engenharia Química da UC e aos amigos da Residência Pedro Nunes.

Às equipes da professora Dr^a. Lina Gomez (Faculdade de Medicina da Universidad Antonio Nariño, de Bogotá, na Colômbia) e da professora Dr^a. Maria Beatriz Puzzi (Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP) pelos trabalhos em cooperação realizados.

À Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda pela esterilização dos suportes utilizando-se o óxido de etileno.

À UNICAMP e ao Programa de Pós Graduação da FEQ.

A todos os funcionários da FEQ/UNICAMP que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização desta tese.

À FCT (Portugal), à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A fim de contribuir no estudo de alternativas de tratamento de lesões de pele, neste trabalho foram desenvolvidos filmes flexíveis, densos e porosos, constituídos fundamentalmente pelos polissacarídeos quitosana (Q) e alginato (A) que, quando combinados por interação eletrostática formam um complexo polieletrólito (PEC) insolúvel em água, estável a variações de pH e capaz de incorporar diferentes compostos bioativos. No intuito de analisar a influência da viscosidade do alginato nas características dos materiais finais e no seu processamento, os filmes produzidos a partir do PEC de QA foram preparados com alginato de baixa (BV) ou média (MV) viscosidade. O caráter poroso foi provido pela adição na mistura de Q e A de 0,1 g do tensoativo Kolliphor[®] P188 (P) por grama de polissacarídeos. Estruturas flexíveis foram obtidas pela adição de 0,01 a 0,20 mg do elastômero de silicone Silpuran[®] 2130 A/B (S) por grama de polissacarídeos. Os filmes considerados mais promissores quanto às propriedades físico-químicas foram selecionados para incorporação, por distintas metodologias, dos compostos naturais bioativos timol (T), betacaroteno (Bc) e do extrato padronizado da planta *Arrabidaea chica* Verlot (*A. chica*). Como para as formulações preparadas com alginato BV notou-se melhor desempenho quanto às propriedades mecânicas para a proporção de S/(Q+A) de 0,10 g/g, nestas formulações foram incorporados simultaneamente e por distintas metodologias (impregnação em solução e mediada por CO₂ supercrítico) os compostos naturais T e Bc. Reduzidas proporções de T e Bc foram liberadas da matriz polimérica, sugerindo o uso deste material como cobertura com efeito de barreira na lesão. A utilização de alginato MV propiciou a formação de filmes flexíveis, densos e porosos com propriedades mais atrativas, como espessura de 46 a 488 µm, sorção de vapor d'água de 25% para as formulações porosas, 46 MPa de tensão na ruptura para formulações flexíveis e densas e máxima perda de massa de 16% após exposição a fluidos fisiológicos. Para os filmes densos de QA foram incorporadas, por adição direta à mistura polimérica, distintas concentrações do extrato de *A. chica*. A adição do extrato conferiu coloração avermelhada aos dispositivos e os melhores resultados quanto à eficiência de incorporação e à liberação do extrato padronizado foram obtidos para a formulação preparada na presença de 100,0 mg de extrato de *A. chica* por grama de Q e A. Esta proporção foi utilizada para a incorporação nas demais formulações (flexíveis, densas e porosas). A presença de S e P nas membranas de QA não alterou a eficiência de incorporação do extrato, no entanto, as amostras densas foram as que apresentaram as maiores concentrações do composto bioativo liberado. Observou-se *in vitro* que as membranas preparadas na presença e na ausência de *A. chica* não apresentaram toxicidade a células Vero. Entretanto, notou-se também *in vitro* que limitada eficiência contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, comuns em lesões de pele.

Palavras-chave: quitosana, alginato, curativos, gel de silicone, tensoativo, compostos bioativos.

ABSTRACT

Aiming at contributing to the study of alternatives for the treatment of skin lesions, flexible and dense porous films were developed using mainly the polysaccharides chitosan (Q) and alginate (A) which, when combined by electrostatic interaction, form an insoluble polyelectrolyte complex (PEC) stable to pH variation and capable of incorporating different bioactive compounds. With the purpose of analyzing the influence of alginate viscosity on the characteristics of the final materials and on their processing, the films produced from the QA PEC were prepared with alginate of low (BV) or medium (MV) viscosity. The porous character was provided to the biomaterial by the addition of 0.1 g of the poloxamer Kolliphor[®] P188 (P) per gram of polysaccharides. Flexible structures were obtained by adding 0.01 to 0.20 mg of the silicone elastomer Silpuran[®] 2130 A/B (S) per gram of polysaccharides. The films showing the most promising physicochemical properties were selected for the incorporation of the natural bioactive compounds thymol (T), betacarotene (Bc) and the standardized extract of the *Arrabidaea chica* Verlot (*A. chica*) plant by different methodologies. The formulations prepared with BV alginate using the S/(Q+A) ratio of 0.10 g/g showed the best performance with respect to the mechanical properties and subsequently, the natural compounds T and Bc were incorporated in these formulations simultaneously and by different methodologies (impregnation in solution and mediated by supercritical CO₂). Reduced proportions of T and Bc were released from the matrix, suggesting the use of this material as a wound dressing with barrier effect. The use of MV alginate allowed the production of flexible, dense and porous films with more attractive properties, such as thickness of 46 to 488 μm, water vapor sorption of 25% for porous formulations, 46 MPa of tensile strength for dense flexible formulations and maximum mass loss of 16% after exposure to physiological fluids. Different concentrations of the *A. chica* extract were incorporated in the dense QA films by direct addition to the polymer mixture. The addition of the extract resulted in the change of color of the devices to red, and the best results regarding the incorporation efficiency and release of the standardized extract were obtained for the formulation prepared in the presence of 100.0 mg of *A. chica* extract per gram of the Q and A mixture. This proportion was used for the incorporation of the extract to the other formulations. The presence of S and P in the QA membranes did not alter the efficiency of incorporation of the extract. The dense formulation showed the highest release of the extract. It was observed *in vitro* that the membranes prepared in the presence or absence of the *A. chica* extract were not toxic to Vero cells. However, limited efficiency *in vitro* against two species of bacteria commonly found in skin lesions, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, was also observed.

Keywords: *chitosan, alginate, dressings, silicone gel, surfactant, bioactive compounds.*

LISTA DE ABREVIACOES

A: alginato

Ae: rea exposta do filme nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'gua

ABS: absorvância

A. *chica*: extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot

AM: corante azul de metileno

A_s: rea da seco transversal inicial da amostra nos ensaios de resistência mecânica

ASTM: *American National Standards Institute*

B: betacaroteno

di: afastamento inicial das garras do equipamento nos ensaios de resistência mecânica

dr: afastamento das garras no momento da ruptura nos ensaios de resistência mecânica

DO: densidade tica

E: alongamento na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

EDS: espectroscopia de energia dispersiva de Raio-X, do inglês *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*

FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared*

F_m: força máxima de rompimento nos ensaios de resistência mecânica

IS: impregnação em solução

k: constante cinética

L: perda de massa das amostras

M_f: massa final da amostra após a exposição ao fluido

M_o: massa inicial da amostra antes da exposição ao fluido

M_t: massa da amostra no tempo *t*

M_u: massa final úmida da amostra

M_∞: quantidade de fármaco liberado no tempo infinito

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

n: expoente difusional

P: Kolliphor[®] P188

PBS: tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PDMS: polidimetilsiloxano

PEC: complexo polieletrólito, do inglês *Polyelectrolyte Complex*

Q: quitosana

QA: complexo polieletrólito constituído de quitosana e alginato

QA_{33,3}: membrana de quitosana-alginato contendo 33,3 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo

QA_{66,6}: membrana de quitosana-alginato contendo 66,6 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo

QA_{100,0}: membrana de quitosana-alginato contendo 100,0 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo

QA_{133,3}: membrana de quitosana-alginato contendo 133,3 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo

QAS: complexo polieletrólito constituído de quitosana e alginato e preparados na presença 0,10 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo

QAS_{100,0}: membrana de quitosana-alginato preparada na presença de 0,01 g/g de Silpuran[®] 2130 A/B contendo 100,0 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo

QAS1: membrana de quitosana-alginato contendo 0,01 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo

QAS5: membrana de quitosana-alginato contendo 0,05 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo

QAS10: membrana de quitosana-alginato contendo 0,10 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo

QAS20: membrana de quitosana-alginato contendo 0,20 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo

QASTB: membrana de quitosana-alginato contendo timol e betacaroteno

QAP: complexo polieletrólito constituído de quitosana e alginato e preparados na presença de Kolliphor[®] P188

QAPS: complexo polieletrólito constituído de quitosana e alginato e preparados na presença simultânea de Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188

RB: corante rosa de bengala

S: grau de intumescimento das amostras

S: Silpuran[®] 2130 A/B

SC-5 bar/min: sistema mediado por CO₂ supercrítico a taxa de despressurização de 5 bar/min

SC-10 bar/min: sistema mediado por CO₂ supercrítico a taxa de despressurização de 10 bar/min

SS: solução salina

T: timol

TR: tensão na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

UFC: unidade formadora de colônia

VS: capacidade de sorção de vapor d'água

WVT: transmissão de vapor d'água

Δm : diferença entre a massa inicial e final

ϵ : eficiência de incorporação do composto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Objetivos	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Biomateriais	20
2.2. Biopolímeros	22
2.2.1. <i>Quitosana</i>	23
2.2.2. <i>Alginato</i>	26
2.2.3. <i>Complexo polieletrólito de quitosana e alginato</i>	30
2.3. Membranas de quitosana e alginato	33
2.4. Incorporação de agentes bioativos em membranas	35
2.5. Agentes bioativos naturais utilizados no tratamento de lesão de pele	40
2.5.1. <i>Timol</i>	41
2.5.2. <i>Betacaroteno</i>	45
2.5.3. <i>Arrabidaea chica</i> Verlot	47
2.6. Considerações finais.....	51
3. METODOLOGIA	52
3.1. Materiais	52
3.2. Preparação das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana- alginato	52
3.3. Incorporação de compostos bioativos	54
3.3.1. <i>Incorporação por adição direta à mistura polimérica</i>	54
3.3.2. <i>Incorporação por impregnação em solução</i>	54
3.3.3. <i>Impregnação de timol e betacaroteno mediada por CO₂ supercrítico</i>	55
3.4. Caracterização das membranas	55
3.4.1. <i>Aspecto das membranas</i>	55
3.4.2. <i>Espessura das membranas</i>	55
3.4.3. <i>Morfologia da superfície e da secção transversal</i>	56
3.4.4. <i>Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-X (EDS)</i>	56
3.4.5. <i>Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)</i>	56
3.4.6. <i>Detecção de grupamentos amina e carboxílico livre</i>	56

3.4.7. Capacidade de absorção e estabilidade em soluções aquosas	57
3.4.8. Estabilidade em simulação de banho de paciente	58
3.4.9. Sorção de vapor d'água	58
3.4.10. Transmissão de vapor d'água	59
3.4.11. Ângulo de contato	60
3.4.12. Propriedades mecânicas	60
3.4.13. Potencial hemolítico	60
3.4.14. Capacidade trombogênica	61
3.4.15. Eficiência de incorporação de agentes bioativos	62
3.4.16. Análise da extração dos agentes bioativos a partir das membranas	62
3.4.17. Determinação do mecanismo de liberação	63
3.4.18. Capacidade antimicrobiana das membranas	64
3.4.19. Citotoxicidade indireta com MTT	64
3.4.20. Análise estatística	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade preparadas com diferentes concentrações de Silpuran [®] 2130 A/B	67
4.1.1. Aspecto e morfologia das membranas	68
4.1.2. Mapeamento de silício nas membranas.....	70
4.1.3. Espessura das amostras secas e hidratadas	72
4.1.4. Capacidade de absorção de fluidos fisiológicos pelas membranas	74
4.1.5. Perda de massa das membranas quando expostas a fluidos fisiológicos	77
4.1.6. Estabilidade das membranas em condições de simulação de banho de paciente	79
4.1.7. Propriedades mecânicas	80
4.1.8. Incorporação de tensoativos nas membranas de quitosana-alginato	82
4.1.9. Efeito da adição dupla de timol e betacaroteno por diferentes metodologias nas características das membranas	83
4.1.9.1. Análise morfológica da superfície e secção transversal	84
4.1.9.2. Ângulo de contato	86
4.1.9.3. Sorção e transmissão de vapor d'água	87
4.1.9.4. Capacidade hemolítica e trombogênica	89

4.1.9.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	91
4.1.9.6. Eficiência de incorporação de timol e betacaroteno	93
4.1.9.7. Extração de timol e betacaroteno	95
4.1.9.8. Discussão comparativa das características das membranas produzidas com diferentes proporções de Silpuran [®] 2130 A/B e com incorporação de timol e betacaroteno	97
4.2. Membranas flexíveis densas e porosas de quitosana complexada com alginato de média viscosidade	100
4.2.1. Aspecto e morfologia das membranas	101
4.2.2. Mapeamento de silício nas membranas	104
4.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	105
4.2.4. Espessura das amostras secas e hidratadas	107
4.2.5. Detecção de grupamentos amina e carboxílico livres nas membranas..	109
4.2.6. Capacidade de absorção de fluidos fisiológicos pelas membranas	112
4.2.7. Perda de massa das membranas quando expostas a fluidos fisiológicos.	113
4.2.8. Sorção de vapor d'água	115
4.2.9. Propriedades mecânicas	116
4.2.10. Efeito da adição de diferentes concentrações do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot nas características das membranas de quitosana-algiato	119
4.2.10.1. Aspecto das membranas de quitosana-alginato contendo distintas concentrações do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	120
4.2.10.2. Espessura e capacidade de absorção em PBS das membranas de quitosana-alginato contendo distintas concentrações do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	122
4.2.10.3. Eficiência de incorporação das distintas concentrações do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot nas membranas de quitosana-alginato ..	123
4.2.10.4. Cinética de liberação das distintas concentrações do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot nas membranas de quitosana-alginato	124
4.2.11. Efeito da adição de 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot nas características das membranas de quitosana-alginato	129
4.2.11.1. Aspecto das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	129

4.2.11.2. Espessura de amostras secas , absorção e perda de massa em PBS das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	131
4.2.11.3. Propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	132
4.2.11.4. Eficiência de incorporação do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot incorporado na proporção de 100,0 mg/g nas membranas de quitosana-alginato	133
4.2.11.5. Cinética de liberação do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot incorporado na proporção de 100,0 mg/g nas membranas de quitosana-alginato.....	135
4.2.11.6. Análise dos parâmetros cinéticos e mecanismos de liberação do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot das matrizes flexíveis, densas e porosas de quitosana e alginato	138
4.2.11.7. Atividade antimicrobiana das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	139
4.2.11.8. Efeito citotóxico das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de <u>Arrabidaea chica</u> Verlot	142
4.2.11.9. Recomendações quanto à aplicação de membranas baseadas em quitosana-alginato	144
5. CONCLUSÕES	146
5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	147
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é caracterizada por uma série de processos que podem ocorrer em sequência e também simultaneamente, como coagulação sanguínea, resposta inflamatória, proliferação celular e remodelação da matriz extracelular. Embora a cicatrização satisfaça os requisitos fundamentais da função da pele no que se refere à prevenção à infecção e desidratação, com frequência a formação de cicatrizes evita a recuperação completa da função do tecido cutâneo. Além do mais, a aparência da cicatriz é distinta da pele intacta, podendo trazer consequências graves para a qualidade de vida do paciente. Neste sentido, a procura pela reparação do tecido ao seu estado original é altamente valorizada (Borges *et al.*, 2011; Takeo *et al.*, 2015).

É neste cenário que surge um novo campo da biotecnologia - a Engenharia de Tecidos – que consiste em um conjunto de conhecimentos e técnicas para a reconstrução de órgãos e tecidos. A engenharia de substituição de pele representa uma prospecção de terapia alternativa avançada que busca a eficiência na cicatrização de feridas cutâneas agudas e crônicas. Além da terapia celular, a Engenharia de Tecidos enfatiza a opção de tratamento de feridas através de matrizes biodegradáveis utilizadas no recobrimento de lesões (Metcalf e Ferguson, 2007).

Para que as matrizes utilizadas na substituição de tecidos possam exercer a função de reparar a anatomia da área lesada, estas devem apresentar características e propriedades essenciais, dentre elas: ser de fácil manuseio e aplicação no local da ferida, agir como uma barreira protetora contra microrganismos, permitir a troca gasosa, manter um ambiente úmido na interface da lesão, remover o excesso de exsudato, apresentar degradação no organismo compatível com a velocidade de recuperação celular do tecido lesado, ser estéril, não tóxica e não alergênica. Além do mais, estes curativos biodegradáveis devem apresentar propriedades físicas e mecânicas adequadas ao local da lesão (Metcalf e Ferguson, 2007; Jayakumar *et al.*, 2011; Singh e Pal, 2012).

A seleção da matéria-prima a ser utilizada na preparação de uma matriz biodegradável é um dos primeiros passos para avaliar a viabilidade da reconstrução e consequente reparação de um órgão. Atualmente, esforços estão voltados para a utilização de materiais de origem biológica que, geralmente, são capazes de melhorar as condições do processo de cura em níveis moleculares e celulares (Jayakumar *et al.*, 2011). Os polímeros naturais vêm sendo avaliados por promover a cicatrização e reparação dos tecidos, uma vez que são capazes de

manter um microambiente controlado no local da lesão. Além disso, possuem vantagens apreciáveis, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade (Li *et al.*, 2009). Dentre os biopolímeros, a quitosana e o alginato são amplamente utilizados para a confecção de curativos (Costache *et al.*, 2010; Dantas *et al.*, 2011).

Quando misturados em fase aquosa, em pH adequado, a quitosana e o alginato combinam-se espontaneamente por forte atração eletrostática, formando um complexo polieletrólito (PEC) (Verma *et al.*, 2011). Os PECs à base de quitosana e alginato apresentam características relevantes para a produção de curativos para o tratamento de lesões de pele, como por exemplo, maior estabilidade a variações de pH, intumescimento e eficiência na liberação controlada de princípios ativos diferenciados quando comparado a dispositivos constituídos de seus biopolímeros isolados. Membranas combinando quitosana e alginato podem ser produzidas de forma densa ou porosa, de forma a atender os requerimentos da aplicação final almejada. No entanto, filmes baseados nesta complexação apresentam limitações quanto às propriedades mecânicas, como baixa resistência à tração, alongamento na ruptura e flexibilidade. Uma alternativa para contornar tal limitação é a adição de elastômeros como o polidimetilsiloxano (PDMS) Silpuran[®] 2130 A/B nestes dispositivos, como realizado por Pires e Moraes (2015), que utilizaram uma razão mássica de 100 mg do gel de silicone por grama de polissacarídeos, com efetiva melhoria da tensão de ruptura do material.

A incorporação de compostos bioativos naturais em matrizes biodegradáveis pode ter apreciável impacto na prevenção e terapia de infecções e de processos inflamatórios, tendo-se em vista que se o princípio ativo for liberado de modo controlado, pode-se aumentar a eficácia do tratamento (Dash *et al.*, 2011). A incorporação pode ser realizada de distintas formas, como durante o preparo do dispositivo, através da sua adição à suspensão polimérica, ou por impregnação do filme pronto com soluções contendo o agente bioativo. Opcionalmente, pode-se também realizar a incorporação do agente bioativo utilizando fluidos supercríticos, neste caso o princípio ativo deve ser solúvel no fluido supercrítico para sua efetiva impregnação na matriz (Braga *et al.*, 2008).

Desta forma, no presente projeto propôs-se analisar, através de caracterizações físico-químicas e biológicas, o potencial de aplicação de membranas flexíveis, densas ou porosas produzidas pela complexação de quitosana e alginato, incorporando ou não os distintos compostos naturais timol, betacaroteno e/ou extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot, a fim de direcioná-los como alternativa de curativo/cobertura para a terapia de lesões de pele.

O trabalho abrange a análise da influência da viscosidade do alginato no processamento do dispositivo e também suas implicações quanto às possíveis alterações nas propriedades dos biomateriais. Nesta mesma perspectiva, avaliou-se o efeito da adição do tensoativo Kolliphor[®] P188 e de diferentes proporções do elastômero Silpuran[®] 2130 A/B nas características dos dispositivos. Adicionalmente, fez-se a análise do desempenho das distintas formulações desenvolvidas no que tange à extração e liberação dos compostos bioativos naturais nelas incorporados e no que se refere à sua toxicidade a células de mamíferos e sua atividade antimicrobiana.

As atividades foram desenvolvidas, em sua maior parte, no Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos) localizado na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. Algumas etapas deste projeto foram desenvolvidas no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra (Portugal), abrangendo um período de oito meses, tendo-se ainda a colaboração do grupo de pesquisa da professora Dra. Mary Ann Foglio, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UNICAMP), a qual gentilmente doou o extrato já padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot para o desenvolvimento deste trabalho e disponibilizou apreciável apoio técnico nos ensaios com este composto.

1.1. Objetivos

O objetivo global desta tese foi o de contribuir para os trabalhos realizados no setor de desenvolvimento de membranas poliméricas para uso como curativos no tratamento de lesões dérmicas, tendo-se as seguintes metas específicas:

- Avaliar o efeito da adição de razões mássicas de 10 a 200 mg de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo nas características de membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade;
- Comparar as propriedades destas membranas às de dispositivos preparados com alginato de média viscosidade;
- Analisar a factibilidade de incorporação dos compostos naturais bioativos timol, betacaroteno e extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot em membranas com formulações poliméricas consideradas apropriadas, explorando-se as técnicas de adição

à mistura reacional, impregnação em solução e deposição via fluido supercrítico (CO₂) empregando etanol como co-solvente;

- Avaliar as características das membranas contendo os agentes bioativos, em particular no que se refere à cinética de liberação dos compostos, de forma isolada ou conjunta, a fim de direcionar o material para aplicação em lesões de pele;
- Estabelecer diretrizes, no que se refere a aspectos práticos, para a utilização clínica das membranas na terapia de lesões de pele, com base em dados de ensaios biológicos preliminares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura visa-se fornecer informações gerais a respeito dos biomateriais, especificamente os biopolímeros quitosana e alginato empregados na composição de dispositivos para o tratamento de lesões de pele. As vantagens quanto à formação do complexo de polieletrólitos de quitosana-alginato, a incorporação e liberação de agentes bioativos nas matrizes poliméricas e a escolha dos compostos bioativos naturais timol, betacaroteno e extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot, que podem contribuir no tratamento e terapia de feridas cutâneas também são abordadas.

2.1. Biomateriais

Os biomateriais apresentam-se como um campo de pesquisa multidisciplinar, baseado na sinergia das áreas de biologia, engenharias e ciência dos materiais. Estes vêm sendo utilizados há centenas de anos no âmbito médico para melhorar a qualidade de vida das pessoas, mas seu estudo sistemático só se deu nas últimas décadas. Existe uma gama de aplicações para estes materiais, como próteses e membros artificiais, lentes de contato, dispositivos de liberação controlada de agentes bioativos e de reparação de tecidos danificados (Holzapfel *et al.*, 2013).

Na literatura há várias formas de se conceituar biomateriais, no entanto, a definição preferencial é que a utilização dos biomateriais seria apenas referente ao domínio dos cuidados da saúde (ao invés de energia, alimentos, produtos químicos em geral). Assim, um biomaterial deve ser dirigido para aplicações no campo médico, tanto no diagnóstico como na terapia, e deve ainda ser capaz de controlar interações com os componentes biológicos do paciente a ser tratado (Williams, 2009).

Os biomateriais podem ser de origem sintética ou natural, podendo ser constituídos por metais, cerâmicas, polímeros ou seus compósitos. Na classe de biomateriais de origem natural destacam-se os biomateriais produzidos a partir de colágeno purificado, fibras protéicas, polissacarídeos e tecidos biológicos tratados (Dallan, 2005).

A seleção dos componentes que constituem o biomaterial é essencial para uma aplicação bem sucedida. Assim, a escolha deve ser definida a partir de propriedades

específicas esperadas do biomaterial, uma vez que podem ocorrer alterações em suas características quando em contato com o corpo do paciente. Neste sentido, o conhecimento das possíveis alterações físico-químicas ditará sua aplicabilidade, assim como suas vantagens e desvantagens (Lalor e Jones, 2011).

Idealmente, os materiais utilizados para o reparo de lesões devem atender requisitos quanto à biofuncionalidade e à biocompatibilidade. A biofuncionalidade diz respeito à capacidade do material de executar o propósito para o qual foi designado; está relacionada com as propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que permitem o desempenho de sua função. Já a biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material de proporcionar uma resposta adequada ao hospedeiro em uma aplicação específica, ou seja, o organismo não pode sofrer danos pela presença desse material (Barrère *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2015).

Devido às vantagens da utilização de biomateriais no âmbito médico, seu uso e comercialização vêm crescendo consideravelmente. Calcula-se que as indústrias de biomateriais movimentarão 130 bilhões de dólares com uma taxa de crescimento anual de 16% até 2020. Os tipos de materiais mais explorados são os metais, os polímeros e os cerâmicos (Markets and Markets, 2015).

No que tange ao mercado de curativos para lesões de pele, estima-se que o mercado global alcance 20,4 bilhões de dólares até 2021, com taxa de crescimento anual de 3,6%. Os fatores que impulsionam o crescimento neste ramo incluem o aumento no envelhecimento da população e da incidência de doenças crônicas advindas de diabetes e obesidade, além da crescente busca por tecnologias de produtos inovadores para o tratamento de lesões de pele. No entanto, tendo-se em vista o alto custo dos dispositivos para tratar lesões de pele, limitações no crescimento de tal mercado podem ocorrer (Markets and Markets, 2016).

A Engenharia de Tecidos aparece como real opção no crescimento econômico e tecnológico na área de dispositivos médicos devido às ótimas perspectivas que oferece, propondo terapias alternativas para a reparação e reparação tecidual, buscando assim restabelecer a capacidade funcional de tecidos lesados (Smith *et al.*, 2009). Estima-se que o mercado global no segmento deste ramo de terapias atinja no ano de 2020, 330 milhões de dólares com taxa de crescimento anual de 39,5% (Markets and Markets, 2014). Nesta área, o biomaterial é usado como uma matriz ou suporte para células, contendo ou não moléculas bioativas para aplicação em lesões de pele. O dispositivo deve fornecer os sinais biológicos necessários para induzir e conduzir o processo de crescimento celular, restaurando a estrutura

e função do tecido lesado (Zeng *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm apontado o uso de polímeros para aplicação em lesões cutâneas. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os metálicos e cerâmicos são relacionadas à facilidade no processamento, tendo-se em vista que podem ser produzidos em formas variadas (partículas, filmes, esponjas, fios, dentre outros), custo razoável e maior disponibilidade em encontrar materiais com propriedades requeridas para estas aplicações (Wong e Bronzino, 2007; Pires *et al.*, 2015).

Uma vez que a utilização de polímeros sintéticos biocompatíveis, como o ácido poli(lático), pode ocasionar a liberação de subprodutos ácidos e consequentes reações inflamatórias, o uso de biopolímeros tem gerado bastante interesse para o tratamento de lesões de pele. Biopolímeros tais como quitosana, agarose, alginato, celulose e ácido hialurônico, separadamente ou combinados, resultam em materiais com propriedades particulares para aplicação em dispositivos para liberação controlada de fármacos e na engenharia de tecidos (Reid e Elisseff, 2011; Zhang *et al.*, 2013), sendo abordados a seguir.

2.2. Biopolímeros

Os polímeros naturais são amplamente distribuídos na natureza, sendo derivados de fontes renováveis, como algas, plantas, animais e microrganismos. Estes materiais apresentam estruturas complexas e funções fisiológicas diferentes, o que pode proporcionar uma variedade de aplicações (Gomes *et al.*, 2008). Além do mais, estes materiais apresentam degradação enzimática, o que gera maior tendência de serem metabolizados pelo organismo humano. No entanto, ressalta-se que a taxa de degradação pode variar de paciente para paciente (Cheung *et al.*, 2007).

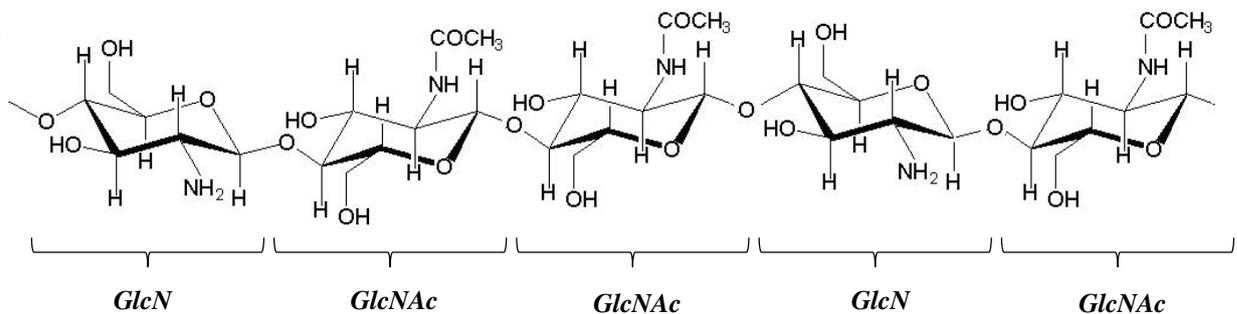
Os biopolímeros dividem-se em três grandes classes: polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Variados tipos de polissacarídeos com diferentes estruturas químicas e propriedades físicas são bons candidatos para aplicações biomédicas, em particular na engenharia de tecidos e na liberação controlada de fármacos. Isto se deve a suas propriedades específicas de renovabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a matriz extracelular e por induzir e estimular o processo de cicatrização de feridas. Ainda, os polissacarídeos são importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e capacidade de hidratação, dentre outras (Rinaudo, 2008).

Dentre os polissacarídeos, a quitosana e o alginato vêm ganhando bastante atenção por seu uso já estabelecido no tratamento de feridas de pele, inclusive na confecção de curativos (Rodrigues *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). Ambos são detalhadamente descritos a seguir.

2.2.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear produzido a partir da desacetilação da quitina, que é considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza (Bhattacharai *et al.*, 2010). A quitosana é um co-polímero constituído de unidades N-acetil-glicosamina (*GlcNAc*) e N-glicosamina (*GlcN*) distribuídas em proporções variáveis ao longo da cadeia, sendo o número de unidades de N-acetil-glicosamina inferior a 50% (Khor e Lim, 2003; Bhattacharai *et al.*, 2010). As estruturas químicas da quitina e quitosana estão indicadas na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Representação da estrutura química da quitosana.



$GlcN > GlcNAc \longrightarrow$ quitosana

$GlcN < GlcNAc \longrightarrow$ quitina

Comercialmente, a fonte mais viável de quitina e quitosana são os descartes industriais do processamento de crustáceos, destacando-se os caranguejos, camarões e lagostas. No exoesqueleto desses invertebrados a porcentagem de quitina pode variar de 10 a 80%. Devido à alta demanda de quitina e quitosana para diferentes aplicações, a quitina pode ser também isolada de cogumelos e do fungo *Aspergillus niger* utilizado na produção do ácido cítrico, no

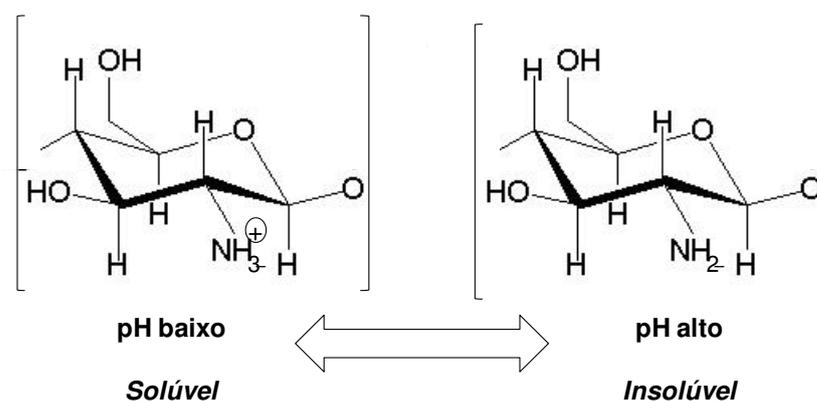
entanto, estas metodologias são onerosas, o que a torna inviável economicamente (Almeida, 2009; Ospina *et al.*, 2015).

Considerada um dos poucos polímeros catiônicos de origem fundamentalmente natural, a quitosana é descrita em termos do seu grau de desacetilação e massa molar. Assim, propriedades como estas influenciam significativamente nas características deste polissacarídeo. O grau de desacetilação é definido em termos do percentual de grupos amina primários existentes na cadeia de quitosana. A quitosana disponível comercialmente possui grau de desacetilação entre 70 e 95% e massa molar entre 10 e 1000 KDa (Malafaya *et al.*, 2007; Ma e Sahai, 2013).

A quitosana é um material de aplicação muito versátil, devido as suas propriedades intrínsecas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, boa estabilidade, bioadesividade e capacidade de formação de filmes (Bhattacharai *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2012).

Dada a presença dos grupos amina primários na estrutura da quitosana, o pH do meio pode alterar o estado de ionização e outras características da quitosana. A transição solúvel-insolúvel da quitosana ocorre em torno de pH 6,0 e 6,5. Desta forma, a quitosana é solúvel em condições ácidas pela protonação do grupo amina e insolúvel em valores de pH acima de seu pKa (6,3), pela desprotonação da amina, como ilustra a Figura 2.2.

Figura 2.2 – Em condições de baixo pH (menor que 6,0) ocorre a protonação dos grupamento amina, conferindo à molécula comportamento de policação. Em pH mais elevado (acima de 6,5) o grupo amina é desprotonado, ocasionando a insolubilidade da quitosana (adaptada de Dash *et al.*, 2011).



Quando positivamente carregada, a quitosana exibe uma importante propriedade, a atividade antimicrobiana. Esta atividade é atribuída às interações eletrostáticas entre o grupo amina protonado da quitosana e os grupos negativos da superfície celular dos microrganismos (Elsabee e Abdou, 2013). Segundo Regiel *et al.* (2013), a atividade antimicrobiana da quitosana é proporcional a seu grau de desacetilação. Um alto grau de desacetilação indica que há um maior número de grupos protonáveis, os quais interagem com as paredes negativamente carregadas dos agentes patogênicos. Desta forma, a atividade antimicrobiana da quitosana é fortemente afetada pelo pH do meio, sendo mais elevada em condições de baixo pH.

Dispositivos com composição baseada em quitosana vêm sendo aplicados em diferentes campos, tanto na área industrial (cosméticos, agrícola, alimentícia e tratamento de água), quanto nutricional e da saúde (biofarmacêuticas e biomédicas). Porém, dentre todas as áreas, é na biomédica sua maior aplicação (Azevedo *et al.*, 2007). Nesta área, a utilização de quitosana na confecção de dispositivos para liberação controlada de fármacos e de *scaffolds* para a Engenharia de Tecidos vem sendo muito explorada (Dash *et al.*, 2011). Isto se deve à sua capacidade de acelerar a cicatrização de lesões e a síntese de colágeno pelos fibroblastos na fase inicial de cicatrização, o que a caracteriza como um polímero bioativo. Além do mais, sua degradação pode ocorrer naturalmente no organismo através ação da enzima lisozima (Chen *et al.*, 2012; George e Abraham, 2006).

Em decorrência de suas variadas propriedades, a quitosana pode ser utilizada de diversas formas, como gel, partículas, membranas, esponjas e em solução. Suas soluções são propensas a formar fibras, filmes e revestimentos. Na Tabela 2.1 são listados alguns dispositivos comercialmente disponíveis à base de quitosana e suas formas respectivas.

A quitosana possui como vantagem boa miscibilidade com outros polímeros, formando complexos e quelatos (Berger *et al.*, 2004). Membranas à base de quitosana vêm sendo bastante empregadas na área de engenharia de tecidos, uma vez que propiciam a proliferação celular e reconstrução do tecido lesado, no entanto, estes dispositivos possuem baixa resistência mecânica. Uma alternativa para esta limitação é a produção de complexos polieletrólitos à base de quitosana com poliânions. A resistência mecânica do dispositivo pode melhorar devido às fortes interações de cargas opostas (Verma *et al.*, 2011).

Os poliânions mais comumente usados são polissacarídeos contendo grupos carboxílicos, tais como alginato (Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Meng *et al.*, 2010), xantana (Veiga e Moraes, 2012; Bellini *et al.*, 2012) e heparina (He *et al.*, 2007),

dentre outros.

Tabela 2.1 – Exemplos de produtos comercialmente disponíveis à base de quitosana e suas formas de apresentação (Bueno, 2015; Ågren, 2016).

Produto disponível comercialmente	Formas	Descrição
Tegasorb [®] – 3M	Partículas	Curativo contendo partículas de quitosana com alta capacidade de absorção
Chitoflex [®] (HemCon)	Membranas	Curativo antibacteriano de quitosana que atua como barreira para microrganismos e no controle de hemorragias moderadas a severas.
Vulnosorb [®] – Tesla-Pharma	Esponjas	Esponja liofilizada de colágeno e quitosana
Chitopack [®] – Eisai	Fibras	Quitosana em forma de fibras finas. Auxilia na reconstrução dos tecidos do corpo e na regularização da reparação da pele.
Chito-Seal [®] – Abbott	Revestimento	Material não-tecido recoberto com gel de quitosana.

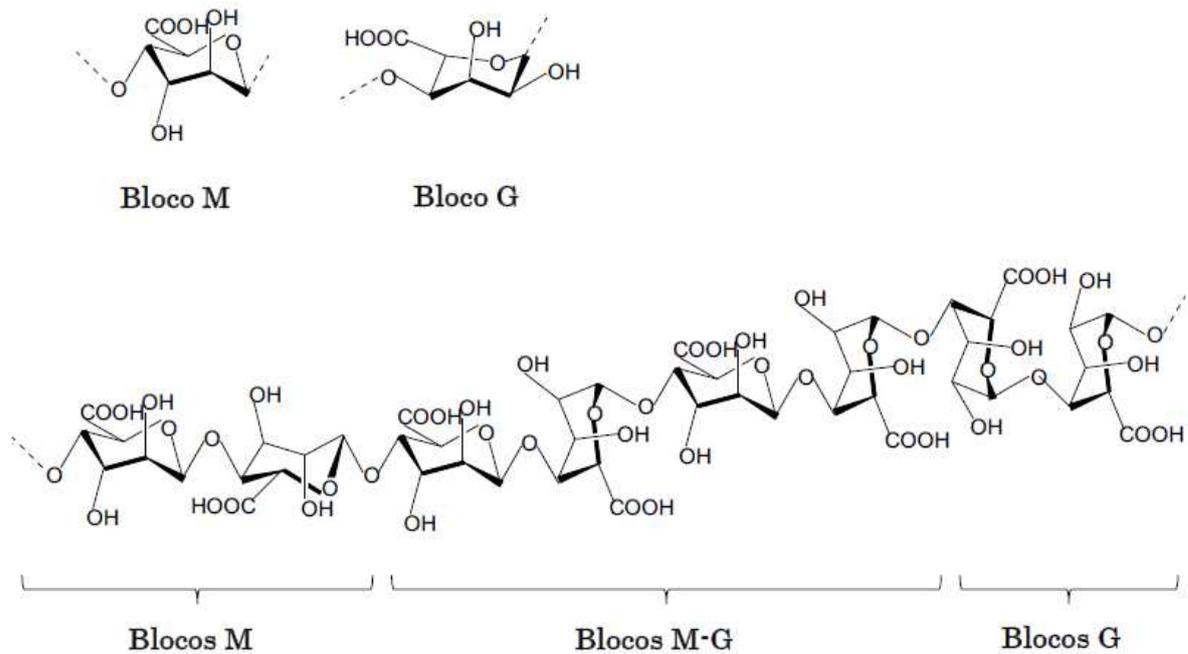
2.2.2. Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural linear composto por duas diferentes unidades de repetição, (1,4)- α -L-guluronato (unidade G) e (1,4)- β -D-manuronato (unidade M), em variadas proporções e arranjos sequenciais (Khan e Ahmad, 2013), como ilustrado na Figura 2.4.

Os arranjos sequenciais das unidades M e G e a quantidade relativa dos segmentos poliméricos podem variar com a fonte de obtenção, de forma que podem ocorrer blocos separados (M ou G) ou mistos (M-G). A variabilidade dos blocos ao nível molecular afeta fortemente as propriedades físico-químicas e reológicas do alginato. Uma diferença importante é observada na característica dos géis, sendo que os alginatos com maiores porcentagens de blocos G formam géis transparentes, porém, mais rígidos e quebradiços. Ao contrário, quando há um maior conteúdo de blocos M ou até mesmo blocos mistos (M-G) os

géis são mais elásticos (Segato, 2007; Silva *et al.*, 2012). O alginato é quimicamente estável a valores de pH entre 5 e 10 e os valores de pKa dos resíduos M e G são de 3,38 e 4,4, respectivamente (Meng *et al.*, 2010).

Figura 2.4 – Fórmula estrutural do alginato (adaptado de Rodrigues, 2008).



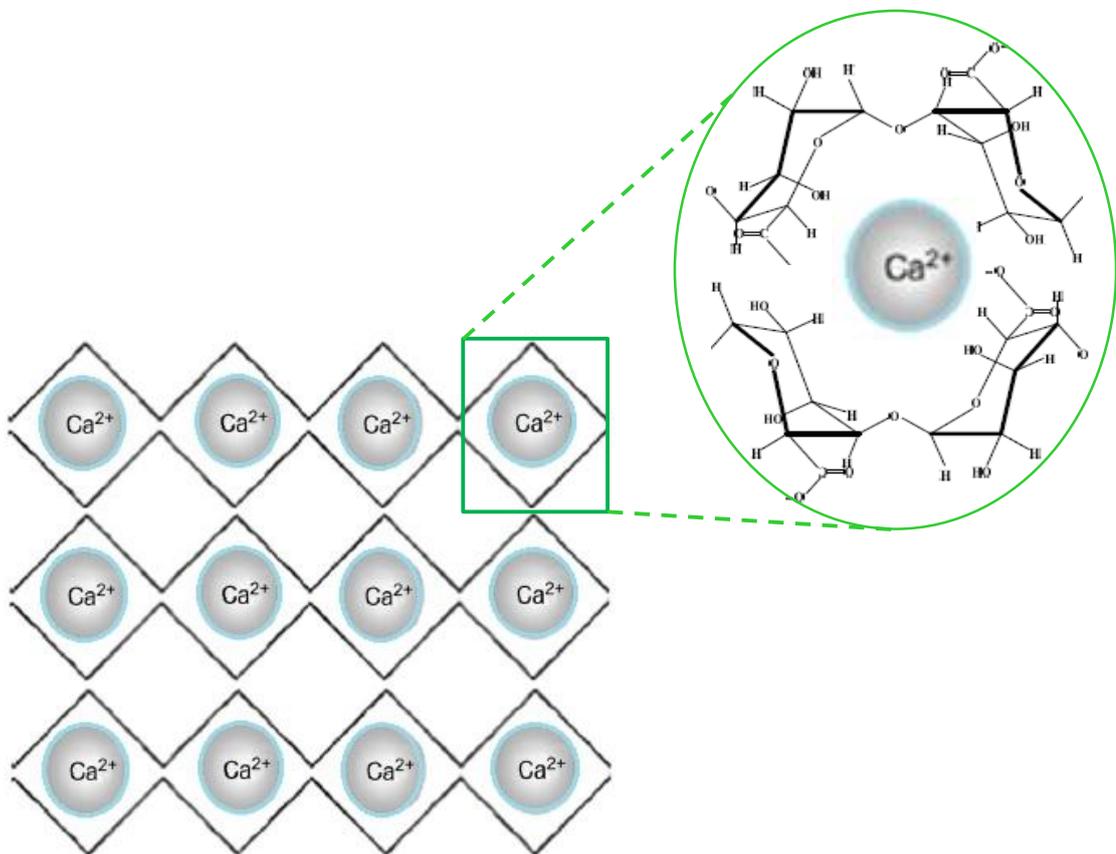
Os alginatos comerciais apresentam massa molar entre 32.000 e 400.000 g/mol (Lee e Mooney, 2012) e podem ser extraídos de três espécies de algas marrons, sendo elas: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% do seu peso seco. Há também a produção do alginato por bactérias como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas* (Rodrigues, 2008; Maurstad *et al.*, 2008; Gombotz e Wee, 2012), mas sem expressão comercial até o momento.

Devido à biodisponibilidade e características do alginato, sua utilização na confecção de biomateriais tem alta incidência. O alginato possui propriedades atraentes, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade e apresenta características de solubilidade, afinidade com proteínas específicas e formação de gel na presença de íons multivalentes (Lee *et al.*, 2012; Pawar e Edgar, 2012).

A formação de gel de alginato ocorre na presença de íons como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} , sendo mais comumente empregado o cálcio. A interação dos cátions com o polissacarídeo

resulta em uma rede tridimensional de fibras de alginato unidas entre si por ligações iônicas com íons cálcio, proporcionando uma configuração interna mais estável. Ainda, a gelificação é impulsionada pela junção dos blocos (M, G e M-G) e, como mencionado anteriormente, a maior porcentagem de blocos G propicia a formação de géis mais rígidos. No caso da participação dos blocos M-G, os géis formados são considerados menos rígidos (George e Abraham, 2006; Pawar e Edgar, 2012). Na Figura 2.5 pode ser vista a formação da rede de gel de alginato de cálcio.

Figura 2.5 – Formação da rede de gel de alginato de cálcio (adaptado de Sacchetin, 2009; Pawar e Edgar, 2012).



Devido à matriz em que o gel de alginato pode se transformar, dispositivos de alginato vêm sendo amplamente utilizados para liberação controlada de fármacos e curativos para lesões de pele (Murakami *et al*, 2010).

Curativos baseados em alginato são bem conhecidos tanto na literatura quanto do ponto

de vista comercial (Goh *et al.*, 2012). Na Tabela 2.2 são listados exemplos de curativos de alginato já comercializados. Quando em contato com lesões exsudativas, há troca iônica entre o cálcio do alginato e o sódio do exsudato, formando um gel solúvel de alginato de sódio. Este gel mantém um microambiente úmido na lesão, o que facilita a cicatrização e minimiza a infecção bacteriana no local. Estas funções podem promover a formação de tecido de granulação, epitelização rápida e a cura (Lee e Mooney, 2012).

Tabela 2.2 – Exemplos de curativos comercialmente disponíveis à base de alginato (Bueno, 2015).

Curativo	Fabricante	Descrição
Algiderm [®]	Bard	Tecido de fibras de alginato de cálcio
Sorbsan [®]	Laboratories	Material não-tecido de fibras de alginato
Nu-Derm [®]	Johnson & Johnson	
Algosteril [®]	Systagenix	
Kaltostat [®]	ConvaTec	
Kalginate [®]	DeRoyal Industries	
Restore [®]	Hollister	
SeaSorb [®]	Coloplast Sween	
PhytaCare [®]	Curafarm	Hidrogel de alginato
Hyperion Advanced Film Dressing [®]	Hyperion Medical	Filme transparente de alginato
PolyMem [®]	Ferris Mfg.	Membrana de alginato contendo glicerina e agente surfactante

De acordo com Paul e Sharma (2004), a capacidade de gelificação dos alginatos auxilia na remoção das coberturas preparadas a partir deste composto, uma vez que estas não aderem ao leito da lesão, o que diminui a dor e o trauma associados às trocas de curativo.

Nos últimos anos, a reticulação do alginato tem sido bastante explorada nas aplicações biomédicas, principalmente pela interação com polímeros catiônicos, como peptídeos, gelatina e quitosana, sendo tais interações dependentes do pH do meio e da ionização dos polímeros. O PEC de alginato e quitosana é conhecido por formar redes complexas que podem ser utilizadas para formar géis, *scaffolds*, membranas e fibras (Khan e Ahmad, 2012). As características de formação do PEC de quitosana-alginato e as vantagens de sua aplicação serão abordadas a seguir.

2.2.3. Complexo de polieletrólitos de quitosana e alginato

Os polieletrólitos são macromoléculas que podem, em condições apropriadas de pH, apresentar-se eletricamente carregadas nas formas de policátions ou poliânions. Quando misturados em solução, os ânions e cátions são atraídos espontaneamente por interações eletrostáticas (Yabuki, 2011). Desta forma, o complexo de polieletrólitos é formado através da associação de dois ou mais polieletrólitos de cargas opostas, os quais são ligados principalmente por interações/ligações eletrostáticas. Ligações de hidrogênio, forças de Coulomb e forças de van der Waals também participam da formação deste complexo (Sankalia, 2007).

A formação e a estabilidade dos PECs alteram a tendência de intumescimento dos materiais em soluções aquosas e melhora a resistência estrutural do dispositivo. No entanto, este comportamento depende de alguns fatores, como quanto aos polímeros componentes (massa molar, concentração, proporção, solubilidade), quanto às cargas (grau de ionização, densidade e distribuição), bem como às condições de reação (temperatura, força iônica e pH) (Krayukhina, 2008; Hamman, 2010).

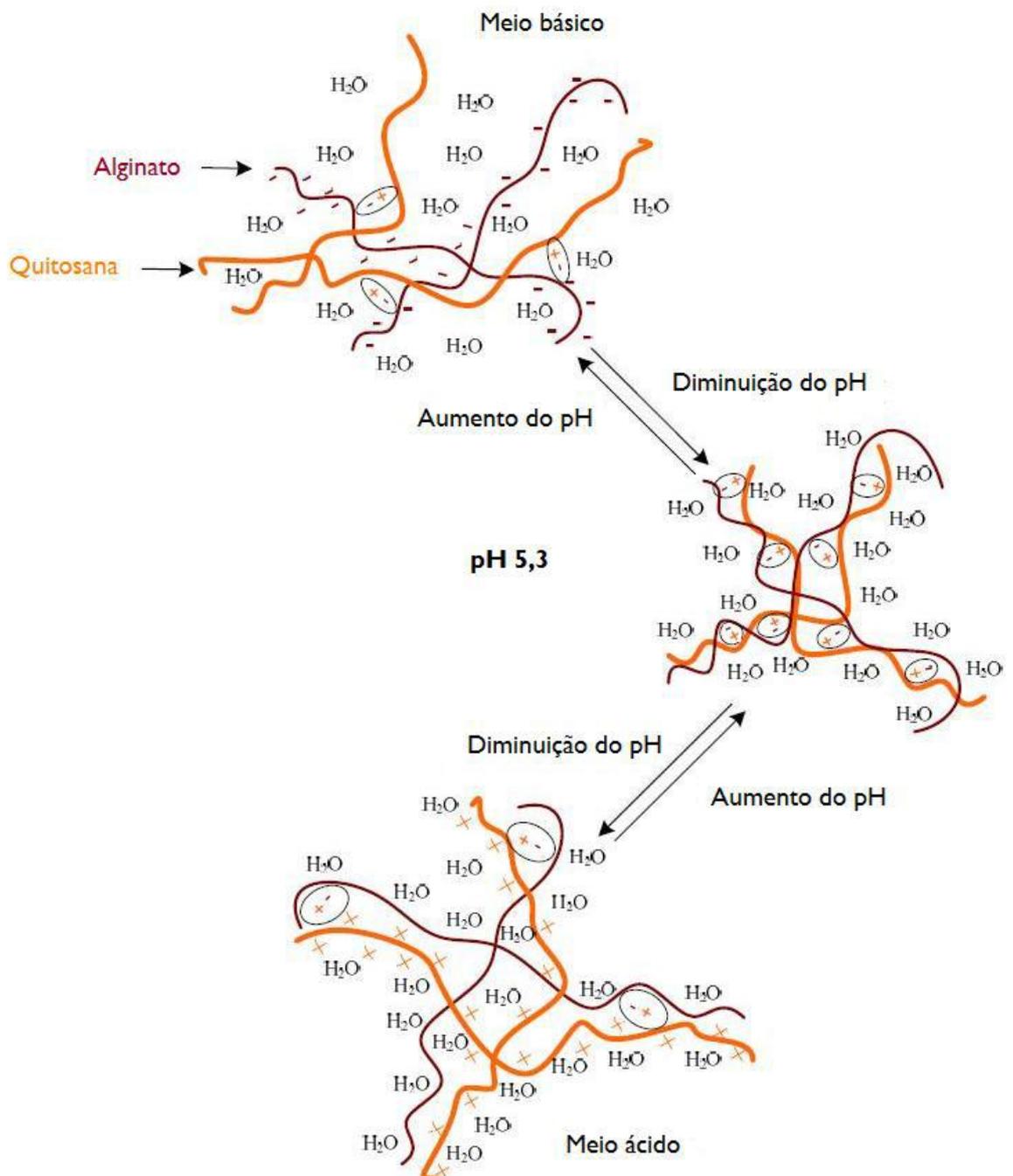
Conforme já mencionado, a quitosana e o alginato são polieletrólitos de cargas líquidas opostas, positiva e negativa, respectivamente. A formação do PEC pela combinação destes polissacarídeos ocorre através da associação dos grupamentos carboxila $-\text{COO}^-$ do alginato com os grupamentos amina $-\text{NH}_3^+$ da quitosana. As propriedades do PEC podem diferir significativamente daquelas dos polissacarídeos isolados, observando-se, por exemplo, maior estabilidade a variações de pH e maior eficiência na liberação controlada de princípios ativos (Wang *et al.*, 2001; Bueno e Moraes, 2011).

Como mencionado anteriormente, o pH pode influenciar na formação do PEC. Em condições de elevado pH, a interação entre o alginato e a quitosana é comprometida, assim como em baixo pH, como mostra a Figura 2.6. Isso ocorre porque há preponderância de ionização do alginato e da quitosana isolados, respectivamente, nestas condições. Nesse sentido, para promover a formação de um PEC estável, a quitosana e o alginato devem estar parcialmente protonados e isso ocorre em condições de pH intermediárias aos valores de pKa da quitosana (pKa em torno de 6,5) e do alginato (pKa entre 3,4 e 4,4) (Yan *et al.*, 2000).

Diante destas características, PECs de quitosana e alginato podem ser usados na constituição de suportes tridimensionais para o cultivo celular (*scaffolds*) (Li *et al.*, 2009;

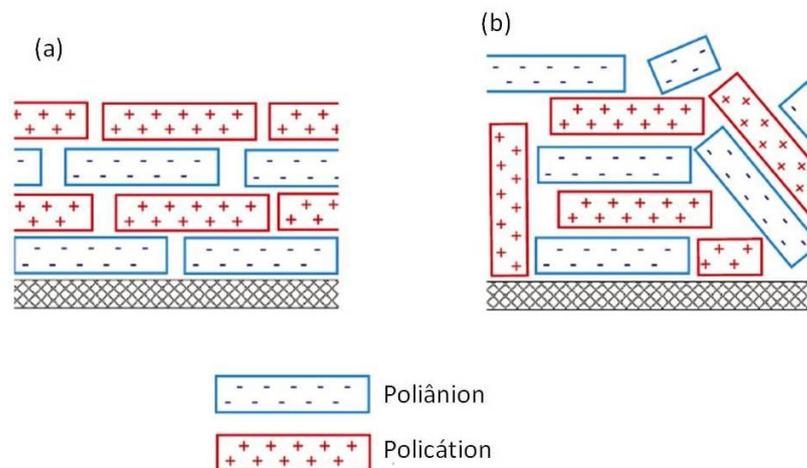
Bueno *et al.*, 2014), fibras (Jayakumar *et al.*, 2011; Sibaja *et al.*, 2015), partículas (Goh *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2015) e membranas (Yan *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Pires e Moraes, 2015).

Figura 2.6 – Efeito do pH na distribuição de cargas de polieletrólitos de quitosana e alginato. As elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato e as cargas positivas da quitosana (adaptado de Rodrigues, 2008).



Membranas produzidas a partir de PECs de policátions e poliânions podem ser obtidas por moldagem (ou *casting*) do PEC em suspensão, por evaporação do solvente, ou pela deposição sequencial de camadas alternadas de policátions e poliânions, resultando em membranas com múltiplas camadas. A técnica de multicamadas, também conhecida por *layer-by-layer*, baseia-se na imersão de um substrato sólido positivamente carregado em uma solução aquosa contendo o polieletrólito de carga negativa. O poliânion é adsorvido e há formação da primeira camada. Em seguida, o material é imerso em uma solução aquosa de polímero carregado positivamente e, conseqüentemente, há a formação de uma segunda camada. A repetição do processo de imersão conduz à formação de um dispositivo com multicamadas e espessura controlada, no entanto esta técnica possui limitações quanto ao controle do processo de adsorção e também no que se refere à incorporação de outras moléculas. O método baseado na evaporação do solvente é mais simples e fundamenta-se na mistura das soluções aquosas de policátions e poliânions, resultando na formação de um complexo, sendo estes dispositivos considerados mais adequados para imobilização de biomoléculas devido à sua estrutura tridimensional (Yabuki, 2011), que facilita a acomodação e dispersão homogênea do agente bioativo. A Figura 2.7 ilustra os dois tipos de membranas formadas por PECs.

Figura 2.7 – Tipos de membranas à base de PECs: (a) dispositivos com camadas alternadas e (b) dispositivos obtidos por moldagem a partir da evaporação do solvente (adaptado de Yabuki, 2011).



Tendo em vista que as membranas obtidas por evaporação do solvente são convenientes

para imobilização de substâncias bioativas, muitos trabalhos vêm enfocando a utilização de matrizes polissacarídicas para a aplicação como curativos em lesões dérmicas. No âmbito deste trabalho, serão abordadas membranas formadas por quitosana e alginato para este fim, as quais serão discutidas a seguir.

2.3. Membranas de quitosana e alginato

A técnica de preparação de membranas densas constituídas de quitosana-alginato foram proposta por Yan *et al.* (2000) e adaptada por Wang *et al.* (2001, 2002) e Rodrigues *et al.* (2008). A mistura das soluções de quitosana e alginato, sob condições pré-estabelecidas de concentração dos polímeros, taxa de agitação, taxa de adição da solução de quitosana na solução de alginato, dentre outras, leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas. Após seca, esta mistura produz membranas consistentes com potencial uso no tratamento de lesões de pele. Segundo Paul e Sharma (2004), o complexo quitosana-alginato pode gerar membranas flexíveis, finas, transparentes e mais eficientes do que os curativos convencionais.

Apesar de membranas de quitosana e alginato apresentarem propriedades adequadas quanto à biodegradabilidade, biocompatibilidade e estabilidade a mudanças de pH, a resistência mecânica do dispositivo é baixa, o que pode consistir em problemas durante o manuseio e a estocagem do material. Muitas alternativas vêm sendo analisadas para melhorar a resistência mecânica e a flexibilidade de membranas polissacarídicas.

Rodrigues (2008) incorporou glicerol durante o preparo de coacervados de quitosana-alginato. Porém o uso deste agente plastificante não se mostrou eficiente para melhorar tal propriedade, uma vez que houve remoção do glicerol nas etapas de lavagem das membranas. Tem-se como estratégia mais promissora o emprego do glicerol no meio de estocagem dos curativos, minimizando assim problemas com ruptura precoce e indesejada, reduzindo-se também seu encolhimento (Rodrigues, 2008; Dallon, 2005).

Segundo Berger *et al.* (2004), os complexos polieletrólitos podem ser reforçados através da adição de íons multivalentes que interagem com grupos não complexados, induzindo a formação de sistemas ligados ionicamente, como por exemplo, pelo íon Ca^{++} , que pode ser adicionado nos complexos de quitosana-alginato.

Nesta perspectiva, Bueno (2010) testou a adição de agentes reticulantes iônicos (cloreto de cálcio e sulfato de amônio) e covalentes (glutaraldeído) com o intuito de promover interações em maior número ou mais intensas entre as cadeias poliméricas da membrana de quitosana e alginato. Baixas concentrações de reticulantes iônicos mostraram consistir em estratégias mais efetivas e promissoras, uma vez que o aumento da concentração levou a membranas com menor resistência à tração e ao alongamento na ruptura.

Recentemente, Pires e Moraes (2015) propuseram a adição do composto siliconado Silpuran[®] 2130 A/B em membranas de quitosana-alginato contendo ou não o antimicrobiano AlphaSan[®] RC2000 e verificaram que a inclusão deste composto na formulação é uma alternativa para o aumento na tensão de ruptura e flexibilidade destes tipos de dispositivos. As membranas com adição de 0,1 g/g de Silpuran[®] 2130 A/B apresentaram superfície mais homogênea e adesiva do que aquelas obtidas na ausência do mesmo. Além do mais, tais membranas apresentaram menores espessuras e absorção de soluções aquosas, e maior estabilidade frente à exposição a diferentes soluções salinas. O Silpuran[®] 2130 A/B é um polidimetilsiloxano que possui grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva nos dois componentes da mistura (A e B). O componente A contém também catalisadores à base de platina. Segundo Ratner *et al.* (2004), a platina se liga facilmente a compostos que possuem grupamentos amina em sua estrutura, desta forma, a adição de Silpuran[®] 2130 A/B pode também contribuir na formação de complexos mais estáveis. Este agente siliconado se caracteriza por baixa viscosidade, alta adesividade, biocompatibilidade e transparência, sendo comercializado pela Wacker Chemie S.A. para aplicações em lesões. Análises por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios X mostraram, no entanto, que houve a formação de gotículas na estrutura do filme de quitosana e alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B, possivelmente resultantes da baixa dispersão do gel de silicone na mistura viscosa. Uma alternativa para melhorar a dispersão homogênea é a adição de tensoativos em membranas contendo PDMS (Fawcett *et al.*, 2012).

O efeito da adição de tensoativos em membranas de quitosana-alginato já foi descrito por Bueno e Moraes (2011), entretanto, tal incorporação foi realizada a fim de obter um dispositivo com estrutura porosa. As autoras utilizaram os surfactantes Tween 80 e Pluronic F68 e obtiveram membranas satisfatórias do ponto de vista do seu aspecto e maleabilidade, porém sua resistência mecânica e alongamento na ruptura foram baixos. Assim, a adição de Silpuran[®] 2130 A/B às mesmas poderia melhorar tais limitações e o uso de tensoativos em contrapartida, poderia resultar em um material com dispersão mais homogênea do agente

siliconado.

Não há relatos na literatura sobre a avaliação do efeito de diferentes concentrações de PDMS em membranas densas e porosas de quitosana e alginato contendo ou não compostos bioativos, o que confere caráter de originalidade a este tema de doutorado.

2.4. Incorporação de agentes bioativos em membranas

A incorporação de agentes bioativos em matrizes poliméricas tem possibilitado a obtenção de dispositivos que desempenham papéis importantes no processo de cicatrização de feridas. O uso de polímeros na composição de curativos é uma alternativa vantajosa devido à sua natureza química, morfologia e estrutura específica. As cadeias poliméricas longas possibilitam não só a proteção do fármaco, mas eventualmente, o controle de sua liberação (Green, 2012; Dallas *et al.*, 2011).

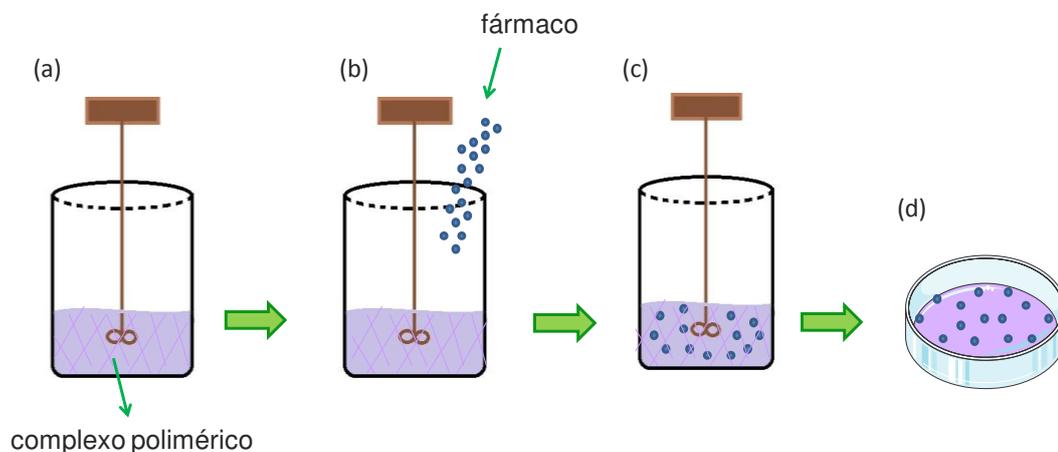
Visando obter uma liberação controlada e segura, o fármaco deve permanecer estável nas condições de processamento do dispositivo e deve também manter sua estrutura e atividade durante períodos prolongados (Papkov *et al.*, 2007). Numerosos sistemas de liberação de drogas estão já descritos na literatura, nos quais o princípio ativo a ser incorporado pode estar ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (Wang *et al.*, 2001). A incorporação em matrizes poliméricas pode ser feita em diversas etapas do processo de produção, tais como: adição durante a complexação dos polímeros, por impregnação a úmido (técnica de absorção de um solvente contendo o agente ativo) e mediada por fluidos supercríticos (Grassi e Grassi, 2005; Duarte *et al.*, 2009; Girata, 2011), além dos processos nos quais se efetua a ligação química do fármaco aos componentes da matriz polimérica.

A técnica de adição durante o processamento da membrana é o método mais utilizado, devido à facilidade de incorporação do fármaco no dispositivo, como no caso do antimicrobiano à base de prata AlphaSan[®] RC2000, em filmes de quitosana e alginato (Girata, 2011; Pires, 2013). O pó fino do fármaco é adicionado ao coacervado de quitosana e alginato e, devido à reticulação dos polímeros, o composto fica retido na matriz polissacarídica. A Figura 2.9 mostra a representação esquemática do procedimento de incorporação por adição direta de um fármaco insolúvel logo após a mistura do PEC.

Outra metodologia convencional é a incorporação ou impregnação a úmido, que

consiste na imersão da matriz polimérica em uma solução contendo o fármaco previamente dissolvido. Visto que muitos fármacos são insolúveis ou pouco solúveis em água, a utilização de solventes orgânicos pode ser requerida como, por exemplo, o etanol. No entanto, este método apresenta desvantagens, como a possível toxicidade dos solventes e a necessidade de sua evaporação, que por vezes ocorre com o uso de aquecimento ou vácuo, causando degradação do fármaco e até do dispositivo polimérico, além do baixo rendimento de incorporação caso se verifique limitado intumescimento da matriz e da dispersão heterogênea dos fármacos (Davies *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009). Como exemplo desta metodologia tem-se a incorporação de bacitracina (Rodrigues, 2008) e eritromicina (Souza *et al.*, 2016) em membranas de quitosana e alginato, que apresentaram valores de incorporação e liberação relativamente baixos.

Figura 2.9 – Representação esquemática do processamento de membranas polissacarídicas: (a) mistura das soluções poliméricas; (b) adição do fármaco; (c) dispersão do fármaco no complexo polimérico e (d) membrana polissacarídica seca com fármaco incorporado.



Uma metodologia de incorporação alternativa é a impregnação mediada por fluidos supercríticos. Neste processo, o fluido supercrítico atua como um solvente, devendo-se operar o sistema, naturalmente, em condições de pressão e temperatura acima do ponto crítico do fluido. Sob essas condições, estas substâncias apresentam densidade e propriedades de solvatação semelhantes às dos líquidos, enquanto que a difusividade e a viscosidade são comparáveis às de um gás, facilitando a transferência de massa no sistema. Ainda, os fluidos supercríticos podem dissolver um composto ativo sem alterar sua atividade biológica e simultaneamente agir como plastificante da estrutura polimérica, facilitando a difusão do

fármaco no sistema matricial (Kikic e Vecchione, 2003; Quirk *et al.*, 2004; Veiga, 2012).

O dióxido de carbono (CO₂) está entre os fluidos supercríticos mais utilizados por não ser tóxico, inflamável ou corrosivo e por ser naturalmente abundante. Além do mais, o CO₂ possui baixa temperatura e pressão crítica (iguais a 31°C e 73 bar, respectivamente), o que o torna atraente para utilização em sistemas termossensíveis (Cooper, 2001; Duarte *et al.*, 2009). Neste caso, o princípio ativo é solubilizado em CO₂ supercrítico e introduzido em uma célula de alta pressão contendo o dispositivo polimérico para que haja a impregnação. Posteriormente é feita a descompressão lenta desta célula para que haja remoção do CO₂ (Braga *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2008). No entanto, o processo de impregnação só é viável se o fármaco for solúvel em CO₂ (Kikic e Vecchione, 2003). Para auxiliar na solubilidade do fármaco, pode-se utilizar cossolventes, como água e etanol, de forma que seu uso pode resultar em modificações na interação do composto bioativo com a matriz polimérica ou mesmo com o fluido pressurizado, alterando sua taxa de incorporação (Taberner *et al.*, 2012).

Veiga (2012) incorporou os anti-inflamatórios diclofenaco de sódio, piroxicam e cetoprofeno em membranas de quitosana-xantana, quitosana-pectina e quitosana-goma guar. Os resultados obtidos mostraram que as membranas produzidas apresentaram comportamentos distintos para cada fármaco. O diclofenaco de sódio, por se tratar de um fármaco hidrofílico, não apresentou as características necessárias para a incorporação por tecnologia supercrítica. Ao contrário, o piroxicam e o cetoprofeno foram incorporados com sucesso utilizando tecnologia supercrítica, demonstrando que esta técnica pode ser utilizada em membranas biopoliméricas.

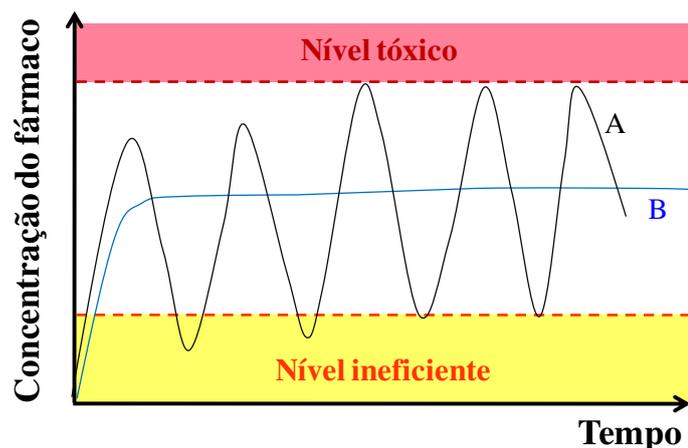
Nesta mesma perspectiva, Bueno *et al.* (2016) avaliaram as características de membranas densas e porosas de quitosana-alginato antes e após serem submetidas ao processamento com CO₂ supercrítico a fim de analisar se as membranas suportariam as condições controladas de temperatura (45 °C), pressão (100 ou 300 bar) e despressurização (taxa de 5 bar/min). As autoras notaram que tal metodologia auxilia no aumento da espessura, sorção e transmissão de vapor d'água das formulações. Os resultados obtidos mostraram que os filmes produzidos e submetidos ao sistema supercrítico apresentaram características desejáveis para utilização no tratamento de lesões de pele. Adicionalmente, Bueno (2015) incorporou o antimicrobiano polihexametileno biguanida (PHMB) em membranas de quitosana-alginato usando a mesma metodologia. No entanto, a autora não detectou quantidades mensuráveis de PHMB liberado das membranas, supondo, desta forma, que o

agente bioativo ficou firmemente ligado à matriz ou que, de fato, não houve impregnação detectável de PHMB via CO₂ supercrítico. Não foram encontrados na literatura relatos sobre a incorporação de fármacos em membranas flexíveis de quitosana-alginato por tecnologia supercrítica.

Independente da técnica de incorporação de compostos ativos a ser empregada no processamento de membranas, adequada eficiência de incorporação é requerida. No entanto, é importante controlar a taxa de liberação do fármaco incorporado a fim de evitar efeitos nocivos ou ineficiência do tratamento.

Quando em contato com a lesão, o dispositivo deve liberar o fármaco de modo controlado para evitar variações bruscas de concentração da substância ativa no corpo. Nos tratamentos convencionais em que não há controle da liberação (como comprimidos não recobertos e injeções), o fármaco pode atingir concentrações altas no organismo, o que pode causar algum tipo de reação adversa. Da mesma forma, o medicamento pode atingir concentrações baixas e não efetivas no organismo (Comyn, 1985). Na Figura 2.10 são mostradas as curvas referentes ao tratamento sem e com dispositivos de liberação controlada.

Figura 2.10 – Concentração de fármaco versus tempo no organismo para (A) dispositivos sem liberação controlada e (B) mediada por dispositivo de liberação controlada (adaptado de Comyn, 1985).



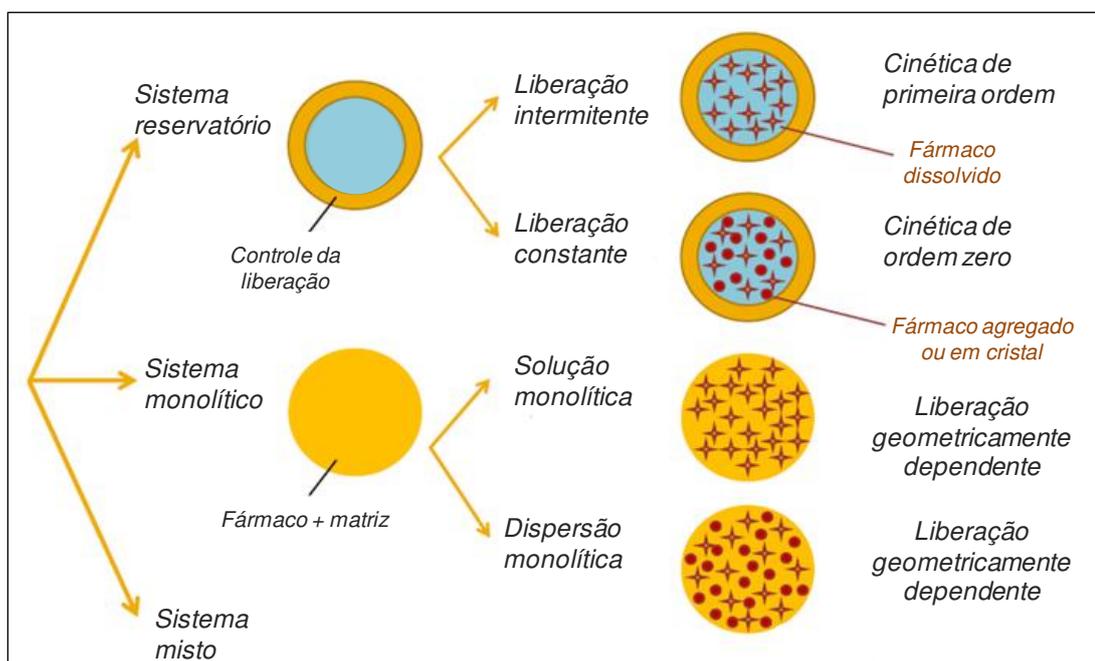
Neste contexto, a utilização de sistemas matriciais poliméricos visando ao uso como dispositivos para liberação de fármacos é uma ótima alternativa devido à sua versatilidade, eficácia e baixo custo. Em geral, a liberação dos compostos bioativos das matrizes pode ser

resultante de vários fatores, tais como: erosão e intumescimento da matriz, taxa de penetração de água na matriz, difusão e distribuição do fármaco na matriz, proporção entre o fármaco e a quantidade de polímero, dentre outros (Caraballo, 2009).

Girata (2011) analisou os dados da cinética de liberação de íons prata a partir de filmes de quitosana-alginato e os ajustou a diferentes modelos matemáticos, notando que o mecanismo principal que caracteriza a liberação do composto deste tipo de matriz é a difusão. A difusão acontece quando o solvente penetra na matriz, intumescendo a mesma (auxiliando no distanciamento das cadeias poliméricas), e ocasionando a dissolução e difusão do fármaco (Grassi e Grassi, 2005). Entretanto, caso o composto incorporado tenha baixa solubilidade em água, uma etapa também importante na cinética de liberação é a etapa de dissolução do fármaco disperso na membrana na forma cristalina.

Neste sentido, na Figura 2.11 são mostradas as classificações dos sistemas matriciais para liberação controlada de fármacos, tendo-se a difusão como primordial mecanismo de transporte. De acordo com Siepmann e Siepmann (2008), existem dois tipos de sistemas que distinguem a liberação de fármacos em matrizes, sendo estes sistemas os de reservatórios e os monolíticos. Ambos os sistemas dependem diretamente da estrutura dos materiais que os compõem e da concentração e solubilidade do fármaco incorporado.

Figura 2.11 – Classificação dos sistemas matriciais para liberação controlada de fármacos por difusão (adaptado de Siepmann e Siepmann, 2008).



O sistema reservatório consiste em um depósito de fármacos no interior de uma matriz envolvida por uma membrana responsável pelo processo de liberação controlada do composto. Para este caso, quando o composto bioativo apresentar uma concentração inferior à sua solubilidade há uma liberação de primeira ordem, na qual a concentração no interior da matriz decresce com o tempo. Por outro lado, quando a concentração de fármaco é superior à sua solubilidade há a predominância de liberação de ordem zero, em que a concentração do composto dentro da matriz e o processo de liberação são constantes e dependentes da dissolução do fármaco em excesso.

Já o sistema monolítico é caracterizado por uma matriz contínua, tendo-se em vista que não há separação entre o reservatório do fármaco e a barreira de liberação. Neste caso, quando a concentração do fármaco é inferior à sua solubilidade o sistema é denominado solução monolítica. Ao contrário, quando a concentração é superior à solubilidade, o sistema é do tipo dispersão monolítica. No entanto, independentemente da solubilidade do fármaco, a liberação é diretamente dependente da geometria da matriz, uma vez que o composto bioativo incorporado deve se difundir pela estrutura polimérica para ser liberado.

Em paralelo aos sistemas abordados, há também um terceiro tipo que agrega as características primordiais do sistema de reservatório e do monolítico, este é denominado sistema misto, nos quais a liberação irá depender da geometria da matriz, da difusão do fármaco no interior da matriz e também através da membrana envoltória.

De forma geral, no âmbito deste trabalho, as matrizes poliméricas desenvolvidas são classificadas como sistemas monolíticos, nas quais a substância ativa pode estar molecularmente dispersa ou dissolvida entre as cadeias de polímeros.

Diversas substâncias bioativas podem ser incorporadas em matrizes poliméricas e, no âmbito deste trabalho, foram selecionados compostos de origem natural, tais como timol, betacaroteno e o extrato padronizado da planta *Arrabidaea chica* Verlot, os quais são discutidos a seguir.

2.5. Agentes bioativos naturais utilizados no tratamento de lesões de pele

O uso de compostos naturais para o tratamento de lesões de pele consiste em uma prática muito antiga. Nas últimas décadas essa prática foi substituída pela aplicação de produtos sintéticos, os quais podem apresentar fortes efeitos colaterais. Atualmente, os

produtos de origem natural vêm sendo investigados como fonte alternativa de medicamentos para o tratamento de lesões de pele, os quais modulam o processo de cicatrização e reparação com complicações mínimas (Corrêa *et al.*, 2017).

Uma vasta gama de compostos de origem natural tem sido utilizada na cicatrização de lesões cutâneas devido às suas propriedades farmacológicas específicas. Biomoléculas de origem vegetal, geralmente produtos do metabolismo primário e secundário, quando purificadas e concentradas podem exercer ações benéficas, tais como analgésicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Adicionalmente, estas propriedades podem causar efeito sinérgico no tratamento de feridas, auxiliando na reepitelização e formação de colágeno (Pletschi, 1998; Banús e Bertrán, 2012; Sivamani *et al.*, 2012). Na Tabela 2.3 são mostrados alguns compostos naturais conhecidos para o tratamento de lesões de pele. No âmbito do presente trabalho, foram utilizados timol, betacaroteno e o extrato padronizado da *Arrabidaea chica* Verlot.

2.5.1. Timol

O timol é um monoterpene fenólico monocíclico que está presente nos óleos essenciais derivados do tomilho (*Thymus vulgaris*) e do orégano (*Origanum vulgare*) (Kavoosi *et al.*, 2013). A estrutura química do timol é mostrada na Figura 2.12. Na Tabela 2.4 são apresentadas informações relevantes sobre o timol. Este composto possui diversas aplicações devido a suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antissépticas, anestésicas e anti-inflamatórias (Kavoosi *et al.*, 2013; Priestley *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2011). Na Tabela 2.5 as principais aplicações do timol são resumidas.

Dentre todas as áreas que empregam timol, é na indústria de alimentos sua maior aplicação. Existem poucos trabalhos que exploraram o timol para aplicação na área médica, uma vez que muitas de suas características são ainda pouco conhecidas (Kavoosi *et al.*, 2013). No entanto, as propriedades já conhecidas deste composto fazem dele uma substância com potencial aplicação nas áreas farmacêuticas e biomédicas (Priestley *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2011; Kavoosi *et al.*, 2013).

Segundo Riella *et al.* (2012), o timol é um composto que pode ser direcionado para aplicação no tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras e úlceras, devido às suas propriedades anti-inflamatórias. Além do mais, o timol favorece a reação de granulação e aumenta a densidade de colágeno durante a cicatrização da lesão.

Tabela 2.3 – Principais compostos naturais utilizados para o tratamento de lesões de pele.

Composto natural e/ou sua fonte	Características	Referência
<i>Aloe Vera</i> (aloína)	Reduz a dor e a inflamação, estimula a cicatrização e repara as células danificadas.	Das <i>et al.</i> , 2016; Sanchez <i>et al.</i> , 2016; Dorai, 2012
<i>Arrabidaea chica</i> Verlot	Promove crescimento de fibroblastos e síntese de colágeno	Jorge <i>et al.</i> , 2008; Sousa, 2013; Medina <i>et al.</i> , 2015
Betacaroteno	Antioxidante e precursor de vitamina A	Darvin <i>et al.</i> , 2011; Stechmiller, 2013
<i>Calendula officinalis</i> (calêndula)	Anti-inflamatório, auxilia na formação do tecido de granulação	Nicolaus <i>et al.</i> , 2017; Buzzi <i>et al.</i> , 2016; Aro <i>et al.</i> , 2015.
<i>Carica papaya</i> (papaína)	Desbridante, anti-inflamatório, atua na contração e junção das bordas da ferida.	Leite <i>et al.</i> , 2012; Ancheta e Acero, 2016
<i>Curcuma longa</i> (açafão)	Antitumoral, antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, antialérgico	Purohit <i>et al.</i> , 2013; Pawar <i>et al.</i> , 2015.
<i>Matricaria chamomilla</i> (camomila)	Antimicrobiano, anti-inflamatório, auxilia na formação do tecido de granulação	Srivastava <i>et al.</i> , 2010; Martins, 2009
Mel	Antimicrobiano, anti-inflamatório, auxilia na formação do tecido de granulação	Majtan, 2014; Tanideh <i>et al.</i> , 2017
Própolis	Antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório	Corrêa <i>et al.</i> , 2017; Paixão <i>et al.</i> , 2014
Quercetina	Antioxidante e anti-inflamatório	Hatahet <i>et al.</i> , 2016; Caddeo <i>et al.</i> , 2014
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (barbatimão-verdadeio)	Anti-inflamatório, antimicrobiano, antiulcerogênico, antioxidante	Lima <i>et al.</i> , 2016; Hernandez <i>et al.</i> , 2010
<i>Thymus vulgaris</i> (timol)	Antioxidante, antimicrobiano, anestésico, anti-inflamatório	Kavoosi <i>et al.</i> , 2013; Riella <i>et al.</i> , 2012; Priestley <i>et al.</i> , 2003

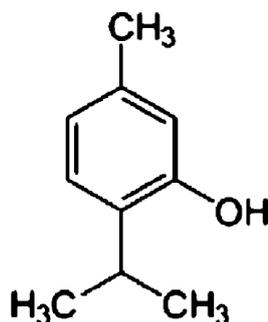
Figura 2.12 – Estrutura química do timol (Archana *et al.*, 2009).

Tabela 2.4: Dados físico-químicos do timol (Sigma-Aldrich, 2015; PubChem, 2016).

<i>Característica</i>	<i>Informação ou valor</i>
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₄ O
Massa molar	150,22 g/mol
Solubilidade em água	0,8 g/L (20 - 25 °C)
Densidade	0,965 g/cm ³ a 25 °C
Ponto de fusão	48 – 51 °C
Ponto de ebulição	232 °C
Pressão de vapor	0,016 mmHg (25 °C)
pKa	10,6
Coeficiente de partição (log P)	3,3
Grupamentos doadores de hidrogênio	1
Grupamentos receptoras de hidrogênio	1
Pico de maior absorbância em espectrofotômetro na faixa UV-visível	274 nm

Altiok *et al.* (2010) avaliaram as propriedades físicas, antibacterianas e antioxidantes de filmes de quitosana contendo várias concentrações de óleo de tomilho (0,2 a 1,2% v/v) para aplicação na cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que os filmes contendo 1,2% de tomilho apresentaram melhores atividades antibacterianas e antioxidantes, no entanto, algumas propriedades do biomaterial foram alteradas, observando-se aumento da permeabilidade ao vapor d'água e diminuição nas propriedades mecânicas. No entanto, apesar das alterações, o dispositivo mostrou potenciais características para sua aplicação em lesões

de pele.

Tabela 2.5: Ramos de aplicação e utilização do timol (adaptado de Banús e Bertrán, 2012; Daemon *et al.*, 2012; Gavliakova *et al.*, 2013; PubChem, 2016).

<i>Ramo de aplicação</i>	<i>Uso</i>
Produtos de higiene pessoal	Enxaguante bucal e creme dental
Agricultura	Pesticida
Veterinária	Tratamento de dermatites, controle de carrapatos e de ácaros parasitários de abelhas
Indústria de alimentos	Conservante e embalagens de alimentos
Saúde humana	Cicatrização de feridas e antipiréticos - nasal

Nesta mesma perspectiva, Dias *et al.* (2011) avaliaram filmes baseados em carboxibutilquitosana e agarose com incorporação dupla e isolada de timol e quercetina por tecnologia supercrítica, ambos a uma concentração de 10% do limite de solubilidade em CO₂ supercrítico. Os resultados mostraram que os dois fármacos foram incorporados com sucesso, sendo a incorporação dupla um processo viável e vantajoso, uma vez que os compostos são estáveis à mudança nas condições operacionais de pressão e temperatura. A liberação em água de timol e quercetina alcançou o máximo de 25 µg dos compostos por mg de polímero.

Embora o número de estudos sobre os efeitos citotóxicos de timol ainda sejam limitados, os dados disponíveis reforçam a perspectiva de que o uso deste composto não representa alto risco para os pacientes quando administrado em quantidades apropriadas. A toxicidade do timol a células hepáticas (linhagem H4IIE) foi analisada por Kurt e colaboradores (2017), que observaram morte celular pouco significativa na presença de 0,07 a 10 mM deste composto natural. Nesta mesma perspectiva, Cabello *et al.*, (2014) notaram que o timol não induz atividade mutagênica e efeito genotóxico a células de adenocarcinoma de cólon humano (linhagem Caco-2). Recentemente, Al-Shahrani *et al.* (2017) determinaram que a concentração inibitória mínima (CIM₅₀) de timol para células de glândulas mamárias humanas (linhagem MDA-MB-231) localiza-se na faixa de 0,5 e 5 mg/mL. Rodriguez-Garcia *et al.* (2016), por outro lado, determinaram que a dose terapêutica de timol é de 0,5 mg/Kg, e a letal, de 565,7 mg/Kg.

Não foram encontrados na literatura trabalhos referentes à incorporação de timol em membranas de quitosana e alginato.

2.5.2. *Betacaroteno*

O betacaroteno é um carotenoide importante na coloração dos vegetais e frutas, como por exemplo, cenoura, beterraba e manga (Verpoorte e Memelink, 2002). Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 2.13 e suas principais propriedades são apresentadas na Tabela 2.6.

Figura 2.13 – Estrutura molecular do betacaroteno (Sharma *et al.*, 2012).

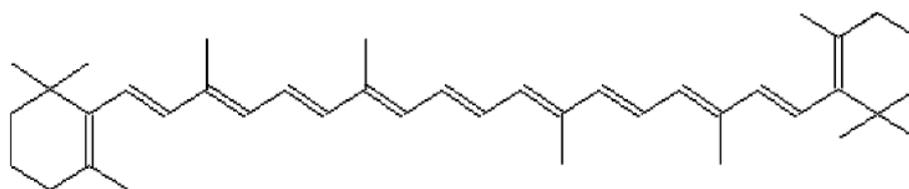


Tabela 2.6: Dados físico-químicos do betacaroteno (Sigma-Aldrich, 2011, PubChem, 2016).

<i>Característica</i>	<i>Informação ou valor</i>
Fórmula	C ₄₀ H ₅₆
Massa molar	536,87 g/mol
Solubilidade em água	0,0006 g/L a 25 °C
Densidade	1,000 g/cm ³ a 20 °C
Ponto de fusão	176 – 184 °C
Pressão de vapor	1,8 x 10 ⁻¹¹ mmHg (25 °C)
Coefficiente de partição	13,5
Pico de maior absorbância em espectrofotômetro na faixa UV-visível	450 nm

É um composto importante por apresentar atividade antioxidante e por ser precursor de vitamina A. No entanto, devido a seu elevado grau de insaturação, este carotenoide pode

sofrer oxidação térmica e química, além de fotossensibilização (Liang *et al.*, 2013). Segundo Franceschi *et al.* (2010), isto ocorre pela isomerização da forma *trans*-carotenoide (forma estável) para *cis*-carotenoide quando a molécula é exposta a oxigênio, luz e alta temperatura.

O betacaroteno pode ser utilizado em diversas áreas, como nutrição, cosméticos, alimentos e saúde. Na Tabela 2.7 são apresentados exemplos destas aplicações. Há três formas de administração deste carotenoide no organismo: administração sistêmica por alimentos ricos em betacaroteno, ingestão de suplementos alimentares e aplicação tópica destes antioxidantes na forma de cremes e loções (Darvin *et al.*, 2011). No âmbito médico, estudos epidemiológicos identificaram que, quando ingerido, o betacaroteno apresenta benefícios à saúde, como no tratamento de doenças cardiovasculares e câncer (Qian *et al.*, 2012). Ainda, alguns trabalhos apontam os benefícios da utilização de betacaroteno para acelerar a cicatrização de lesões de pele (Darvin *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011; Blass *et al.*, 2012).

Tabela 2.7: Campos e formas de aplicação do betacaroteno (Qian *et al.*, 2012; Blass *et al.*, 2012; Darvin *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2013).

<i>Campos de aplicação</i>	<i>Formas de aplicação</i>
Nutrição	Suplementos orais, alimentos ricos em betacaroteno
Cosméticos	Cremes e loções
Alimentos	Corantes, embalagens e filmes de recobrimento
Saúde	Comprimidos e pomadas

Tendo em vista que lesões ou fatores de estresse sobre a pele induzem a produção de radicais livres e, conseqüentemente, provocam a destruição do tecido, o uso de agentes antioxidantes vem sendo uma alternativa promissora para corrigir estes danos. Além de restabelecer a rede antioxidante da pele, o betacaroteno possui efeitos como supressão de pigmentação e de formação de hematomas, estimulação da produção de colágeno e efeitos anti-inflamatórios (Darvin *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, o betacaroteno é um dos principais precursores de vitamina A. Esta vitamina estimula o sistema imunológico pelo aumento do número de

macrófagos e monócitos durante a inflamação. Além do mais, induz a repitelização pela deposição de colágeno pelos fibroblastos. Devido a todas essas propriedades, este carotenoide pode desempenhar um papel muito importante na cicatrização de feridas durante a fase inflamatória (Stechmiller, 2013).

Apesar de haver registros na literatura acerca da ação do betacaroteno administrado por via oral na cicatrização de lesões, não foram encontrados relatos de trabalhos envolvendo a incorporação de betacaroteno em curativos para aplicação direta em lesões de pele, oferecendo caráter adicional de ineditismo ao presente trabalho.

2.5.3. *Arrabidaea chica* Verlot

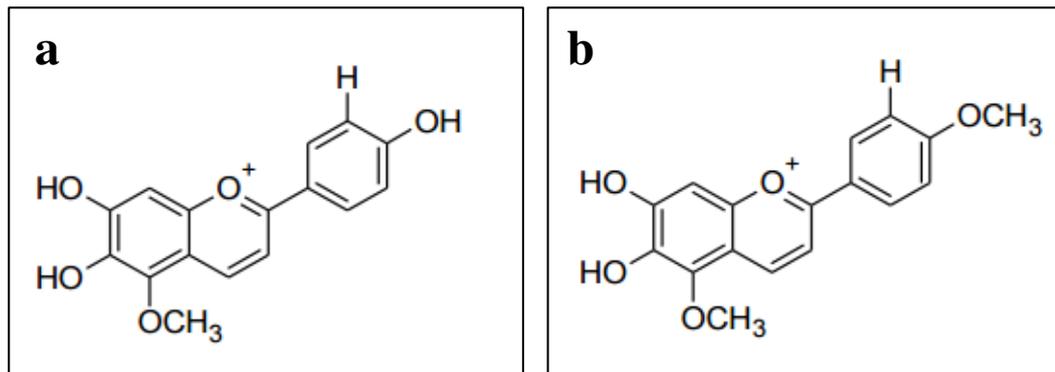
O gênero *Arrabidaea* pertence à família Bignoniaceae sendo encontrado, geralmente, na América tropical, desde o sul do México até o Brasil, sendo muito comum na Floresta Amazônica (Sá *et al.*, 2016; Sousa, 2013). Popularmente, esta planta é conhecida como pariri (no Pará), carajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz (Behrens *et al.*, 2012).

Esta planta é fonte de antocianinas, flavonoides e taninos que, quando em conjunto, conferem propriedades biológicas ao composto (Lila, 2004). As antocianinas são pigmentos pertencentes ao grupo dos flavonoides e apresentam capacidade anti-inflamatória e antioxidante (Aro *et al.*, 2013). As principais antocianinas no extrato de *A. chica* são denominadas carajurina e carajurona, sendo a carajurina o composto utilizado como marcador na detecção e quantificação do extrato de *A. chica*. Na Figura 2.14 são apresentadas as estruturas químicas destes dois pigmentos característicos. Os flavonoides são componentes de baixa massa molar que possuem ação anti-inflamatória, anti-fúngica e antioxidante (Alcerito *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002). Os taninos são compostos fenólicos e podem se ligar fortemente a outras moléculas. Neste sentido, quando seu uso for direcionado a processos de cicatrização de lesões, há a complexação entre taninos-proteínas ou taninos-polissacarídeos, conferindo uma camada protetora sobre a mucosa ou tecido lesado, auxiliando na rápida cicatrização. Adicionalmente, os taninos podem apresentar ação antisséptica e antioxidante (Haslam, 1996; Monteiro *et al.*, 2005).

O extrato das folhas de *A. chica* começou a ser utilizado pelos índios devido aos seus pigmentos insolúveis característicos, que apresentam coloração vermelho-escuro ou

vermelho-tijolo (carajurina e carajurona). O extrato era utilizado diretamente na pele como tintura, repelente de insetos e para o tratamento de enfermidades e as folhas eram utilizadas para limpar feridas crônicas, tratar infecções fúngicas e herpes (Barbosa *et al.*, 2008; Sousa, 2013; Mafioletti *et al.*, 2013; Medina, 2014).

Figura 2.14 – Estrutura molecular da carajurona (a) e carajurina (b) (Medina, 2014).



Diversas pesquisas registram as propriedades medicinais do extrato da planta *A. chica*. Há relatos de estudo antiviral de *A. chica*, tendo-se em vista que a mesma apresenta potencial efeito cicatrizante em herpes e aftas. Jorge *et al.* (2008) investigaram, *in vitro*, a capacidade deste extrato em estimular o crescimento de fibroblastos e a produção de colágeno. Adicionalmente, estudaram as propriedades cicatrizantes do composto através da administração tópica em ratos. Os resultados mostraram eficiência significativa do extrato em promover o crescimento de fibroblastos e a síntese de colágeno, tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*, observando-se ainda moderada capacidade antioxidante e redução de 96% no tamanho das lesões em ratos, enquanto o grupo controle (tratamento com solução salina) reduziu de cerca de 36%.

Nesta mesma perspectiva, Sousa (2013) desenvolveu bases semi-sólidas (cremes) contendo 2,5% do extrato de *A. chica* na sua forma livre e encapsulada, utilizando-se goma guar, goma de cajueiro e mistura de goma arábica e maltodextrina como agente encapsulante, a fim de avaliar as propriedades cicatrizantes quando aplicadas em úlceras cutâneas (cirurgicamente induzidas) de ratos e também a capacidade de estimular a síntese de colágeno nos mesmos. Todas as formulações testadas contendo o composto bioativo foram capazes de reduzir entre 70 e 80% da área da ferida após 10 dias de tratamento, enquanto o grupo controle reduziu 37% durante o mesmo período. A síntese de colágeno mostrou-se mais

evidente quando na presença do extrato bruto livre.

Medina *et al.* (2015), por sua vez, produziram nanopartículas de quitosana carregadas com diferentes concentrações de extrato padronizado de *A. chica* (10 a 25% com relação a massa de quitosana). As autoras notaram que baixas concentrações do composto já foram suficientes para manter a viabilidade celular, enquanto que nanopartículas carregadas com maiores concentrações resultaram em maior proliferação das células. A fim de explorar a aplicação tópica, Medina (2014) veiculou nanopartículas contendo *A. chica* em filmes absorvíveis de álcool polivinílico ou hidrogéis de ácido hialurônico em modelo de úlcera dérmica em ratos Wistars. A autora notou contração da área da ferida em até 79% dos animais tratados com os filmes contendo 0,5 mg de nanopartículas e 85% de contração nos animais que receberam hidrogéis contendo 1,5 mg de nanopartículas. Desta forma, constatou-se que a produção de sistemas de transporte de *A. chica* é viável, mostrando-se como uma alternativa promissora para a reparação de tecidos lesados.

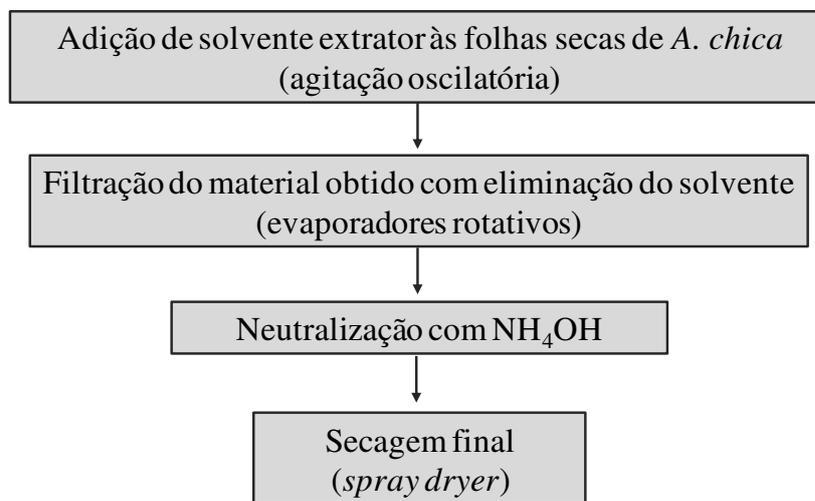
Assim, devido ao uso difundido pelas populações nativas e às corroborações de seus efeitos cicatrizantes, esta espécie está presente na lista de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) para o uso popular para o tratamento de lesões de pele (Brasil, 2009).

Em escala laboratorial, geralmente, o extrato da planta *Arrabidaea chica* Verlot (*A. chica*) pode ser obtido através do processo de maceração dinâmica (Jorge *et al.*, 2008; Sousa, 2013; Medina *et al.*, 2015). Na Figura 2.15 é mostrado o fluxograma representativo do processo de extração, que consiste na adição de solvente extrator (composto de etanol e ácido cítrico) às folhas secas e moídas da *A. chica* em agitador oscilatório. A extração em meio ácido fraco é utilizada a fim de manter a estabilidade das antocianinas à degradação por oxidação. O extrato obtido é então filtrado e o solvente resultante eliminado através da utilização de rotoevaporador a vácuo, até a obtenção de 80% de concentração do extrato bruto. Posteriormente, há a etapa de neutralização do resíduo sólido com hidróxido de amônio a fim de alcançar pH 6,5-7,0. A etapa final consiste de secagem do material utilizando-se atomizador do tipo *spray dryer* em condições operacionais apropriadas, não havendo necessidade do uso de agentes estabilizantes ou de gases inertes.

Em paralelo ao processo de maceração dinâmica, existe outra alternativa para a obtenção do extrato da planta de *A. chica*, sendo esta o tratamento enzimático (especificamente pelas enzimas xilanases). No entanto, apesar dos rendimentos médios dos dois tipos de extrações serem análogos, o extrato obtido pela mediação das xilanases diminui

consideravelmente o crescimento de fibroblastos de camundongos (linhagem 3T3) devido ao aumento nas quantidades de antocianinas do extrato. Segundo os autores, o aumento de antocianinas (agliconas) diminui o estímulo ao crescimento celular (Taffarello *et al.*, 2013). Desta forma, o tratamento enzimático resulta em um extrato com características farmacológicas distintas, o que dificulta a padronização do extrato da planta *A. chica* e consequentemente, a segurança na aplicabilidade em humanos.

Figura 2.15 – Fluxograma representativo da obtenção do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.



A padronização dos extratos de planta quanto a características qualitativas e quantitativas dos seus princípios ativos é um requisito crucial para que tais materiais possam ser utilizados pela indústria farmacêutica, envolvendo, por exemplo o controle das características genéticas da planta e o uso de procedimentos bem estabelecidos, nos quais não haja variação nas condições de obtenção do extrato, como tipo de solvente, temperatura de extração, secagem e da proporção de componentes bioativos na mesma. Com isto, pelo controle rigoroso da qualidade do material de partida e das condições utilizadas no processo de produção do extrato é possível a obtenção de um composto complexo, mas com propriedades conhecidas e reprodutíveis.

Não há relatos na literatura sobre a incorporação do extrato padronizado de *A. chica* em filmes densos e porosos constituídos por complexos de quitosana e alginato a fim de se obter um dispositivo de liberação controlada com aplicabilidade na terapia de lesões de pele.

2.6. Considerações finais

Com base nos temas abordados nesta revisão bibliográfica, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novos curativos com boas propriedades analgésicas, antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, e cujas matérias-primas sejam de fácil acesso e baixo custo. Membranas flexíveis densas e porosas de quitosana e alginato contendo os compostos bioativos podem ter apreciável impacto na prevenção e terapia das infecções. Contudo, há a necessidade de se estudar mais detalhadamente a influência do agente siliconado isolado ou quando adicionado juntamente com um tensoativo na liberação dos compostos bioativos. Além do mais, a viscosidade do alginato também deve ser levada em conta para a obtenção de materiais mais homogêneos e com melhor dispersão do agente siliconado. Assim, no presente trabalho propôs-se analisar o potencial uso de membranas flexíveis densas e porosas de quitosana-alginato contendo os agentes bioativos descritos como curativos de liberação controlada de fármacos para a terapia de lesões dérmicas.

Membranas de quitosana-alginato são altamente estáveis quando submetidas aos métodos de incorporação por adição direta à mistura, por impregnação em solução contendo o agente ativo solubilizado (Bueno, 2015; Souza *et al.*, 2016) e mediada por CO₂ supercrítico (Bueno *et al.*, 2016). Desta forma, a partir do conhecimento das características moleculares de timol, betacaroteno e extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot, pretendeu-se selecionar a melhor metodologia de incorporação para cada composto bioativo e avaliar quais formulações seriam as mais apropriadas para o tratamento de lesões de pele.

De posse dessas informações e com base em ensaios biológicos preliminares, seria possível estabelecer a forma recomendada de utilização clínica dos dispositivos.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

Para a produção das membranas, utilizou-se quitosana com grau de desacetilação de 96% (código do produto C3646, lote 109K0043V e massa molar $1,26 \times 10^6$ g/mol da Sigma-Aldrich), alginato de sódio de baixa viscosidade (código do produto A0682, lote 081M1093V e massa molar $2,49 \times 10^4$ g/mol) e de média viscosidade (código do produto A2033, lote 058K0126 e massa molar $9,11 \times 10^4$ g/mol), ambos obtidos de algas marrons do tipo *Macrocystis pyrifera* (Sigma-Aldrich), Silpuran[®] 2130 A/B (Wacker Chemie AG), Kolliphor[®] P188 (lote SLBL0262V, Sigma-Aldrich), sabonete líquido neutro (Granado), ácido acético glacial, cloreto de cálcio dihidratado e hidróxido de sódio (Merck). Os agentes bioativos utilizados foram timol (código do produto T0501, lote SLBB4066V, Sigma-Aldrich), betacaroteno (código do produto 22040, lote BCBG5235V, Sigma-Aldrich), e extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot produzido na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP e gentilmente doado pela Prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP. A água utilizada foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q[®] da Millipore.

3.2. Preparação das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato

A preparação das membranas flexíveis densas e porosas de quitosana-alginato contendo ou não timol, betacaroteno e o extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2010) e adaptados por Pires (2013).

Para a obtenção das membranas, 180 mL de solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético a 2% (m/v) foram adicionados, com auxílio de uma bomba peristáltica (modelo Minipuls 3, Gilson), a 360 mL de solução de alginato 0,5% (m/v) em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm. A mistura das soluções foi feita a uma vazão de 200 mL/h, sendo o sistema mantido a 25 °C utilizando-se um banho ultratermostático (214 M2, Quimis) e sob agitação constante de 500 rpm empregando-se um agitador mecânico (251 D, Quimis) provido de uma hélice do tipo pás inclinadas de raio 2,1 cm. Ao término da mistura entre as soluções, a taxa de agitação foi

aumentada para 1000 rpm e a mistura foi agitada por mais 10 minutos. A seguir, adicionou-se solução aquosa de NaOH a 2 M (cerca de 26 mL) para elevar o pH a aproximadamente 7,0, mantendo-se a agitação do sistema por mais 10 minutos. Após esta etapa, para as membranas flexíveis, foram adicionados de 36 a 720 μL de Silpuran[®] 2130 A/B à mistura, equivalendo a razões de 0,01 a 0,20 g de polímero sintético por grama de polissacarídeos. Em seguida, para reticulação primária do complexo polieletrólito, foram adicionados 7,2 mL de solução de CaCl_2 a 2% e a mistura permaneceu sob agitação por mais 10 minutos. O sistema utilizado para a produção do complexo polimérico encontra-se ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Sistema de produção do complexo polimérico.



A mistura obtida foi desaerada em bomba vácuo (Q-355B2, Quimis) por 120 minutos. Em seguida o material resultante foi dividido igualmente em termos mássicos em quatro placas de *Petri* de poliestireno de 15 cm de diâmetro e levada à estufa com circulação de ar (modelo 410D, Nova Ética) para secagem por 20 horas a 37 °C.

Após a secagem, cada membrana foi imersa por 30 minutos em 150 mL de CaCl_2 a 2%, para reticulação secundária do PEC, sendo realizada em seguida a lavagem dos dispositivos por meio de duas imersões por 30 minutos, em 200 mL de água deionizada. A secagem final foi realizada à temperatura ambiente.

Para as membranas porosas, foram adicionados 0,1 g do tensoativo Kolliphor[®] P188 por grama de polissacarídeo à solução de alginato, o que equivale a adição de 0,4 g (Bueno, 2015), não tendo sido realizada, neste caso, a etapa de desaeração, pois visava-se justamente à

obtenção de material poroso. As etapas restantes seguiram conforme já descrito.

3.3. Incorporação de compostos bioativos

A incorporação de compostos bioativos em matrizes poliméricas foi realizada por três metodologias: por adição direta à mistura polimérica durante a produção das membranas, por imersão do filme seco em uma solução contendo o composto bioativo dissolvido e por impregnação mediada por CO₂ supercrítico. Estas três formas de incorporação são descritas a seguir:

3.3.1. Incorporação por adição direta à mistura polimérica

A incorporação durante o processamento das membranas foi realizada imediatamente após a etapa de reticulação primária do PEC, através da adição dos compostos, dissolvidos ou não em etanol, nas concentrações mostradas na Tabela 3.1, sob agitação constante a 1000 rpm por 2 minutos. As etapas seguintes de secagem e lavagem foram realizadas normalmente.

Tabela 3.1 – Concentrações utilizadas durante a incorporação por adição direta dos compostos bioativos.

Composto bioativo	Massa total do composto bioativo adicionado (mg)	Relação entre a massa de agente bioativo e a soma das massas de Q e A (%)	Volume de etanol para dissolução (mL)
Timol	360	10,00	1,0
Betacaroteno	3,04	0,08	1,0
Extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot	120	3,33	1,0
	240	6,66	
	360	10,00	
	480	13,33	

3.3.2. Incorporação por impregnação em solução

Este ensaio foi realizado somente na primeira etapa do trabalho, que compreendeu a preparação das membranas com alginato de baixa viscosidade contendo os compostos naturais timol e betacaroteno.

Membranas secas (2 cm x 2 cm) foram imersas em 5 mL de solução etanólica contendo os compostos bioativos dissolvidos a uma concentração de 2,1 mg/mL e $4,32 \times 10^{-3}$ mg/mL

para timol e betacaroteno, respectivamente. O procedimento foi realizado a uma agitação de 100 rpm, a 37°C e por 24 h.

3.3.3. Impregnação de timol e betacaroteno mediada por CO₂ supercrítico

A incorporação por deposição com CO₂ supercrítico foi realizada em membranas secas com dimensões de 1 cm x 1 cm, de acordo com o método proposto por Braga *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2010). Os compostos bioativos timol e betacaroteno foram solubilizados por uma mistura de CO₂ supercrítico e 1,3% (v/v) de etanol como co-solvente. A etapa de solubilização e a deposição dos compostos ocorreram no interior de uma célula de impregnação a 250 bar e 50 °C por 14 h. Após este período, o sistema foi despressurizado a 5 e 10 bar/min. Foram utilizados 10% do limite de solubilidade de timol (63 mg) e a solubilidade máxima de betacaroteno (0,13 mg) em CO₂ supercrítico, o que equivale a 2,1 mg/mL e $4,32 \times 10^{-3}$ mg/mL, respectivamente. A quantidade estabelecida para cada fármaco na forma sólida foi colocada no fundo da célula, e a homogeneização da mistura contendo CO₂, etanol e fármacos durante o processo de impregnação foi realizada com auxílio de agitação magnética a 800 rpm.

3.4. Caracterização das membranas

As membranas foram caracterizadas fundamentalmente de acordo com os procedimentos descritos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2010) e Girata (2011). Anteriormente às caracterizações, as amostras foram armazenadas por pelo menos 24 horas em dessecador contendo sílica-gel ativada. As metodologias empregadas são descritas a seguir.

3.4.1. Aspecto das membranas

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto visual a olho nu, registrando-se os resultados através de fotografias digitais em câmera Nikon (modelo COOLPIX S3300).

3.4.2. Espessura das membranas

O valor da espessura das membranas foi determinado pela utilização de micrômetro

digital IP54 (Mitutoyo, model MDC-25S), através de medições em dez diferentes pontos ao longo da extensão da membrana, sendo o resultado final expresso pela média dos dados coletados.

3.4.3. Morfologia da superfície e da secção transversal

A morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi analisada usando um microscópio eletrônico de varredura (modelo Leo 440i, Leica). Amostras de 2 cm x 1 cm foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (92 Å) em suas superfícies.

3.4.4. Espectroscopia de energia dispersiva de Raio-X (EDS)

Análises de EDS foram realizadas a fim de detectar a presença de silício proveniente do Silpuran[®] 2130 A/B nas amostras. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 440, Leica.

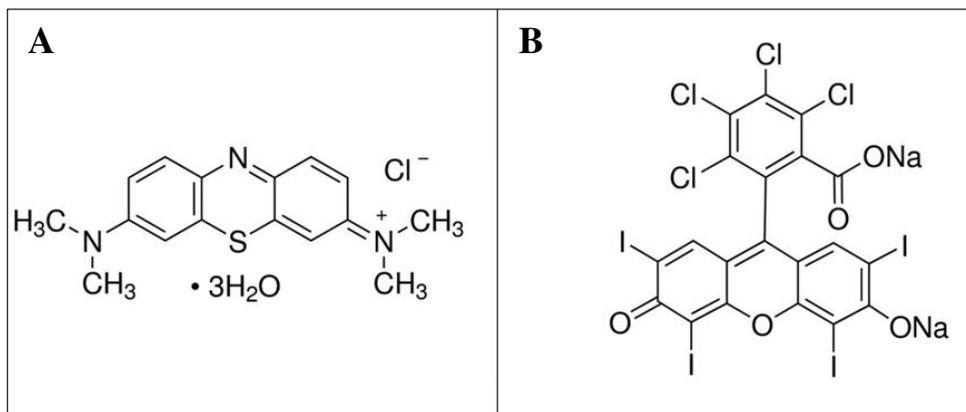
3.4.5. Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A caracterização de amostras de 2 cm x 1 cm por FTIR em modo ATR foi realizada em espectrofotômetro FTIR 4200 da marca Jasco. A varredura de absorção foi realizada de 4000 a 500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras acumuladas, sendo os ensaios realizados em triplicata. Com esta análise teve-se por meta avaliar a presença dos grupos funcionais de cada composto presente nas membranas.

3.4.6. Detecção de grupamentos amina e carboxílico livres

A detecção de grupamentos amina provenientes da quitosana e carboxílico do alginato não ligados entre si foi realizada de forma indireta e com auxílio dos corantes de carga elétrica oposta, azul de metileno (carga positiva) e rosa de bengala (carga negativa), conforme proposto por Hernández-Montelongo *et al.* (2016). As estruturas químicas dos corantes são mostradas na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Estruturas químicas do azul de metileno (A) e rosa de bengala (B).



As amostras (4 cm x 4 cm) foram imersas em soluções aquosas de azul de metileno (0,001 M, pH 7,0) ou de rosa de bengala (0,001 M, pH 5,5) por 15 minutos. Posteriormente, as formulações foram lavadas com água Milli-Q[®] por três vezes consecutivas em tempos de 2, 1 e 1 minuto. Para a etapa de lavagem, o pH da água deionizada foi ajustado para 7,0 e 5,5 para as membranas expostas a azul de metileno e rosa de bengala, respectivamente. As amostras foram secas com N₂ e analisadas em espectrofotômetro UV-Visível (DU640, Beckman) a fim de detectar as absorvâncias relativas ao azul de metileno (620 nm) e rosa de bengala (560 nm).

3.4.7. Capacidade de absorção e estabilidade em soluções aquosas

O grau de intumescimento das membranas secas foi analisado em água, solução aquosa de NaCl (8,298 g/L) e CaCl₂ (0,368 g/L), tampão fosfato salino (PBS) e solução salina (SS). Amostras secas com dimensões iguais a 6 cm x 1 cm com massa inicial conhecida (M_o) foram imersas em 10 mL das referidas soluções por 30 minutos e 24 horas a 37 °C. Após este período as amostras foram novamente pesadas para a determinação das massas finais úmidas (M_u). O grau de intumescimento (S) de cada solução foi calculado através da Equação 1:

$$S = \frac{M_u - M_o}{M_o} \quad (\text{Equação 1})$$

A estabilidade das membranas também foi avaliada por imersão de amostras de mesmas dimensões previamente pesadas (M_o) em 10 mL das referidas soluções por sete dias a 37 °C.

Posteriormente, as amostras foram secas em estufa até atingirem massa constante (M_f). Ao final deste período, a estabilidade das membranas foi avaliada em função de sua perda de massa (L) por meio da Equação 2:

$$L = \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.4.8. Estabilidade em condição de banho simulado de paciente

Como não se localizou na literatura uma norma específica para análise da estabilidade de curativos permanentes para lesões de pele, estabeleceu-se um procedimento para tal, apresentado a seguir.

Para esta análise, considerou-se que uma pessoa com área corporal de 2 m² toma um banho por dia e despense cerca de 10 a 30 min utilizando chuveiro elétrico convencional (Ayres *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2010). O consumo médio de água é de 4 L/min (Martin, 2009) em um banho a uma temperatura de 36 a 39 °C (Rossi *et al.*, 2010), condição esta usada a fim de melhorar a circulação sanguínea na área lesionada. Neste trabalho, foi selecionada a temperatura de 37 °C, supondo-se ainda um gasto de 10 mL de sabonete líquido neutro por banho.

Corpos de prova de dimensões 2 cm x 2 cm foram inicialmente armazenados em dessecador por 24 horas e pesados em balança analítica para a determinação de sua massa inicial (M_o). Em seguida, as amostras foram imersas em 40 mL de uma solução aquosa de sabonete neutro preparada na proporção de 1/2000 (v/v), e deixadas em estufa a 37 °C e 40 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 40 mL de água corrente deionizada e secas a 37°C. Após 7 dias consecutivos de ensaio, com repetição do mesmo procedimento a cada 24 h, as amostras secas foram armazenadas novamente em dessecador por 24 horas e pesadas para determinação da massa final (M_f). A estabilidade das membranas foi determinada também através da Equação 2.

3.4.9. Sorção de vapor d'água

A sorção de vapor d'água foi avaliada gravimetricamente, medindo-se o aumento paulatino de massa de amostras contidas em um ambiente com umidade relativa de 90% a

32°C. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se células de vidro com vedação de borracha que continham solução aquosa saturada de cloreto de potássio ao fundo. Dentro de cada célula foram dispostos frascos de vidro de 10 mL sem tampa que continham no seu interior as amostras de membranas de dimensões 1 cm x 1 cm. A massa de cada frasco foi medida ao longo do tempo até completar 24 horas de ensaio. Previamente aos ensaios, as amostras foram expostas a 37 °C em estufa por 48 horas e armazenadas por 24 horas em sílica gel.

A capacidade de sorção de vapor (VS) foi calculada de acordo com a Equação 3:

$$VS = \frac{M_t - M_o}{M_t} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde M_t é a massa da amostra no tempo t e M_o é a massa inicial da amostra.

3.4.10. Transmissão de vapor d'água

A transmissão de vapor d'água foi analisada com base na norma ASTM E96-90D (2010), avaliando-se a quantidade de água evaporada através da amostra por meio de medidas da perda de massa. Células de permeabilidade foram preenchidas com 2 mL de água deionizada e a amostra foi fixada no topo do frasco com auxílio de tampa rosqueável e *o-ring* de borracha, a qual continha uma abertura circular central de $6,362 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Os frascos foram pesados e colocados em um dessecador de vidro com vedação de borracha que continha ao fundo solução aquosa saturada de cloreto de lítio a 32 °C a fim de se equilibrar a umidade relativa (RH) a cerca de 20%. A massa de cada frasco foi medida ao longo do tempo até completar 24 horas de ensaio. Previamente aos ensaios, as amostras foram expostas a 37 °C em estufa por 48 horas e, posteriormente, as amostras foram armazenadas por 24 horas em sílica gel.

Os valores de transmissão das amostras ao vapor d'água (WVT) foram calculados utilizando-se a Equação 4:

$$WVT = \frac{\Delta m}{A_e} \quad (\text{Equação 4})$$

onde Δm é a diferença entre a massa inicial e final das células e A_e é a área de contato da

membrana com o meio.

3.4.11. Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas imediatamente após a deposição da gota de água sobre a superfície do filme. Esta caracterização foi feita no equipamento OCA20 da marca Dataphysics. Devido à estrutura irregular da superfície das amostras, as mesmas foram fixadas sobre uma fita adesiva a fim de melhor ajustar sua superfície.

3.4.12. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas com base no método ASTM D-882-95a. Utilizando dez replicatas para cada tipo de membrana, amostras de 8 cm x 2,5 cm com espessura conhecida foram fixadas em garras de 5 cm de um texturômetro (modelo TA.XT2, Stable Micro System SMD, Inglaterra), operando com velocidade de afastamento de 1 cm/s. A resistência à tração (TR) e a porcentagem de alongamento (E) na ruptura foram calculadas através das Equações 5 e 6, respectivamente:

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Equação 5})$$

$$E = \frac{d_r - d_i}{d_i} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

onde F_m é a força máxima de ruptura, A_s é a área da seção transversal inicial da amostra, d_i é o afastamento inicial das garras do equipamento (5 cm) e d_r é o afastamento das garras no momento da ruptura.

Para o cálculo de Módulo de Young, foi utilizado o software Origin 6.1[®], fazendo-se o ajuste matemático dos dados da região linear no início da curva de tensão *versus* alongamento, sendo o Módulo de Young o coeficiente linear.

3.4.13. Potencial hemolítico

A avaliação da capacidade hemolítica foi realizada de acordo com a norma ASTM F 756 00 (2000). Segundo a norma, a proporção a ser utilizada é de 3 cm² de

superfície de amostra por mililitro de solução de solução sanguínea comercial (sangue proveniente de coelho diluído em tampão fosfato salino, com concentração de 10 mg/mL de hemoglobina – Probiologica, Empresa de Produtos Biológicos, Lisboa, Portugal). Desta forma, 21 amostras de 1 cm × 1 cm de cada formulação foram imersas em 7 mL de solução sanguínea, em um tubo Falcon de 15 mL, por 3 h a 37 °C. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 2200 rpm por 20 min e 1 mL do sobrenadante foi retirado a fim de quantificar a hemoglobina presente através da medida da densidade ótica (DO) a 540 nm. O controle positivo consistiu em sangue diluído em água e o controle negativo, de sangue diluído em tampão fosfato salino. O índice hemolítico foi determinado através da Equação 7 e os materiais foram classificados de acordo com a Tabela 3.2.

$$\text{Índice hemolítico} = \frac{(DO_{amostra} - DO_{controle negativo})}{(DO_{controle positivo} - DO_{controle negativo})} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Tabela 3.2: Classificação dos materiais conforme o índice hemolítico.

<i>Índice hemolítico (%)</i>	<i>Classificação</i>
0-2	Não hemolítico
2-5	Levemente hemolítico
> 5	Hemolítico

3.4.14. Capacidade trombogênica

A trombogenicidade das membranas foi avaliada segundo o método gravimétrico de formação de trombos (Imai e Nose, 1972). Amostras de 3 cm x 3 cm foram dispostas em placas de *Petri* de vidro e 250 µL sangue de coelho fresco contendo anticoagulante ACD (citrato de ácido dextrose; Probiológica, Portugal) foram adicionados sobre as mesmas. O processo de coagulação foi iniciado pela adição de 25 µL CaCl₂ a 0,10 M sobre as placas, que foram posteriormente incubadas a 37°C por 30 min. Após este período, foi adicionado 1 mL de formaldeído aos coágulos e os mesmos foram secos a 37°C até atingir peso constante. O controle positivo consistiu em sangue com CaCl₂ sobre a placa de *Petri* e o controle negativo, somente de CaCl₂ sobre a placa de *Petri*. A porcentagem da capacidade trombogênica dos materiais foi calculada através da Equação 8.

$$\text{Trombogenicidade (\%)} = \frac{(massa_{amostra} - massa_{controlenegativo})}{(massa_{controlepositivo} - massa_{controlenegativo})} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

3.4.15. Eficiência de incorporação dos agentes bioativos

Para mensurar a eficiência de incorporação (ϵ), foram utilizados métodos baseados em espectrofotometria no UV-VIS.

Para a metodologia de incorporação por adição direta dos agentes bioativos à mistura polimérica, foram analisados os extratos das amostras obtidos durante as etapas de reticulação secundária em solução de CaCl_2 e de lavagens com água, a fim de determinar a massa de fármaco liberado nessas operações ($m_{liberada}$). Para o timol, o betacaroteno e o extrato de *Arrabidaea chica* Verlot a análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (DU640, Beckman) a 274 nm, 450 nm, 470 nm respectivamente.

A eficiência de incorporação (ϵ) foi calculada utilizando-se a Equação 9.

$$\epsilon = \frac{m_{inicial} - m_{liberada}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

As eficiências de incorporação das membranas às quais os compostos bioativos foram adicionados através da imersão em solução e por mediação de CO_2 supercrítico foram estimadas através da comparação entre a relação mássica final e inicial do composto bioativo após 48 h de contato dos filmes incorporados com solução etanólica para a extração do timol e do betacaroteno.

3.4.16. Análise da extração dos agentes bioativos incorporados nas membranas

Os procedimentos de extração diferiram para cada composto bioativo incorporado em função do tamanho das amostras disponíveis, de sua solubilidade e da sensibilidade de detecção por espectrofotometria de absorção de luz (espectrofotômetro UV-Vis, DU640, Beckman).

Para avaliar a extração de timol e betacaroteno das membranas, foram cortados e pesados corpos de prova com dimensões de 1 x 1 cm² para formulações submetidas à incorporação mediada por CO₂ supercrítico, por impregnação em solução e adição direta, respectivamente. As amostras foram imersas em volume de 3 mL de etanol de grau analítico (pureza superior a 99,5%) e mantidas em estufa por até 48 horas a 37 °C e 100 rpm. Periodicamente, 1 mL das soluções em que as amostras estavam imersas foram retiradas e suas absorbâncias foram analisadas a 274 e 450 nm para o timol e o betacaroteno, respectivamente. Em seguida, as frações de líquido coletadas foram retornadas aos frascos contendo as membranas.

Procedimento similar foi realizado para as amostras contendo o extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot, sendo os corpos de prova (de 2 cm x 2 cm) previamente pesados e imersos em uma mistura de 8 mL de PBS com 2 mL de etanol. Periodicamente, 1 mL da solução em que as amostras estavam imersas foi retirado para análise da absorbância a 470 nm e, posteriormente, devolvido ao frasco.

Em todos os casos foram utilizadas curvas analíticas preparadas com os compostos bioativos dissolvidos nas soluções pertinentes (etanol, no caso de timol e betacaroteno e solução de PBS contendo 20% de etanol para o extrato de *A. chica*). Para o caso do extrato de *A. chica*, considerou-se como composto de referência a carajurina, a qual apresenta comprimento de onda de máxima absorção de 470 nm.

3.4.17. Determinação do mecanismo de liberação

Para determinar o mecanismo de liberação da *Arrabidaea chica* Verlot nas membranas de quitosana-alginato, foi utilizado o modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983) ajustado aos dados de cinética de liberação, o qual é representado pela Equação 10, abaixo,

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Equação 10})$$

na qual M_t refere-se à quantidade absoluta de fármaco liberado no tempo t , M_∞ é a quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito, o qual corresponde à quantidade total máxima de fármaco para que se atinja o equilíbrio (platô), e k é a constante cinética, ou seja, é a constante

de difusão que depende do sistema *A. chical*/polímero e do meio. Assim, quando o modelo de Korsmeyer-Peppas é aplicado a filmes finos (Glisoni *et al.*, 2013; Chime *et al.*, 2013; Hernandez-Montelongo *et al.*, 2014), o expoente difusional n é utilizado para interpretar e caracterizar o mecanismo de liberação. Quando n é menor ou igual a 0,5, a liberação é considerada difusão Fickiana, onde a penetração do solvente é o passo limitante da velocidade. Quando n está entre 0,5 e 1,0, a liberação é denominada não Fickiana, uma vez que o transporte do fármaco é controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas, sendo caracterizado por mecanismos de difusão e erosão simultaneamente. Já no caso de n igual a 1, a liberação é considerada de ordem zero e a taxa de liberação é independente do tempo.

Ressalta-se que a Equação 10 é útil para uma análise generalizada dos dados de liberação, assim pode ser utilizada somente para 60% do fármaco liberado na condição de equilíbrio (Lucht e Peppas, 1987), uma vez que, acima disto, há mistura das causas de liberação, o que dificulta a determinação do mecanismos de liberação dominante.

3.4.18. Capacidade antimicrobiana das membranas

A atividade antimicrobiana das membranas consideradas mais promissoras foi avaliada contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) pelo teste de difusão em ágar, conforme método descrito por Pires *et al.* (2008). As linhagens foram adquiridas através da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas, SP.

Após diluições seriadas, a partir da cultura inicial contendo 0,1 mL das suspensões contendo 10^6 UFC/mL, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram inoculados em 50 mL do meio de cultura Müller-Hinton (Difco). Amostras de membranas de 1 cm de diâmetro foram colocadas sobre a superfície de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio inoculado e o material foi incubado a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, foi determinado o halo de inibição através da medida do diâmetro de área mais clara formado ao redor do filme. Toda a análise foi realizada em triplicata.

3.4.19. Citotoxicidade indireta com MTT

A citotoxicidade indireta das membranas consideradas mais promissoras foi realizada utilizando culturas de células da linhagem Vero através do teste de atividade mitocondrial

pelo método de redução do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), o qual é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas. A técnica consiste na quantificação da conversão do MTT, o qual forma um precipitado azul, o *formazan*, detectável espectrofotometricamente a 620 nm. O meio de cultura utilizado é o meio de cultura RPMI-1640 suplementado com L-glutamina (0,3g/L), D-glicose(2,0g/L), NaHCO₃ (2,0g/L), penicilina (10.000 UI/L), estreptomicina (0,05g/L), Hepes (5,958g/L) e soro fetal bovino (SFB) 10%).

Inicialmente, extratos das membranas foram obtidos após a manutenção das mesmas em meio de cultura RPMI suplementado durante 48 horas em estufa a 37° C a 5% de CO₂. A concentração recomendada pela ISO 10993-5E (1992) é de 0,2 g de material seco por mililitro de meio de cultivo, no entanto, como as membranas produzidas apresentam moderada absorção de meio, foi utilizada uma concentração quatro vezes menor do que a recomendada, ou seja, 0,05g de material seco por mililitro de meio. Foram utilizados como controles positivo e negativo extratos de fragmentos de látex de luvas cirúrgicas e o meio de cultura RPMI suplementado, respectivamente.

Aliquotas de 100 µL de uma suspensão contendo 1×10^5 células/mL de meio RPMI-1640 suplementado foram transferidas para cada poço de uma placa de fundo chato de 96 poços e mantidas por 24 horas em estufa a 37° C a 5% de CO₂. Após este período, e observada a formação de uma monocamada celular, os sobrenadantes foram retirados e substituídos por 100 µL dos extratos das membranas, e a placa foi conservada novamente em estufa a 37° C a 5% de CO₂ por 24 horas. Os extratos foram então removidos e cada poço foi lavado duas vezes com 100 µL de tampão PBS/EDTA. Após estas lavagens, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de RPMI suplementado, etapa esta seguida da adição de 10 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL de tampão PBS/EDTA. Após quatro horas de incubação em estufa a 37°C, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 100g/L dissolvido em uma solução de dimetil sulfóxido (DMSO) contendo 0,6% de ácido acético. As amostras foram então homogeneizadas e as culturas retornaram para incubação a 37 °C por uma hora. Decorrido este período, as amostras foram levadas para determinação de sua absorbância a 550 nm em espectrofotômetro ELISA (Thermo Scientific, MultisKan FC, Finlândia).

3.4.20. Análise estatística

O software *Statistica 7*[®] foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas significativas dos resultados numéricos referentes às propriedades das membranas, empregando-se o teste de comparação de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em termos de média dos dados a partir de, pelo menos, três análises independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos, em sequência, os resultados referentes à produção de membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade e com incorporação de diferentes concentrações do agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B. Em seguida são mostrados os resultados da incorporação de timol e betacaroteno por adição direta à mistura polimérica, por impregnação em solução e mediada por CO₂ supercrítico na formulação que atingiu o melhor desempenho global nas caracterizações. A seguir são apresentados os resultados das análises obtidas com membranas produzidas com alginato de média viscosidade contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e o agente porogênico Kolliphor[®] P188. Por fim, são apresentados os resultados dos ensaios com incorporação do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot e de testes biológicos realizados em caráter preliminar.

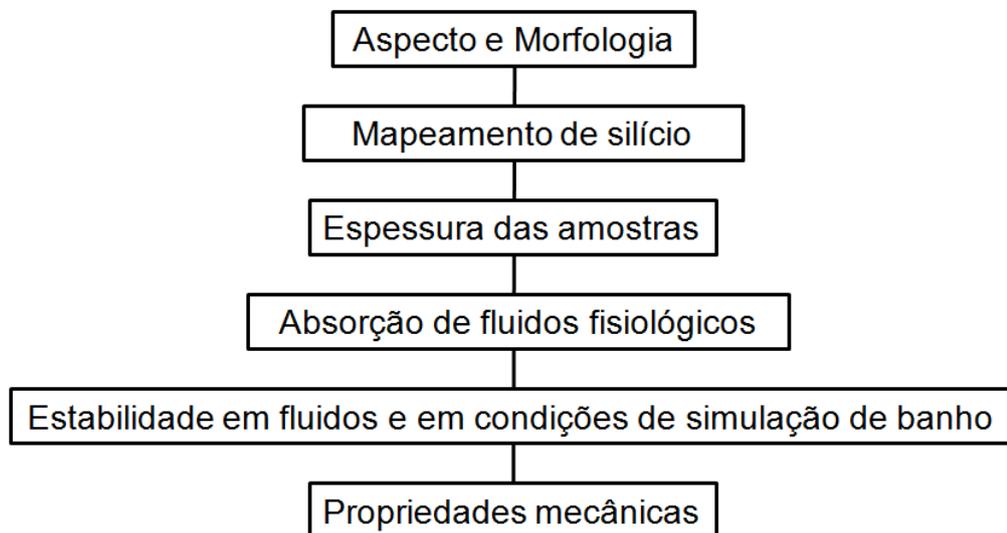
4.1. Membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade preparadas com diferentes concentrações de Silpuran[®] 2130 A/B

No trabalho anterior de Pires (2013), foram produzidas membranas de quitosana-alginato contendo 0,1 g do polidimetilsiloxano (PDMS) biocompatível Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo. O desenvolvimento deste compósito resultou em membranas flexíveis, com adequada resistência à tensão na ruptura, alta estabilidade na presença de fluidos fisiológicos e moderada absorção dos mesmos. No entanto, devido à viscosidade relativamente elevada do alginato, foi notada baixa dispersão do polímero sintético no PEC de polissacarídeos.

Desta forma, nesta etapa do presente trabalho, levantou-se a hipótese de que a utilização de alginato com viscosidade reduzida poderia contribuir para a melhoria da dispersão do polidimetilsiloxano (PDMS) no PEC. Além do mais, foi também investigada a influência de diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B (S) nas características das membranas de quitosana-alginato (QA) e a formulação que apresentou o melhor desempenho quanto às caracterizações efetuadas foi selecionada para a incorporação dos compostos naturais timol (T) e betacaroteno (B). Não há relatos sobre o estudo do efeito de diferentes concentrações de um composto siliconado em membranas de quitosana-alginato.

As formulações contendo as seis diferentes proporções de S são descritas como QA (para amostras livres de S), QAS1 (para formulações preparadas na razão de 0,01 g de S por grama de polissacarídeos) e assim por diante para o restante das proporções (QAS5, QAS10, QAS15 e QAS20). Na Figura 4.1 são apresentadas as caracterizações realizadas desses materiais na forma de diagrama.

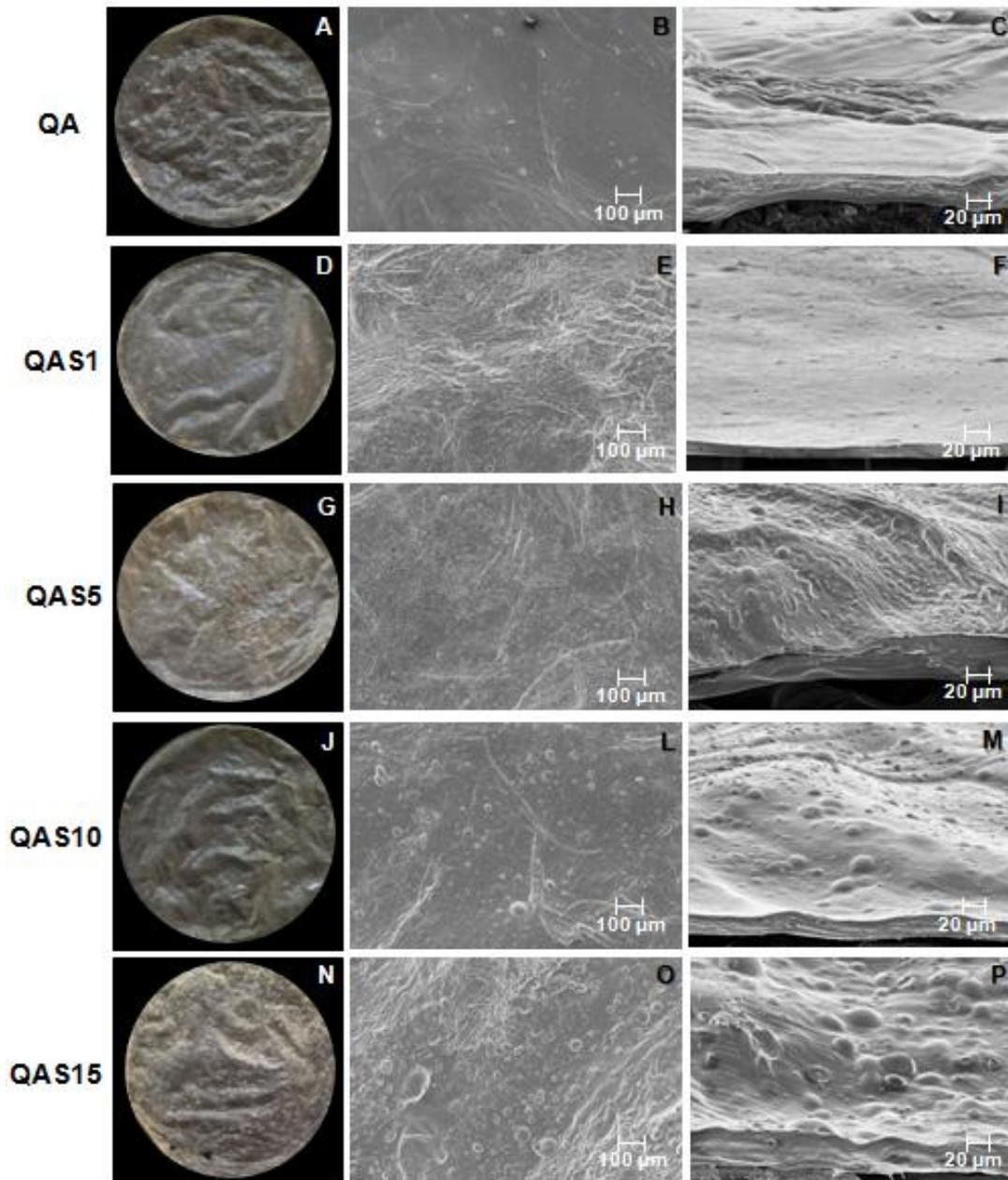
Figura 4.1 – Diagrama referente às caracterizações das membranas quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade preparadas com diferentes concentrações de Silpuran® 2130 A/B.



4.1.1. *Aspecto e morfologia das membranas*

Na Figura 4.2 são mostrados os aspectos típicos das membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade preparadas na ausência ou presença de 0,01 a 0,15 g do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B por grama de polissacarídeo (QAS1 a QAS15). As amostras caracterizaram-se por superfície homogênea, com exceção da formulação QAS20 que se mostrou inapropriada quanto à coesão estrutural da matriz polimérica após a etapa de secagem (Figura 4.3). Devido à baixa miscibilidade do agente siliconado frente ao PEC de polissacarídeos, pode-se supor que ocorreu significativa separação de fases, dificultando a formação de uma estrutura contínua na membrana. Desta forma, as membranas contendo 0,20 g/g de PDMS não mais foram averiguadas no decorrer deste trabalho.

Figura 4.2 – Característica visual (mostrada na primeira coluna à esquerda) e da morfologia da superfície (coluna do meio) e da secção transversal (coluna à direita) das membranas de quitosana-alginato preparadas na ausência ou presença de diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B.



A fim de avaliar morfologicamente as membranas produzidas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, tanto da superfície quanto da secção transversal dos dispositivos. Os resultados obtidos também são mostrados na Figura 4.2. Nota-se que a formulação livre do agente siliconado (QA, Figuras 4.2A e 4.2B) apresentou aspecto liso,

homogêneo e com estrutura lamelar característica de membranas polissacarídicas (Bueno e Moraes, 2011, Bellini *et al.*, 2012; Veiga e Moraes, 2012; Pires e Moraes, 2015). Para as amostras contendo Silpuran[®] 2130 A/B, observa-se a presença gotículas dispersas na superfície das formulações e um aumento de sua quantidade em maiores concentrações do PDMS. Segundo Estarlich *et al.* (2011) e Pires e Moraes (2015) a presença de gotículas pode ser resultado tanto da maior viscosidade do agente siliconado quanto da presença de grupos hidrofóbicos em sua estrutura, o que dificulta sua dispersão na suspensão do complexo de polieletrólitos.

Figura 4.3 – Aspecto visual da membrana de quitosana-alginato contendo 0,20 g/g de PDMS.



A utilização de alginato de baixa viscosidade melhorou, moderadamente, a dispersão do PDMS nos filmes quando comparados aos flexíveis preparados por Pires e Moraes (2015), os quais foram produzidos com alginato de maior massa molar (4×10^4 g/mol). Pela Figura 4.2 é possível observar que as gotículas obtidas para os dispositivos produzidos com alginato de baixa viscosidade apresentaram diâmetro em torno de, aproximadamente, 10 e 60 μm . Em contraste, as formulações obtidas por Pires e Moraes (2015) exibiram diâmetro das gotículas entre 30 e 120 μm .

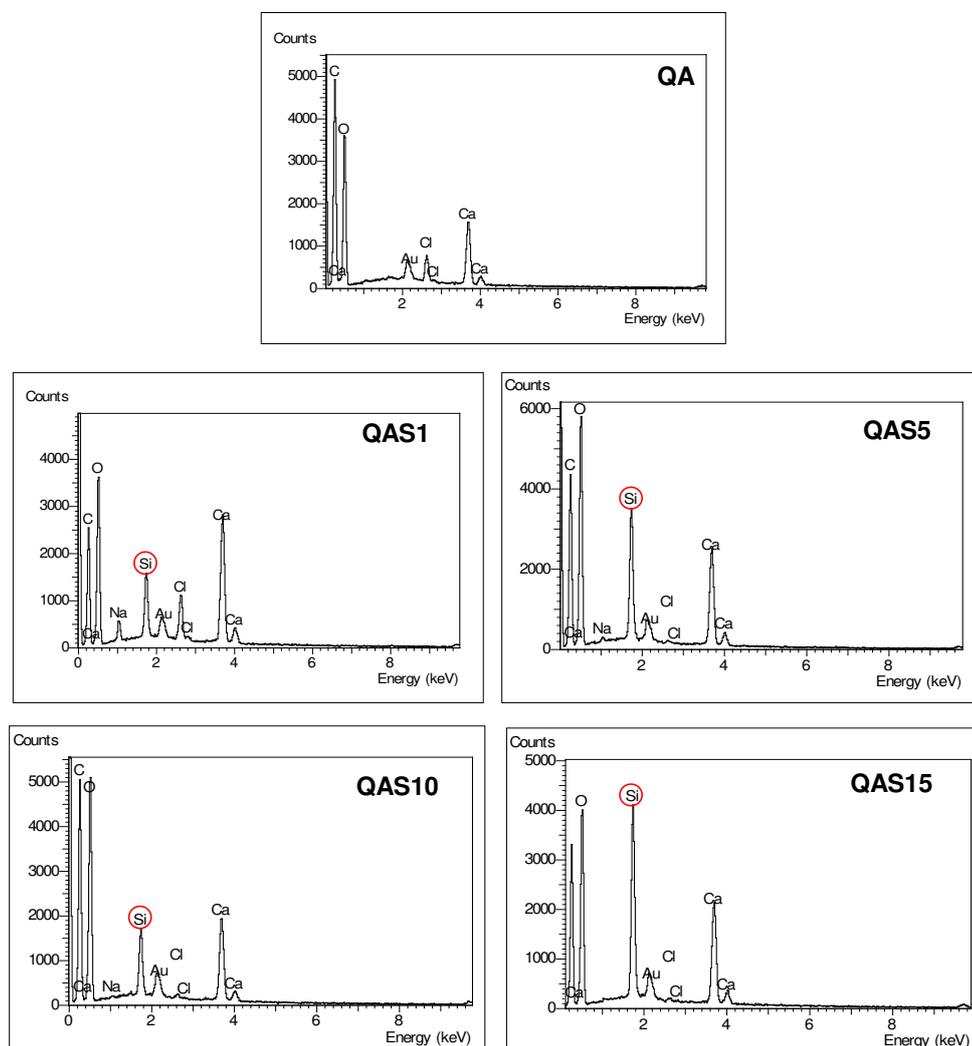
A melhoria de dispersão do PDMS na matriz de quitosana-alginato foi também investigada por meio de mapeamento de silício nos dispositivos, conforme descrito a seguir.

4.1.2. Mapeamento de silício nas membranas

O mapeamento do silício proveniente do agente siliconado foi analisado através de

espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) a fim de avaliar a presença e distribuição, de forma indireta, deste polímero na estrutura das membranas. Nas Figuras 4.4 e 4.5 são mostrados os espectros típicos obtidos e a distribuição de silício nas membranas, respectivamente.

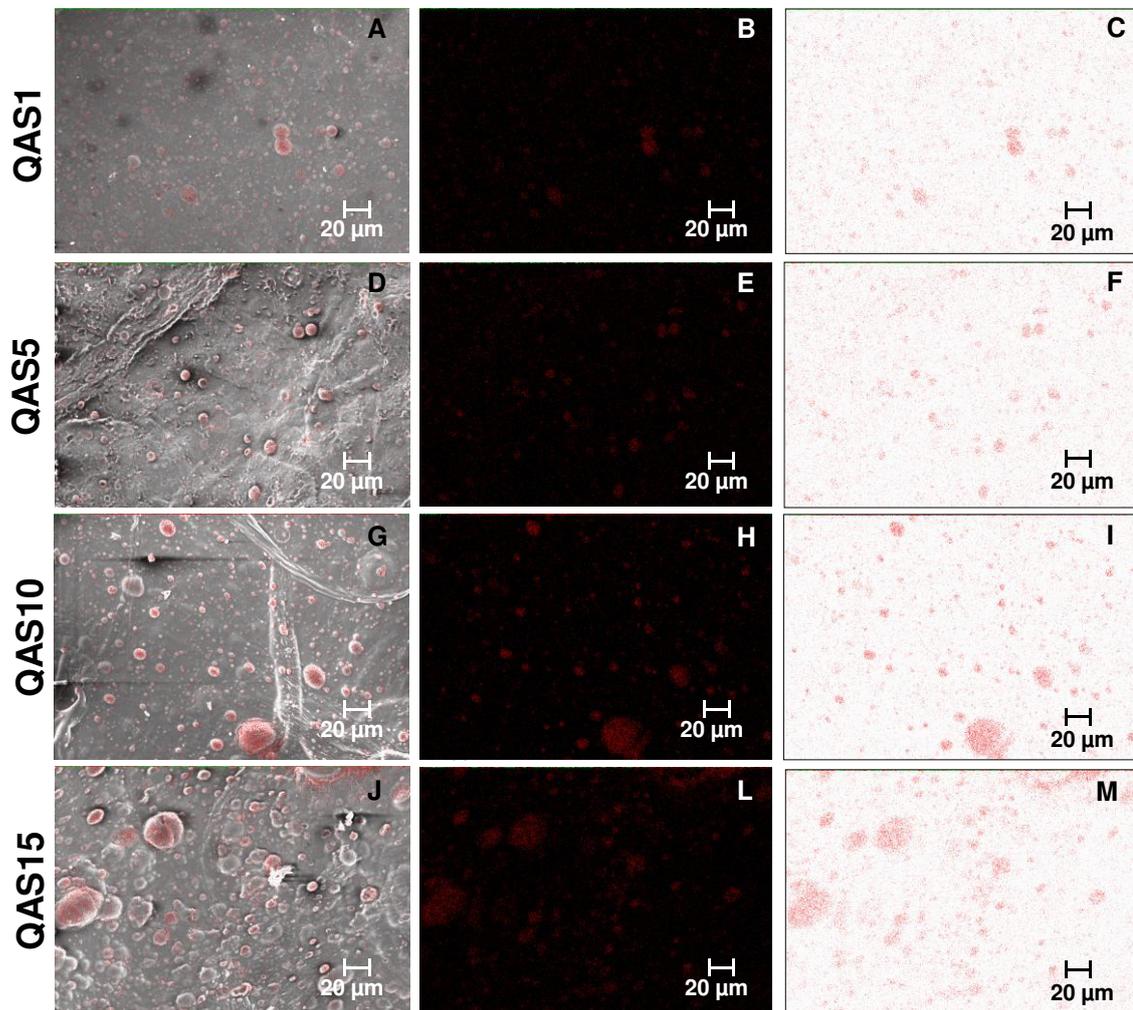
Figura 4.4 – Espectros do mapeamento de silício de membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade preparadas na ausência ou presença de diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B.



O silício foi detectado em todas as amostras contendo o PDMS, como esperado. A utilização de alginato com viscosidade reduzida contribuiu parcialmente, de fato, na dispersão do agente siliconado no PEC. Como mencionado anteriormente, houve diminuição do diâmetro das gotículas com aglomeração de silício quando comparado aos dados relatados por

Pires e Moraes (2015). Nota-se, ainda, o espalhamento regular deste elemento em toda a superfície do material, sugerindo que, apesar da separação de fases advinda da hidrofobicidade do gel de silicone, o mesmo encontra-se disperso por toda a matriz polimérica de forma bem distribuída, podendo exercer alterações significativas nas propriedades das membranas de quitosana-alginato. Adicionalmente, observa-se que dentro das gotículas há aglomerados de silício.

Figura 4.5 – Mapeamento de silício (pontos vermelhos) de membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade preparadas na presença de diferentes proporções de Silpuran® 2130 A/B.



4.1.3. Espessura das amostras secas e hidratadas

A análise dos resultados obtidos da espessura das membranas com diferentes formulações no seu estado seco e hidratado (Tabela 4.1) mostra aumento significativo nesta propriedade

para as amostras contendo 0,05 g/g ou mais de Silpuran[®] 2130 A/B. Isto pode ser relacionado à maior proporção das gotículas do gel de silicone na estrutura do material, alcançando maiores valores para a formulação QAS15 (0,22 e 0,27 mm no estado seco e úmido, respectivamente). As espessuras das amostras hidratadas por 24 horas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas frente às formulações no estado seco.

Tabela 4.1 – Espessura das membranas de quitosana e alginato, contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B, quando secas ou úmidas.

Formulação	Espessura (mm)	
	Amostras secas	Amostras úmidas
QA	0,11 ± 0,08 ^{aA}	0,13 ± 0,02 ^{aA}
QAS1	0,10 ± 0,01 ^{aA}	0,11 ± 0,04 ^{bA}
QAS5	0,16 ± 0,01 ^{bA}	0,18 ± 0,07 ^{cA}
QAS10	0,16 ± 0,01 ^{bA}	0,18 ± 0,05 ^{cA}
QAS15	0,22 ± 0,01 ^{cA}	0,27 ± 0,01 ^{dA}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

A técnica de produção de membranas de quitosana complexada com alginato foi proposta inicialmente por Yan *et al.* (2000), que alcançaram valores de espessura de 0,05 mm. Wang *et al.* (2001) adaptaram a metodologia de produção e encontraram valores por volta de 0,03 mm. Ambos os grupos de pesquisa mencionados utilizaram uma proporção mássica de quitosana e alginato de 1:1, partindo de 25 mL de soluções de quitosana e alginato a 0,25% (m/v) e transferiram o complexo polimérico para uma placa de Petri com diâmetro interno de 8,5 cm para secagem. Assim, nestes casos, a relação de massa de polissacarídeos por área da superfície do molde é de 2,20 mg/cm². Já Rodrigues *et al.* (2008), estudando o escalonamento da produção destes dispositivos, utilizaram também uma proporção mássica de 1:1 dos polissacarídeos, mas produzindo biomateriais com 5,10 mg de polissacarídeos por centímetro quadrado de membrana. Naturalmente, valores de espessura mais elevados foram alcançados neste caso, entre 0,07 e 0,08 mm.

A metodologia de produção das membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B foi estabelecida por Pires e Moraes (2015) que adicionaram 0,1 g do PDMS por grama de polissacarídeos. Neste trabalho, as autoras também utilizaram a proporção mássica de

quitosana e alginato de 1:1, mas partindo de soluções de quitosana (90 mL) a 1% (m/v) e alginato (180 mL) a 0,5 % (m/v), utilizando como base para secagem uma placa de *Petri* de 15 cm de diâmetro interno. Desta forma, a relação entre a massa de polissacarídeos e a área do molde era, como a de Rodrigues *et al.* (2008), 5,10 mg/cm². As autoras notaram mudanças significativas nas propriedades dos materiais quando na presença do agente siliconado, observando uma diminuição de 78% na espessura, a qual alcançou 0,01 mm, enquanto que a formulação preparada na ausência do agente siliconado apresentou uma espessura em torno de 0,06 mm.

Nota-se que os valores encontrados no presente trabalho, o qual se baseou na metodologia descrita por Pires e Moraes (2015), são superiores aos relatados na literatura (alcançando espessura das amostras secas em torno de 0,1 e 0,2 mm). De acordo com Luo e Wang (2014), as propriedades dos dispositivos podem sofrer alterações significativas em decorrência de mudanças tanto na forma de processamento quanto nas propriedades das matérias-primas. Os maiores valores encontrados podem ser devidos à utilização do alginato de viscosidade reduzida.

Uma das principais propriedades do alginato é sua capacidade de formar solução viscosa em água, mesmo em baixas concentrações (Masuelli e Illanes, 2014). No entanto, esta propriedade depende de sua massa molar. O alginato utilizado apresenta viscosidade inferior (com massa molar de $2,49 \times 10^4$ g/mol) aos comumente utilizados, os quais apresentam massa molar entre $3,2 \times 10^4$ e $4,0 \times 10^5$ g/mol (Lee and Money, 2012). Segundo a literatura, quanto mais próxima a massa molar da quitosana estiver da do alginato, mais cristalino e compacto é o PEC formado, o que auxilia também na melhora da homogeneidade do mesmo (Yan *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2004; Honary *et al.*, 2009). A quitosana utilizada apresenta massa molar de $1,26 \times 10^6$ g/mol, o que excede em, aproximadamente, 50,6 vezes a massa molar do alginato. Isto, possivelmente, pode ter influenciado no empacotamento entre as lamelas com conseqüente aumento na espessura dos dispositivos. Apesar deste aumento, os valores obtidos são menores que a espessura da pele, que pode variar entre 0,5 e 2 mm (Ma *et al.*, 2001), o que auxilia no maior conforto do paciente.

4.1.4. Capacidade de absorção de fluidos fisiológicos pelas membranas

Avaliar o intumescimento dos curativos é importante a fim de direcioná-los a uma

aplicação específica. Por exemplo, materiais que absorvem grande quantidade de fluidos são considerados apropriados para serem utilizados em feridas altamente exsudativas. Nesta perspectiva, no presente trabalho analisou-se a influência de diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B na capacidade de absorção de água, PBS e solução contendo simultaneamente NaCl e CaCl₂, a qual é comumente empregada para análise de capacidade de absorção de fluidos por curativos industrializados (Girata, 2011). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Intumescimento das membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade contendo ou não diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B.

Formulação	Absorção após 30 minutos (g/g)			Absorção após 24 horas (g/g)	
	S _{Água}	S _{PBS}	S _{NaCl+CaCl₂}	S _{Água}	S _{NaCl+CaCl₂}
QA	0,96 ± 0,06 ^{aA}	3,11 ± 0,07 ^{aB}	3,28 ± 0,02 ^{aB}	1,77 ± 0,30 ^{aC}	3,69 ± 0,32 ^{aB}
QAS1	1,00 ± 0,08 ^{aA}	2,94 ± 0,32 ^{aB}	2,51 ± 0,19 ^{aB}	1,72 ± 0,06 ^{aC}	3,28 ± 0,21 ^{aB}
QAS5	1,00 ± 0,04 ^{aA}	3,11 ± 0,11 ^{aB}	3,37 ± 0,52 ^{aB}	1,47 ± 0,07 ^{a,bC}	4,08 ± 0,24 ^{aB}
QAS10	1,08 ± 0,07 ^{aA}	2,83 ± 0,36 ^{aB}	2,84 ± 0,08 ^{aB}	1,39 ± 0,01 ^{bC}	3,17 ± 0,05 ^{aB}
QAS15	1,04 ± 0,14 ^{aA}	3,33 ± 0,05 ^{aB}	3,12 ± 0,09 ^{aB}	1,37 ± 0,05 ^{cC}	3,15 ± 0,32 ^{aB}

Mesma letra minúscula em uma mesma coluna e mesma letra maiúscula em uma mesma linha indicam que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Nota-se que, de maneira geral, não houve diferenças significativas para a capacidade de absorção entre as amostras no período de 30 minutos. O curto prazo de exposição das formulações aos fluidos não foi suficiente para possibilitar a absorção de grandes quantidades de soluções. No entanto, observa-se maior absorção de PBS e de solução de NaCl e CaCl₂ do que de água, alcançando-se absorção média de 3 gramas de solução por grama de membrana. De acordo com Pires (2013), em meios com pH próximo à neutralidade, como PBS (pH 7,3) e solução de NaCl e CaCl₂ (pH 6,7), as ligações iônicas entre a quitosana e o alginato são desfavorecidas em consequência da desprotonação dos grupamentos amina da quitosana, o que influencia no empacotamento entre as lamelas, deixando-as mais espaçadas e auxiliando na maior absorção de fluidos.

Na análise de capacidade de absorção após 24 horas de exposição em fluidos, nota-se que houve maior absorção em água quando comparada às formulações expostas às soluções

salinas de PBS e solução de NaCl e CaCl₂ após 30 min. Contudo, não houve diferenças significativas para as soluções salinas e, como observado anteriormente, estas soluções foram as melhores absorvidas. Observa-se que quanto maior a proporção de PDMS, menor o intumescimento dos filmes em água. Pires e Moraes (2015) avaliaram a absorção de água e de solução salina (0,9% NaCl) nas formulações contendo 0,1 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo e observaram uma redução média de 35% no intumescimento na presença de ambos os fluidos em comparação às amostras livres do agente siliconado. Segundo Brook (2006), os elastômeros de silicone alteram as propriedades físicas de polímeros e, devido ao seu caráter hidrofóbico, reduzem consideravelmente a absorção de soluções aquosas. Adicionalmente, como visto anteriormente, o Silpuran[®] 2130 A/B influencia na maior compactação entre as lamelas o que, conseqüentemente, diminui o acesso para a entrada de fluidos.

A presença de diferentes proporções de PDMS nas membranas de quitosana-alginato também não influenciou substancialmente a capacidade de absorção dos filmes em solução de NaCl e CaCl₂, os quais apresentaram uma média de cerca de 3,5 g/g. Ainda, quando expostas a PBS por 24 horas, as formulações não se mostraram estáveis. Este mesmo comportamento foi observado por Bierhalz e Moraes (2016), que produziram membranas de quitosana-alginato utilizando diferentes razões dos polissacarídeos e diferentes viscosidades de alginato. As autoras observaram que a desestruturação das membranas frente à exposição ao PBS ocorreu quando em maiores proporções de quitosana (3:1), tanto para formulações produzidas com alginato de baixa quanto de média viscosidade. Tal comportamento pode ser decorrente do efeito quelante dos íons fosfato sobre o cálcio. Além do mais, em condições de pH próximas da neutralidade, como a do PBS, a afinidade do fosfato pelo cálcio é maior que a do alginato (Shi *et al.*, 2006). Desta forma, há uma desestabilização das ligações Ca-alginato e, conseqüentemente, ruptura da matriz polimérica.

Geralmente, membranas baseadas em complexos de quitosana-alginato apresentam moderada absorção de fluidos, as quais são direcionadas para o uso em feridas com liberação branda de exsudatos. No entanto, os dados obtidos são menores do que os relatados na literatura, como por exemplo, Bueno *et al.* (2014) que encontraram valores em torno de 23 e 18 g/g quando em contato com água e PBS, respectivamente, e Rodrigues *et al.* (2008) que descreveram valores entre 11 e 19 g/g para exposição das membranas em água. Já Pires e Moraes (2015) observaram absorção em solução salina em torno de 12 e 8 g/g para as formulações preparadas na ausência e presença do agente siliconado, respectivamente.

Bierhalz e Moraes (2016) também utilizaram alginato de baixa viscosidade para a produção de membranas de quitosana-alginato e alcançaram valores de absorção de água entre 3 e 6 g/g, sendo estes valores também inferiores aos de demais trabalhos consultados na literatura. Ao comparar os dados obtidos no presente trabalho com os de Bierhalz e Moraes (2016), nota-se que as membranas produzidas na ausência de PDMS apresentaram menor absorção de água, em torno de 2 g/g, após 24 horas de exposição. Apesar das condições operacionais serem similares, concentrações das soluções como de NaOH para neutralização e de CaCl₂ para reticulação primária foram distintas, o que pode ter levado à diferença nestes valores.

Assim, em geral, os menores valores encontrados podem ser atribuídos ao tipo de alginato utilizado (baixa viscosidade). De acordo com Bertran e Bondmeir (2012), polímeros com longas cadeias apresentam maior viscosidade, melhor integridade da matriz polimérica e, conseqüentemente, maiores sítios para se ligarem a maiores quantidades de fluidos, aumentando a capacidade de absorção dos mesmos. Desta forma, a absorção de fluidos é dependente da massa molar do polímero e de suas concentrações, logo, quanto menor a massa molar do polímero, menor será sua capacidade em absorver soluções. Uma estratégia para aumentar a capacidade de absorção de soluções fisiológicas é o aumento da porosidade da matriz, o que será discutido mais adiante, no Item 4.1.8.

4.1.5. Perda de massa das membranas quando expostas a fluidos fisiológicos

A fim de avaliar a estabilidade das membranas produzidas em soluções fisiológicas, mediu-se a perda de massa após 7 dias de exposição em água e solução de NaCl e CaCl₂. Os resultados são mostrados na Tabela 4.3.

A maior estabilidade das membranas foi encontrada quando as mesmas foram expostas a água, variando entre 1 e 7% de perda de massa. Membranas de quitosana-alginato apresentam, geralmente, perda de massa em água em torno de 9 e 21% após 7 dias de exposição (Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015). No entanto, os valores encontrados no presente trabalho corroboram-se com os obtidos por Bierhalz e Moraes (2016) para membranas produzidas com alginato de baixa viscosidade, tendo-se em vista que as autoras alcançaram absorção de água entre 4 e 6 g/g. Segundo Bueno (2010), quanto maior a capacidade de absorver um determinado fluido, maior será o afastamento entre as lamelas, o que diminui as interações entre as cadeias poliméricas, progressivamente solubilizando o PEC e aumentando a perda de massa. Tendo-se em vista que a água foi o

fluido menos absorvido pelos filmes, sua estabilidade frente a esta solução foi, consequentemente, maior.

Tabela 4.3 – Perda de massa das membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade contendo ou não diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B.

Formulação	Perda de massa (%)	
	$L_{Água}$	$L_{NaCl+CaCl_2}$
QA	5,82 ± 0,76 ^a	10,89 ± 1,53 ^a
QAS1	6,65 ± 0,98 ^a	9,80 ± 1,08 ^a
QAS5	3,68 ± 0,52 ^b	10,37 ± 3,83 ^a
QAS10	1,08 ± 0,83 ^c	9,83 ± 3,02 ^a
QAS15	2,12 ± 0,12 ^{b,c}	12,56 ± 1,73 ^a

Mesma letra em uma mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Nota-se ainda que, há tendência de redução da perda de massa com o aumento da proporção de Silpuran[®] 2130 A/B. Maior estabilidade devido à incorporação de PDMS na proporção mássica de 1:10 nas membranas de quitosana-alginato foi também observada por Pires e Moraes (2015) que justificaram tal comportamento pelo caráter hidrofóbico do polímero sintético, visto que atingiu-se apenas 2% de perda de massa quando em contato com água.

Os filmes expostos à solução de NaCl e CaCl₂ apresentaram maior perda de massa. Tal comportamento corrobora com os dados de absorção, tendo-se em vista que esta solução foi a que proporcionou maior intumescimento nas matrizes. Assim como com os dados de intumescimento, não houve diferenças significativas para as amostras contendo o agente siliconado. Bierhalz e Moraes (2016), também notaram maior intumescimento e perda de massa das membranas de quitosana-alginato quando expostas às soluções salinas, tais como o meio de cultivo α -MEM e o PBS. De acordo com Mallepalli *et al.* (2013), o comportamento de um polímero aniônico, como é o caso do alginato, em soluções salinas pode ser atribuído ao aumento do número de íons na solução, com consequente aumento das interações polímero-água, o que leva a um aumento da capacidade de absorção e, consequentemente, à perda de massa devido à desestruturação das interações eletrostáticas do PEC e dos íons cálcio com o alginato.

A análise da perda de massa em PBS foi também realizada, porém, as membranas não se mantiveram estáveis após os 7 dias de ensaio, fato este já discutido anteriormente.

4.1.6. Estabilidade das membranas em condições de simulação de banho de paciente

A fim de avaliar como os curativos desenvolvidos se comportam frente aos banhos dos pacientes, no presente trabalho desenvolveu-se um ensaio de estabilidade simulando banhos diários com água corrente e sabonete neutro por um período de 7 dias. Na Tabela 4.4 são apresentados os resultados obtidos em condições simuladas de banho em pacientes com estimativas de duração de 10 e 30 minutos.

Tabela 4.4 – Perda de massa de membranas de quitosana de alginato contendo diferentes concentrações de Silpuran[®] 2130 A/B em condições simuladas de banho de paciente de 10 e 30 minutos de duração por sete dias consecutivos.

Formulação	Perda de massa (%)	
	L_{10min}	L_{30min}
QA	13,03 ± 3,75 ^a	12,60 ± 3,68 ^a
QAS1	14,94 ± 3,84 ^a	13,29 ± 1,11 ^a
QAS5	7,02 ± 0,032 ^a	9,78 ± 2,77 ^a
QAS10	12,73 ± 2,28 ^a	13,17 ± 2,66 ^a
QAS15	10,77 ± 1,70 ^a	12,94 ± 3,41 ^a

Mesma letra em uma mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Para os dois casos de tempos estimados, 10 e 30 minutos, após 7 dias, as amostras apresentaram perda de massa acumulada de 7 a 15%, o que demonstra ótima estabilidade dos curativos frente a sabonete neutro e água corrente. Desta forma, os pacientes podem manter uma rotina normal de um banho por dia sem a necessidade de remover e trocar de curativo devido à sua degradação prematura.

A frequência da troca do curativo deve ser avaliada para cada tipo de ferida. A avaliação por sete dias foi realizada a fim de observar a estabilidade do material nesse período. Apesar de se verificar perda mássica máxima de 15%, a estrutura do dispositivo manteve-se íntegra.

4.1.7. Propriedades mecânicas

Os resultados para tensão na ruptura, alongamento na ruptura e comportamento elástico (módulo de Young) obtidos para as amostras em equilíbrio com a umidade do ambiente são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resistência mecânica das membranas de quitosana-alginato, contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B.

<i>Formulação</i>	<i>Tensão na ruptura (MPa)</i>	<i>Alongamento na ruptura (%)</i>	<i>Módulo de Young (MPa)</i>
QA	3,41 ± 0,73 ^a	5,94 ± 1,00 ^a	2,43 ± 0,74 ^a
QAS1	4,59 ± 0,49 ^{a,b}	3,61 ± 0,89 ^b	2,74 ± 0,20 ^a
QAS5	4,64 ± 0,90 ^b	3,71 ± 0,34 ^{a,b}	1,96 ± 0,29 ^a
QAS10	12,13 ± 0,82 ^c	4,73 ± 0,85 ^{a,b}	1,81 ± 0,78 ^{a,b}
QAS15	1,67 ± 0,48 ^d	4,65 ± 0,91 ^{a,b}	0,51 ± 0,13 ^b

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Observa-se que todas as formulações apresentaram baixos valores de tensão na ruptura (cerca de 2 a 12 MPa). A tensão de ruptura requerida para um curativo depende da região da pele que irá ser tratada. Uma vez que os dados são substancialmente baixos, os biomateriais desenvolvidos devem ser utilizados em superfícies da pele com tensão na ruptura compatível com a do tecido normal, que pode variar entre 5 e 30 MPa (Evans *et al.*, 2013). A formulação que alcançou o melhor resultado foi a contendo 0,10 g de PDMS por grama de polissacarídeo (QAS10), que apresentou aumento significativo na tensão de ruptura quando comparada às outras. Nota-se, no entanto, redução quando na presença de 0,15 g/g de Silpuran[®] 2130 A/B. Possivelmente, este comportamento pode ser atribuído ao caráter altamente anisotrópico desta formulação, tendo-se em vista que há predominância de gotículas dispersas com aglomerados de PDMS na matriz. Assim, a separação de fases possivelmente contribuiu para a maior fragilidade do dispositivo. Adicionalmente, devido a interação moderada na interface entre o PEC de quitosana-alginato e as gotículas do agente siliconado pode ter dificultado a eficiência na transferência do estresse externo aplicado à estrutura do compósito como um todo.

De acordo com a literatura, membranas de quitosana-alginato apresentam resistência à

tensão na ruptura por volta de 6 a 31 MPa (Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015). Pires e Moraes produziram membranas também contendo 0,10 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo e alcançaram 63 MPa e 5% de resistência à tração e alongamento na ruptura, respectivamente. Nota-se, portanto, que os valores de tensão na ruptura encontrados no presente trabalho são inferiores aos relatados na literatura, tanto na presença quanto na ausência do PDMS. Tendo-se em vista que a tensão na ruptura é inversamente proporcional à espessura do material, os altos valores de espessura encontrados (Tabela 4.1) podem ter influenciado os baixos valores de resistência à tração. Como já discutido anteriormente, isto se deve ao alginato de viscosidade reduzida que, devido às cadeias de menores diâmetros e possível comprometimento na interação entre os grupamentos dos polissacarídeos, influenciou fortemente a resistência à tração dos dispositivos.

Já os dados obtidos para alongamento na ruptura (4 a 6 %) não diferiram dos valores encontrados na literatura (Yan *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2008, Pires e Moraes, 2015). Assim, a inclusão de Silpuran[®] 2130 A/B não influenciou nesta propriedade, resultado também observado por Pires e Moraes (2015).

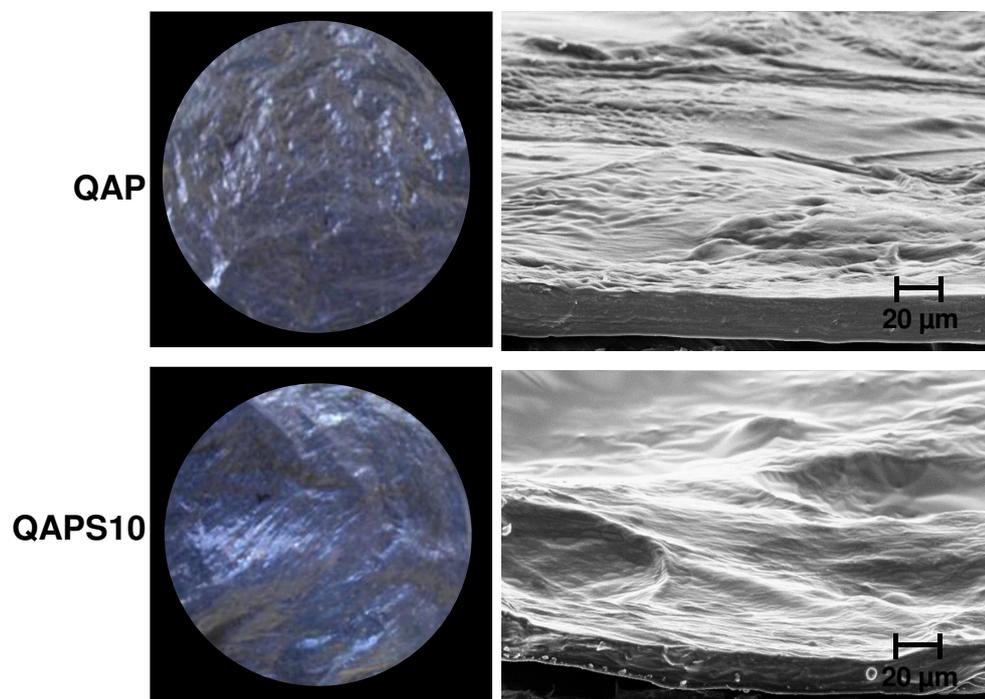
Tendo-se em vista que quanto mais elástico o material menor será o módulo de Young, a avaliação desta propriedade é significativamente importante a fim de auxiliar no armazenamento, manuseio e aplicação do dispositivo. O módulo elástico da pele varia de 0,02 a 57 MPa (Evans *et al.*, 2013) e esta grande variação é devida às múltiplas camadas deste órgão. Além do mais, o valor do módulo de Young depende da umidade relativa (nível de hidratação) do material e também da técnica utilizada para quantificar tal propriedade (Evans *et al.*, 2013; Álvarez-Asencio *et al.*, 2016). As formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram valores entre 0,5 e 3 MPa, com melhora significativa para as membranas contendo 0,10 e 0,15 g/g (QAS10 e QAS15, respectivamente) do agente siliconado. Estes dados corroboram com o trabalho de Wang *et al.*, (2001), que encontraram valores na faixa de 1 a 2 MPa.

Levando-se em conta os dados obtidos, a formulação que se mostrou mais promissora para uso como curativos de lesões de pele, considerando sua aplicabilidade quanto às propriedades mecânicas, foi a contendo 0,10 g/g de PDMS (QAS10). Entretanto, tais membranas poderiam ser melhoradas no que tange à absorção de fluidos, o que foi investigado pela inclusão na formulação do tensoativo Kolliphor[®] P188, conforme discutido a seguir.

4.1.8. Incorporação de tensoativo nas membranas de quitosana-alginato

Na Figura 4.6 é mostrado o aspecto visual e morfológico das membranas de QA e QAS10 preparadas na presença do tensoativo Kolliphor[®] P188, denominadas QAP e QAPS10. Nota-se que não houve a formação de poros em nenhuma das amostras.

Figura 4.6 – Aspecto e morfologia da secção transversal das membranas de quitosana-alginato contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e com incorporação do tensoativo Kolliphor[®] P188.



A incorporação de tensoativo como agente porogênico em membranas polissacarídicas já é bem estabelecida na literatura (Bellini *et al.*, 2012; Bueno e Moraes, 2011; Bueno *et al.*, 2014). Bueno (2015) produziu membranas de quitosana-alginato com diferentes concentrações do tensoativo Pluronic F68 (0,02 e 0,1 g por grama de polissacarídeos) e obteve materiais com porosidade e área superficial adequada para aplicação como *scaffolds* de células da pele. Segundo a autora, devido ao caráter anfifílico do tensoativo, o mesmo pode interagir com a água ou com os polissacarídeos através de suas cadeias polares, enquanto que a cadeia apolar fica voltada para o ar contido nas bolhas formadas durante a agitação da mistura. A integridade estrutural da espuma é mantida devido à forte associação entre as macromoléculas e a alta viscosidade do sistema.

Adicionalmente, de acordo com Stoppel *et al.* (2011), há uma forte associação, através de ligações de hidrogênio, entre o Pluronic F68 (ou Kolliphor P188) e o alginato, levando a um aumento na viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez contribui na manutenção da integridade estrutural da espuma, como relatado por Bueno (2015).

Bierhalz e Moraes (2016) produziram e compararam membranas de quitosana com alginato de baixa viscosidade e de quitosana com alginato de média viscosidade, com distintas proporções dos polissacarídeos (3:1, 1:1 e 1:3), contendo ou não Poloxamer 188 (ou Kolliphor P188). As autoras notaram que todas as formulações preparadas com alginato de baixa viscosidade não apresentaram estrutura porosa quando na presença de 0,1 g do tensoativo por grama de polissacarídeo, comportamento este também notado no presente estudo. Já as membranas desenvolvidas com alginato de média viscosidade apresentaram estrutura altamente porosa na presença do surfactante. Segundo as autoras, a baixa viscosidade do alginato não auxiliou na manutenção da estabilidade da espuma, sendo esta colapsada completamente durante a moldagem do material na placa de *Petri*.

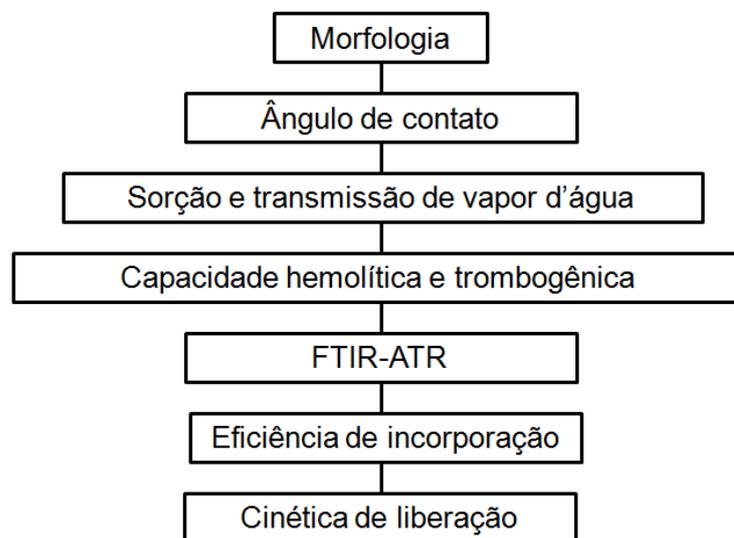
Neste sentido, o estudo com as membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade contendo Kolliphor[®] P188 foi descontinuado no presente trabalho, por estas não apresentarem o aspecto poroso desejado. A incorporação dos compostos naturais, timol e betacaroteno, e as caracterizações subsequentes foram realizadas somente com membranas QAS10, as quais apresentaram melhor desempenho, principalmente quanto à resistência a tração. A partir deste ponto esta amostra será denominada simplesmente de QAS.

4.1.9. Efeito da adição dupla de timol e betacaroteno por diferentes metodologias nas características das membranas

Neste tópico são apresentados os resultados referentes à comparação das características das amostras QAS contendo simultaneamente timol e betacaroteno incorporados por adição à mistura polimérica, por impregnação em solução e mediada por CO₂ supercrítico. Para a metodologia de adição direta foram utilizadas as máximas solubilidades dos compostos bioativos em etanol, as quais correspondem a 1 g/mL e 0,38 mg/mL (ambos a 25 °C) para timol e betacaroteno, respectivamente (Science Lab, 2013; Três *et al.*, 2007). Para a impregnação por imersão em solução e utilizando sistema supercrítico, a concentração de timol foi baseada em Dias *et al.* (2011), empregando-se uma concentração de 10% do limite

de solubilidade em CO₂ supercrítico nas condições testadas (taxa de pressurização a 250 bar e temperatura do sistema a 50 °C). Já para o betacaroteno utilizou-se a máxima solubilidade em CO₂ supercrítico também nas condições testadas (Araus *et al.*, 2011; Sovová *et al.*, 2001). Além do mais, visou-se comparar duas condições de despressurização, 5 e 10 bar. Na Figura 4.7 são apresentadas as caracterizações realizadas desses materiais na forma de diagrama.

Figura 4.7 – Diagrama referente às caracterizações das membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade preparadas com 0,1 g de PDMS (QAS10) e contendo timol e betacaroteno por distintas metodologias.

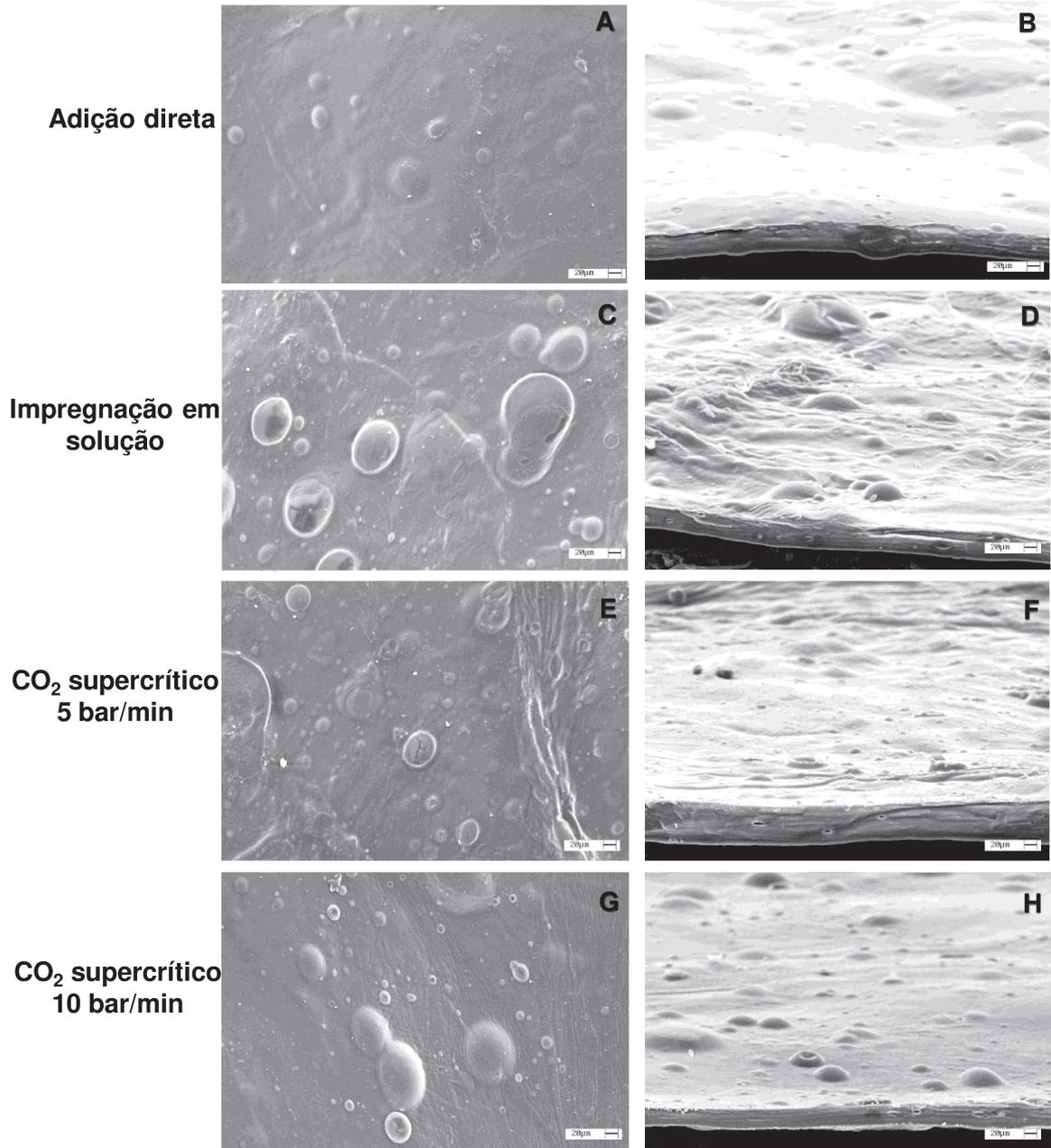


4.1.9.1. Análise morfológica da superfície e secção transversal

Na Figura 4.8 são mostrados os aspectos morfológicos das membranas flexíveis de quitosana-alginato (QAS) com incorporação dupla de timol e betacaroteno (QASTB) através das distintas metodologias.

Não houve diferenças significativas nas membranas quanto a efeitos estruturais na presença dos compostos bioativos ou quando submetidas às metodologias de incorporação. Assim, as formulações continuaram apresentando matriz com aspecto homogêneo e a presença característica de gotículas devido à presença do agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B.

Figura 4.8 – Morfologia das membranas flexíveis de quitosana-alginato (QAS) com incorporação dupla de timol e betacaroteno. Superfície das membranas: A, C, E, G. Secção transversal das membranas: B, D, F, H.



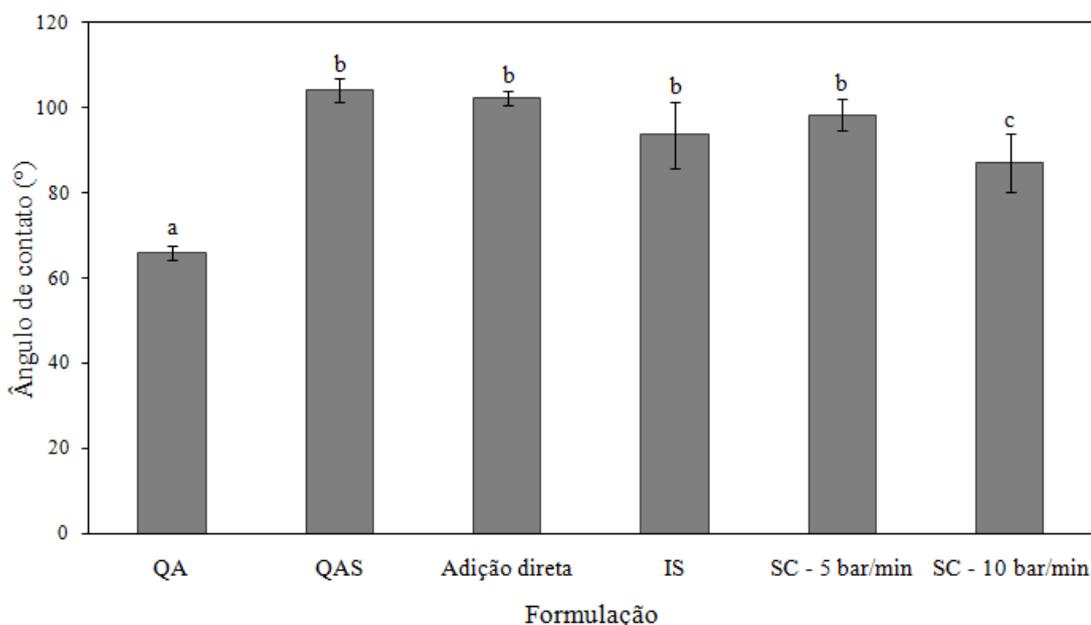
Nota-se, portanto, que os fármacos timol e betacaroteno não são perceptíveis entre as lamelas e a superfície dos materiais. Pode-se supor que, para todos os métodos de incorporação utilizados, os compostos foram totalmente solubilizados pelo etanol e dissolvidos homogeneamente na estrutura do material, dificultando sua visualização. Outra hipótese levantada foi que, possivelmente, o timol e betacaroteno poderiam ter sido carreados

durante a evaporação dos solventes na fase de secagem das membranas, hipótese esta investigada no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

4.1.9.2. Ângulo de contato

Na Figura 4.9 são mostrados os resultados referentes ao ângulo de contato das membranas de quitosana e alginato contendo 0,1 g/g de Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e com incorporação dupla de timol e betacaroteno pelas três metodologias distintas. Membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B apresentaram caráter predominantemente hidrofóbico, uma vez que os ângulos de contato estão acima de 90°. O polidimetilsiloxano (PDMS) é caracterizado por possuir cadeia principal com repetidas ligações de silício-oxigênio (Si-O) e silício-metila (Si-CH₃), sendo estas dispostas em espirais e com os grupamentos metila expostos na região externa da cadeia, fornecendo assim propriedades hidrofóbicas ao material (Hassler *et al.*, 2011; Ratner *et al.*, 2004; Brachaczek, 2014).

Figura 4.9 – Ângulos de contato das membranas de quitosana e alginato (QA) preparadas somente na presença de Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e com incorporação dupla de timol e betacaroteno por adição direta à mistura, por impregnação em solução (IS) e por metodologia supercrítica (SC), com despressurização a 5 e 10 bar/min.



Nota-se, no entanto, que não houve diferenças significativas decorrentes da

incorporação dos compostos bioativos pelas diferentes técnicas, com exceção dos dispositivos submetidos à impregnação por metodologia supercrítica com a maior taxa de despressurização (10 bar/min).

Uma particularidade da metodologia supercrítica refere-se à ação plastificante temporária que o CO₂ exerce no material. Durante o processamento, com pressão e temperatura definidas, há o intumescimento da matriz polimérica, facilitando a migração e, portanto, a impregnação dos compostos bioativos nos dispositivos. Já na etapa de despressurização há a retração da matriz polimérica e as cadeias de polímero retornam ao seu estado original (Dias *et al.*, 2013). Segundo Braga *et al.* (2008), maiores taxas de despressurização podem alterar em maior proporção as amostras poliméricas e, conseqüentemente, sua estrutura, isto quando comparadas às menores taxas. Além do mais, os autores expõem que, nestes casos, também pode ocorrer carreamento de fragmentos da matriz polimérica. Adicionalmente, de acordo com Bal *et al.* (2014) e Kiran (2016), o relaxamento das cadeias dos polímeros e a capacidade de hidratação dos materiais são proporcionais às taxas de despressurização. Assim, quanto mais rápida for a despressurização do sistema de CO₂ supercrítico, maior será o relaxamento e a hidratação das cadeias poliméricas que estão expostas a tal metodologia de impregnação. Tais observações corroboram com os dados obtidos para o ângulo de contato, tendo-se em vista que na maior taxa de despressurização (10 bar/min), a membrana apresentou diminuição na hidrofobicidade de sua superfície. Assim, pode-se sugerir que fragmentos da matriz polimérica podem ter sido carreados durante a despressurização e/ou que houve maior relaxamento das cadeias poliméricas, facilitando a maior hidratação do material quando na aplicação da gotícula de água sobre o dispositivo.

4.1.9.3. Sorção e transmissão de vapor d'água

Na Tabela 4.6 encontram-se os valores da capacidade de sorção de vapor d'água das membranas produzidas. De acordo com o teste de Tukey, não há diferenças significativas entre as distintas formulações, tanto na ausência quanto na presença de Silpuran[®] 2130 A/B, timol e betacaroteno, alcançando de 12 a 17% de sorção de vapor d'água. Logo, a incorporação do agente siliconado e dos compostos bioativos não afeta esta propriedade. Os dados obtidos corroboram com o trabalho de Bueno (2015), que obteve 15,5% de capacidade de sorção de vapor d'água para membranas constituídas de quitosana-alginato.

Ainda na Tabela 4.6 são mostrados os valores obtidos de taxa transmissão de vapor

d'água (TVA) pelas membranas. A análise estatística mostrou não haver diferenças significativas entre os valores encontrados entre as formulações QA, QAS e das formulações incorporando timol e betacaroteno por adição direta à mistura, variando de 710 a 755 g/m².dia. Logo, a adição de Silpuran[®] 2130 A/B também não afeta esta propriedade.

Tabela 4.6 – Sorção e transmissão de vapor d'água das membranas de quitosana e alginato (QA) preparadas somente na presença de Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e com incorporação dupla de timol e betacaroteno por adição direta à mistura, por impregnação em solução e por metodologia supercrítica (SC – 5 e 10 bar/min).

<i>Amostra</i>	<i>Sorção (%)</i>	<i>TVA (g/m².dia)</i>
QA	14,60 ± 0,80 ^a	728,8 ± 45,2 ^a
QAS	17,15 ± 0,40 ^a	755,1 ± 22,9 ^a
QASTB - Adição direta	12,46 ± 1,12 ^a	709,7 ± 21,9 ^a
QASTB - Impregnação em solução	12,69 ± 0,51 ^a	888,4 ± 13,8 ^b
QASTB - CO ₂ SC – 5 bar/min	12,60 ± 0,14 ^a	948,7 ± 52,8 ^b
QASTB - CO ₂ SC – 10 bar/min	15,78 ± 1,72 ^a	1148,4 ± 31,6 ^c

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

A incorporação de timol e betacaroteno por impregnação em solução etanólica e mediada por CO₂ supercrítico aumentou a transmissão de vapor d'água nas membranas, variando de 949 a 1148 g/m² ao dia. Nota-se que houve uma maior transmissão de vapor d'água nas formulações submetidas à impregnação por metodologia supercrítica a uma maior taxa de depressurização (10 bar/min). Como já discutido anteriormente, a maior taxa de depressurização pode ter contribuído para o maior relaxamento das cadeias dos polímeros, o que também pode ter aumentado a taxa de transmissão de vapor d'água.

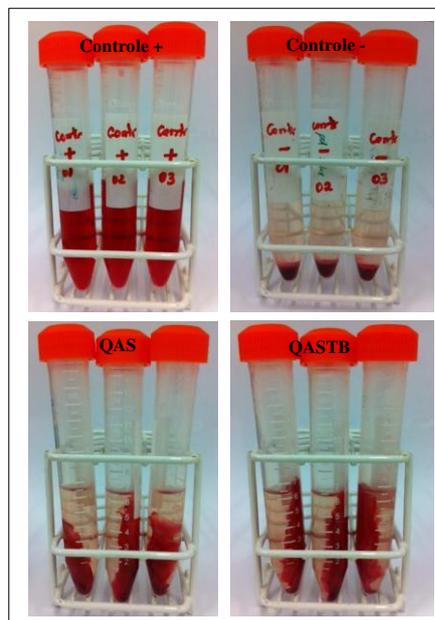
A taxa de transmissão de vapor d'água é um parâmetro de suma importância na área de curativos, uma vez que um alto valor de TVA pode levar à desidratação excessiva da ferida, enquanto que uma baixa TVA pode levar à maceração do tecido da lesão por excesso de líquido, causando dor ao paciente. A taxa de perda de água através da evaporação depende do tipo de lesão e do estágio da cicatrização, como por exemplo, a pele saudável ou ferimentos leves possuem uma TVA de 150-200 g/m².dia, as queimaduras de primeiro grau estão entre 250-300 g/m².dia e as feridas com tecido de granulação exibem valores entre 5000-

5200 g/m².dia (Dias *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Assim, todas as membranas descritas até este momento neste trabalho apresentam potencial uso em lesões moderadamente exsudativas.

4.1.9.4. Capacidade hemolítica e trombogênica

Para este ensaio foram avaliadas as formulações contendo o agente siliconado com incorporação ou não de timol e betacaroteno durante o processamento das membranas. Este ensaio de caracterização do comportamento biológico foi realizado na Universidade de Coimbra (Portugal), sendo um ensaio dispendioso e com cronograma para a execução limitado. Assim, não foi possível realizá-lo para todas as amostras. Na Figura 4.10 são mostrados os aspectos destes materiais quando comparados aos controles positivo e negativo.

Figura 4.10 – Aspecto das membranas de quitosana-alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e na presença de timol e betacaroteno incorporados diretamente à mistura de polímeros (QASTB) submetidas ao ensaio de determinação de capacidade hemolítica.

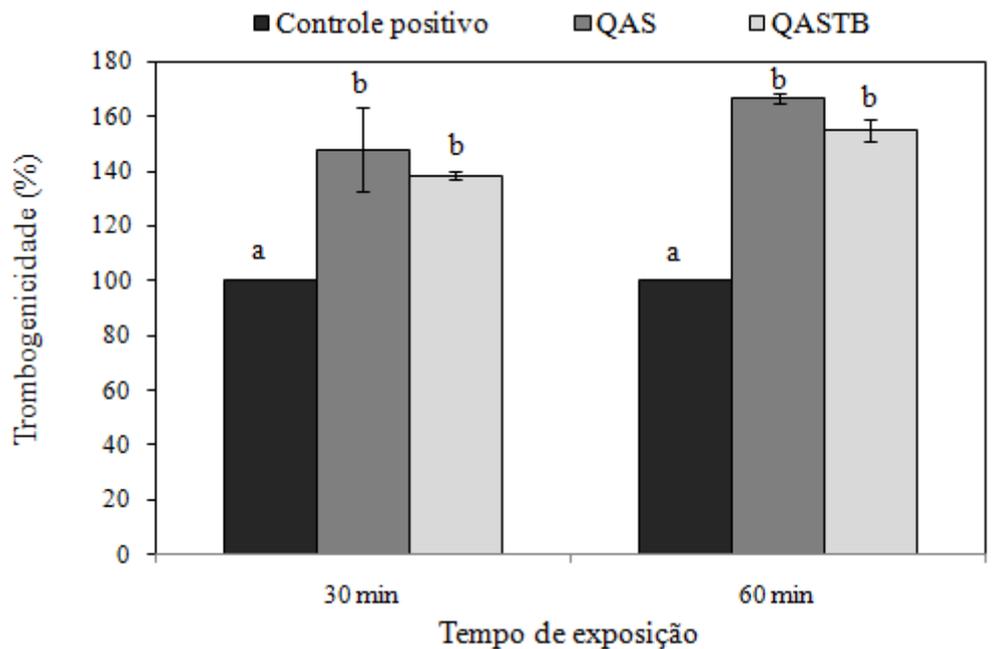


As formulações testadas apresentaram capacidade hemolítica de 0,45 e 0,89% para QAS e QASTB, respectivamente. Logo, são consideradas não hemolíticas por apresentarem valores inferiores a 2, segundo a classificação ASTM F756-00 (2000). A capacidade hemolítica é uma análise baseada na quantificação da hemoglobina liberada no plasma decorrente do rompimento das hemácias no sangue, sendo considerado um teste importante, uma vez que

pode não ser mensurável sob condições *in vivo*. Neste sentido, tanto o agente siliconado Silpuran® 2130 A/B quanto os compostos bioativos não resultam em apreciável rompimento dos glóbulos vermelhos.

Estas mesmas formulações foram analisadas quanto ao índice trombogênico e os resultados são apresentados na Figura 4.11.

Figura 4.11 – Trombogenicidade das membranas de quitosana-alginato contendo Silpuran® 2130 A/B (QAS) e na presença de timol e betacaroteno incorporados diretamente à mistura de polímeros (QASTB).

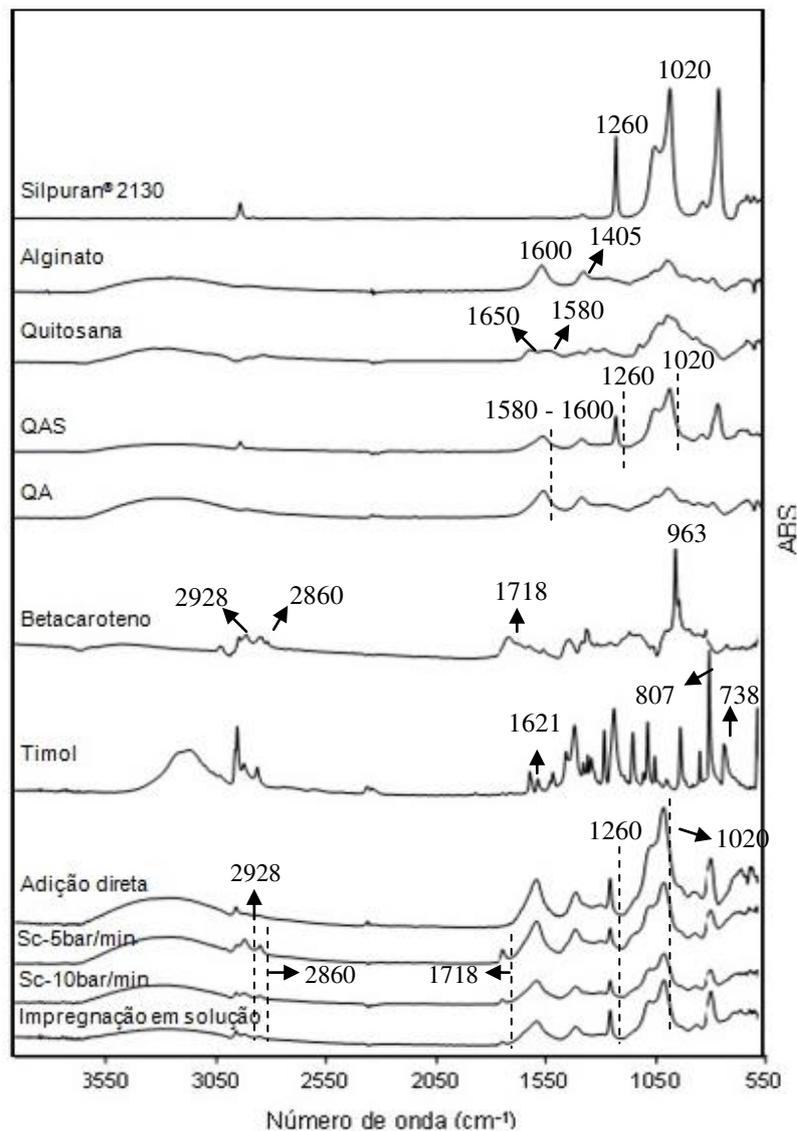


Todas as formulações foram classificadas como trombogênicas e o índice apresentou uma tendência de aumento com a elevação do tempo de contato com o sangue. No entanto, tais dados não apresentaram diferenças significativas entre si, sugerindo que o aumento da exposição de 30 para 60 min não influencia na capacidade trombogênica dos materiais. No caso dos curativos, um índice de trombogenicidade elevado passa a ser até mesmo interessante, uma vez que ao entrar em contato com a ferida aberta, haveria a indução da formação de trombos, favorecendo o estancamento do sangramento e acelerando, desta forma, o processo de cicatrização.

4.1.9.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Na Figura 4.12 são mostrados os espectros de absorção no infravermelho (FTIR - ATR) obtidos para os polímeros quitosana, alginato e Silpuran[®] 2130 A/B isolados, para as membranas de quitosana e alginato preparadas na presença ou ausência de Silpuran[®] 2130 A/B, para timol e betacaroteno isolados e para as membranas flexíveis com incorporação destes compostos naturais por distintas metodologias.

Figura 4.12 - Espectros de absorção (FTIR-ATR) dos polímeros isolados quitosana, alginato e Silpuran[®] 2130 A/B; das membranas de quitosana e alginato (QA) preparadas na presença de Silpuran[®] 2130 A/B (QAS); dos agentes bioativos timol e betacaroteno livres; e das membranas flexíveis (QASTB) com incorporação simultânea dos compostos naturais por distintas metodologias.



Os espectros dos polissacarídeos isolados e das membranas mostram a existência de uma banda larga significativa na região de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, aproximadamente. De acordo com Lawrie *et al.* (2007), esta banda pode ser atribuída ao estiramento dos grupos -OH , presentes tanto na quitosana como no alginato. Os picos característicos do grupamento amina da quitosana (1580 cm^{-1}) e carboxila do alginato (1600 cm^{-1}) estão sobrepostos nos espectros das membranas, entre uma região de $1680\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$. Isto dificulta a identificação de um ou outro composto livre, assim como de seu estado de protonação ou a ocorrência de interação entre as cadeias.

As membranas contendo o agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B apresentam picos pronunciados a 1260 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} . De acordo com Liu *et al.* (2001), o PDMS apresenta picos agudos a 1262 cm^{-1} , os quais são característicos para ligações Si-CH_3 e picos duplos e largos em 1098 e 1018 cm^{-1} que são característicos de ligações Si-O-Si .

Ainda na Figura 4.12 são apresentados os espectros de timol e betacaroteno isolados e das membranas flexíveis com incorporação destes compostos naturais por distintas metodologias. Nota-se que as bandas características dos polissacarídeos quitosana e alginato e os picos características do agente siliconado, apresentados anteriormente, dominaram os espectros das membranas. No entanto, as membranas exibiram alguns picos característicos de betacaroteno e timol.

O betacaroteno possui picos a 2928 , 1718 e 963 cm^{-1} , que são característicos de vibrações de C-H alifáticos, do estiramento do grupo carbonila (C=O) e do trans conjugado alceno (CH=CH), respectivamente (Zaibunnisa *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2014). Estes picos podem ser notados nos espectros das membranas impregnadas, com exceção do pico a 963 cm^{-1} , que está sobreposto ao pico 1020 cm^{-1} referente à presença de Silpuran[®] 2130 A/B. Isto mostra que o betacaroteno foi retido nas membranas flexíveis de quitosana e alginato, com exceção da formulação impregnada por imersão em solução, na qual não é possível identificar vibrações dos compostos bioativos isolados em seu espectro. No entanto, é possível observar que as membranas com incorporação de betacaroteno por adição direta não apresentam os picos específicos referentes ao composto. Isto pode ser devido à sensibilidade da técnica, tendo-se em vista que esta apresenta maior sensibilidade aos compostos localizados na superfície do dispositivo e, quando o fármaco é incorporado durante o processamento, o mesmo fica distribuído com maior homogeneidade por toda estrutura dos filmes. Já o timol exibe picos em 738 , 807 e 1621 cm^{-1} , que são característicos das vibrações de seu anel

aromático (Torres *et al.*, 2014; Rukmani e Sundrarajan, 2011). No entanto, estes picos não são notados nos espectros dos dispositivos de quitosana e alginato contendo este composto natural. Provavelmente isto se deve à sobreposição destes picos com as bandas características do agente siliconado. A fim de confirmar a presença ou não de timol nas membranas após as distintas metodologias de incorporação, foram realizadas análises de eficiência de incorporação e cinética de liberação dos compostos bioativos. Os resultados são apresentados a seguir.

4.1.9.6. *Eficiência de incorporação de timol e betacaroteno*

A incorporação dos compostos bioativos por adição direta durante a mistura polimérica foi realizada após a etapa de reticulação primária e nas proporções de 10% e 0,08%, em relação à massa total de polímeros presentes na mistura, para timol e betacaroteno, respectivamente. Estas concentrações correspondem à adição de 90 mg de timol e 0,76 mg de betacaroteno por membrana, sendo esta composta por 0,9 g de polissacarídeos. Para esta metodologia, a eficiência de incorporação foi realizada através das medidas de absorvância dos compostos liberados nas etapas de reticulação secundária e lavagem, como descrito no item 3.4.15.

Verificou-se que os compostos bioativos não estavam sendo liberados em quantidades significativas em tais etapas, tendo-se em vista que não houve constatação de valores relevantes de absorvância. Uma hipótese para tal comportamento seria a evaporação dos compostos naturais durante a etapa de secagem. Desta forma, a fim de confirmar esta possível evaporação, optou-se por avaliar gravimetricamente a presença ou não de timol e betacaroteno após a etapa de secagem. Esta análise foi realizada separadamente para cada composto natural, a fim de averiguar com maior exatidão qual deles estaria sendo evaporado em maiores proporções. Para isto, uma placa de *Petri*, previamente pesada, contendo a mesma quantidade de água, etanol e timol ou betacaroteno, utilizada no processamento das membranas foi mantida em estufa a 37°C por 20 horas. Após este período, notou-se que a massa da placa contendo timol não diferiu significativamente da placa vazia. Neste caso, é possível afirmar que os solventes carregaram todo timol durante a evaporação na etapa de secagem. Já para o betacaroteno, foi possível quantificar aproximadamente 23% da massa inicial depositada na placa, o que corresponde a 0,18 mg. Desta forma, 77% da massa de betacaroteno também foi carregada durante a evaporação. Possivelmente, a não quantificação deste composto nas etapas de reticulação secundária e lavagens pode ser decorrente da retenção do betacaroteno

na matriz polimérica, o qual não foi liberado nestas etapas. Adicionalmente, a análise de espectroscopia de infravermelho de Fourier apresentada no tópico anterior mostra a presença de betacaroteno no dispositivo, confirmando assim a retenção do composto.

A eficiência de incorporação para a metodologia de impregnação em solução etanólica e mediada por CO₂ supercrítico contendo os compostos naturais foi avaliada através da comparação entre a razão mássica final do composto bioativo e sua razão mássica inicial. Apesar de a presença do betacaroteno ter sido confirmada nas membranas através da análise de FTIR-ATR, o mesmo somente foi quantificado quando submetido ao sistema supercrítico na taxa de despressurização de 10 bar/min, alcançando eficiência de incorporação de 33%. Logo, uma maior quantidade do composto ficou retida na matriz polimérica para esta metodologia. Possivelmente, o betacaroteno interage por ligações de hidrogênio com os polímeros constituintes da membrana. Para o timol, baixas eficiências de incorporação foram obtidas para todas as metodologias, em torno de 0,2%.

Baixas eficiências de incorporação do composto bioativo quando impregnado por imersão em solução também foram observadas por Souza *et al.* (2016), que incorporaram o antibiótico eritromicina em membranas de quitosana-alginato e quitosana-xantana. Os autores atribuíram tal comportamento à baixa absorção de etanol pelos filmes, em torno de 0,6 g/g.

Ao analisar os dados obtidos para o sistema supercrítico, pode-se supor que grande parte da quantidade adicionada de timol foi evaporada durante a etapa de despressurização, o que pode ser devido à alta volatilidade e solubilidade desse composto em CO₂ supercrítico.

Desta forma, as características das moléculas a serem incorporadas são de primordial importância para uma impregnação efetiva. O timol, por exemplo, apresentou alta volatilidade nas condições operacionais da metodologia por adição direta, no entanto, por ser uma molécula relativamente pequena (massa molar de 150,22 g/mol), sua incorporação durante a imersão em solução foi facilitada. Já o betacaroteno apresenta, possivelmente, a pressão de vapor próxima às condições testadas para a primeira metodologia, tendo-se em vista que somente 23% de sua massa não foi carregada durante a etapa de secagem à temperatura de 37 °C. A molécula deste composto (massa molar de 536,87 g/mol) é maior que a do timol e, possivelmente, apresenta maior limitação para difundir totalmente para fora da matriz. Desta forma, tanto a metodologia a ser empregada quanto as características da molécula a ser incorporada influenciam fortemente na eficiência de incorporação de compostos na matriz de polímeros.

Na Tabela 4.7 são sumarizados todos os resultados coletados acerca da eficiência de incorporação do timol e do betacaroteno, e no item a seguir são mostrados os dados de liberação dos compostos bioativos incorporados pelas três metodologias abordadas no presente trabalho.

Tabela 4.7 – Eficiência de incorporação de timol (T) e betacaroteno (B) nas membranas flexíveis de quitosana e alginato por adição direta à mistura polimérica, por impregnação em solução (IS) e por mediação de CO₂ supercrítico com despressurização de 5 e 10 bar/min.

<i>Metodologia</i>	<i>Razão mássica inicial (mg/mg)</i>		<i>Razão mássica final (mg/mg)</i>		<i>Eficiência de incorporação (%)</i>	
	<i>T</i>	<i>B</i>	<i>T</i>	<i>B</i>	<i>T</i>	<i>B</i>
Adição direta	100	0,84	0,0	0,2	0,0	23,8
IS	1,5	0,0216	0,0031	0,0*	0,22	0,0*
SC-5bar/min	1,5	0,0216	0,0035	0,0*	0,20	0,0*
SC-10bar/min	1,5	0,0216	0,0039	0,012	0,22	33

*abaixo do limite mínimo de detecção

4.1.9.7. *Extração de timol e betacaroteno*

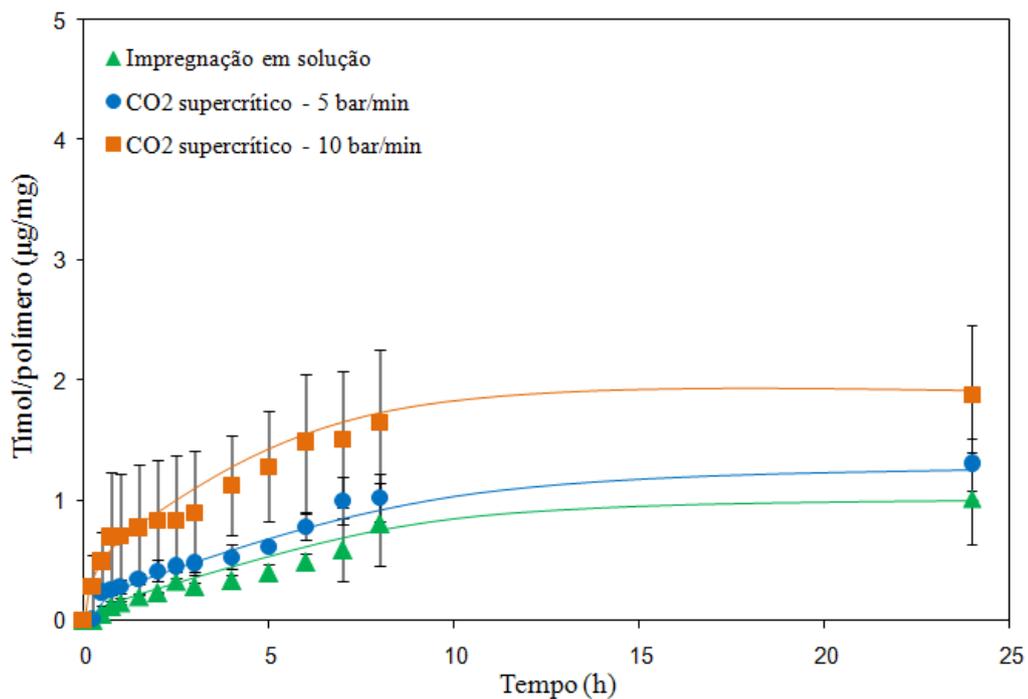
Na Figura 4.13 são apresentados os resultados obtidos para a quantidade de timol extraída das membranas flexíveis de quitosana-alginato após imersão em solução etanólica (etanol PA, >99,5%).

Observa-se que os valores liberados de timol para as metodologias de impregnação em solução e mediada por CO₂ supercrítico não representaram a quantidade total incorporada, constatando-se que a maior parte do composto ficou retida na matriz. Apesar de o betacaroteno ter sido detectado nas formulações através da análise de FTIR, o mesmo somente foi liberado eficientemente do dispositivo através da metodologia mediada por CO₂ supercrítico com taxa de despressurização de 10 bar/min, não apresentando assim liberação significativa para as demais metodologias (impregnação em solução e CO₂ supercrítico com taxa de despressurização de 5 bar/min). Contudo, a retenção de timol e betacaroteno na membrana pode ser um ponto positivo para quando o biomaterial for utilizado como cobertura, podendo exercer efeitos de barreira.

Em geral, o equilíbrio da quantidade liberada de timol e betacaroteno foi atingido em, aproximadamente, 8 horas e 15 minutos, respectivamente. Assim, já a partir dos primeiros

minutos de aplicação, o timol pode agir como anestésico, antisséptico e anti-inflamatório por tempo prolongado e o betacaroteno, como antioxidante. Além do mais, não foram encontradas diferenças significativas na liberação de timol incorporado pelas diferentes metodologias após 48 h, observando-se valores iguais a 3,1, 3,5 e 3,9 μg de timol para a impregnação em solução e mediada por fluido supercrítico nas taxas de despressurização de 5 e 10 bar/min, respectivamente. Na Tabela 4.8 são mostrados os valores extraídos em etanol após 48 h dos compostos timol e betacaroteno quando submetidos às três distintas metodologias de incorporação.

Figura 4.13 – Cinética de extração do timol incorporado nas membranas flexíveis de quitosana e alginato por impregnação em solução e por mediação de CO_2 supercrítico (5 e 10 bar) em solução constituída de etanol PA.



Dias *et al.* (2011) incorporaram em filmes de carboxibutilquitosana, através da metodologia supercrítica, a mesma fração de timol utilizada no presente trabalho (10% do limite de solubilidade em CO_2 supercrítico), a uma taxa de pressurização de 200 bar/min a 40 °C e despressurização de 10 bar/min, e observaram que, após 8 horas, houve liberação máxima de, aproximadamente, 10 μg de timol por miligrama de polímero. Os autores observaram que alterações nas condições de pressurização e temperatura (100 bar e 30 °C, e

200 bar e 40 °C) do sistema supercrítico podem alterar significativamente a liberação do composto, uma vez que ao aumentar estas duas variáveis houve um aumento de 50% da quantidade liberada de timol.

Tabela 4.8 – Liberação máxima de timol e betacaroteno após 48 horas de exposição em solução etanólica (etanol PA, >99,5%).

<i>Metodologia de incorporação</i>	<i>Quantidade máxima liberada</i>	
	<i>Timol (µg)</i>	<i>Betacaroteno(µg)</i>
Adição direta	0,0	0,0*
Impregnação em solução	3,1 ± 0,5 ^a	0,0*
CO ₂ supercrítico – 5bar/min	3,5 ± 0,6 ^a	0,0*
CO ₂ supercrítico – 10bar/min	3,9 ± 0,8 ^a	1,2 ± 0,05 ^b

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

*abaixo do limite mínimo de detecção

No presente trabalho, ao se alterar as condições de despressurização do sistema (5 e 10 bar/min) notou-se que, apesar de se atingir maiores quantidades liberadas em solução quando na maior taxa, não houve diferenças estatísticas significativas para as duas condições.

4.1.9.8. *Discussão comparativa das características das membranas produzidas com quitosana e alginato de baixa viscosidade na presença de diferentes proporções de Silpuran[®] 2130 A/B e com incorporação de timol e betacaroteno*

Na Tabela 4.9 é mostrada uma listagem geral dos dados obtidos no presente trabalho, focando principalmente nas membranas contendo ou não diferentes proporções do agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B. Buscou-se, com isso, avaliar se os requisitos estabelecidos para curativos visando o tratamento de lesões de pele estavam sendo adequadamente atendidos e, também realizar a comparação dos resultados obtidos com os dados relatados anteriormente por Pires (2013), a qual produziu membranas contendo 0,1 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de polissacarídeo. No entanto, para algumas propriedades não há relatos sobre os valores ideais desejados e, neste sentido, não foi possível a comparação dos mesmos.

Tabela 4.9 – Comparação das características das membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade produzidas neste trabalho, na presença ou não de Silpuran[®] 2130 A/B com as requeridas para a aplicação de curativos em lesões de pele.

Propriedade	Proporção de Silpuran [®] adicionado com relação à massa de polissacarídeo (g/g)					Valor para comparação
	0	0,01	0,05	0,10	0,15	
Espessura (mm)	0,11	0,10	0,16	0,16	0,22	< 2 ^a
Capacidade de absorção de água (g/g)	1,77	1,72	7,47	1,39	1,37	> 3,1 ^b
Perda de massa em água (%)	5,82	6,65	3,68	1,08	2,12	> 2,3 ^b
Perda de massa durante banho (%)	12,6	13,3	9,8	13,1	12,9	ND
Tensão na ruptura (MPa)	3,41	4,59	4,64	12,13	1,67	15 a 150 ^c
Alongamento na ruptura (MPa)	5,94	3,61	3,71	4,73	4,65	35 a 115 ^c
Módulo de Young (MPa)	2,43	2,74	1,96	1,81	0,51	ND
Ângulo de contato (°)	65,9	-	-	104,3	-	65 a 88 ^{d,e}
Sorção de vapor d'água (%)	14,6	-	-	17,5	-	29 a 57 ^f
Transmissão de vapor d'água (g/m ² .dia)	728,8	-	-	755,1	-	300 a 3000 ^g
Capacidade hemolítica (%)	-	-	-	0,48	-	< 2 ^h
Trombogenicidade (%)	-	-	-	166,8	-	ND

ND: dados não relatados na literatura

a: Ma *et al.* (2001)

b: Pires (2013)

c: Khan e Ahmad (2013)

d: Kang *et al.* (2010)

e: Xu *et al.* (2007)

f: Dias *et al.* (2013)

h: ASTM F 756 00 (2000)

De forma geral, todos os dispositivos desenvolvidos apresentaram propriedades distintas quando comparada às membranas desenvolvidas por Pires (2013), com exceção do alongamento na ruptura, que apresentou valores médios próximos aos do referido trabalho. Os valores de alongamento na ruptura são menores do que o limite inferior da faixa requerida

para aplicação na pele, no entanto, como já observado anteriormente (Tópico 4.1.7), estes valores são característicos de membranas polissacarídicas (Yan *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2008, Pires e Moraes, 2015). Supõe-se que as diferenças significativas entre os valores das demais propriedades devam-se, primordialmente, ao alginato de viscosidade reduzida utilizado neste trabalho, fato este também discutido anteriormente.

Tendo-se em vista os requisitos de propriedades mecânicas para aplicação como curativos, a membrana que obteve melhor desempenho foi a contendo 0,1 g/g do agente siliconado (QAS10), que alcançou 12,13 MPa. Esta formulação foi mais detalhadamente caracterizada e comparada àquela preparada na ausência do agente siliconado (QA). Notou-se uma diminuição significativa na hidrofobicidade dos dispositivos quando na presença de Silpuran[®] 2130 A/B, porém não houve grandes diferenças na sorção e transmissão de vapor d'água. Além do mais, a membrana QAS10 mostrou ser não hemolítica, apresentando, entretanto, caráter trombogênico. Esta última propriedade pode ser considerada como positiva quando há a necessidade de estancar sangramentos em feridas.

A incorporação simultânea de dois medicamentos foi uma alternativa testada no presente trabalho, tendo-se como escolha os compostos naturais timol e betacaroteno. No entanto, os mesmos não foram liberados como esperado. O timol evaporou-se totalmente quando a incorporação foi realizada durante o processamento da membrana, mais provavelmente na etapa de secagem. Para as outras metodologias (mediada por CO₂ supercrítico e impregnação em solução), o mesmo foi liberado a uma quantidade relativamente baixa, alcançando o máximo de 3,5 µg para as membranas submetidas ao sistema supercrítico com taxa de despressurização a 10 bar/min. A presença de betacaroteno não foi detectada na análise de liberação em solução através da técnica espectrofotométrica para as metodologias de adição direta à mistura polimérica e de impregnação em solução. Para a metodologia de incorporação por adição direta à mistura de polímeros, notou-se que, apesar de cerca de 77% da massa adicionada ter sido evaporada durante a etapa de secagem, o restante do composto ficou firmemente retido na membrana, como confirmado pela análise por FTIR.

Considerando-se a aplicação desejada dos filmes produzidos com alginato de baixa viscosidade, a formulação mais promissora foi a membrana de QAS10, sendo esta recomendável para lesões pouco exsudativas.

Tendo-se em vista que a incorporação de timol e betacaroteno por distintas metodologias não atingiu a meta esperada em termos da quantidade dos agentes bioativos

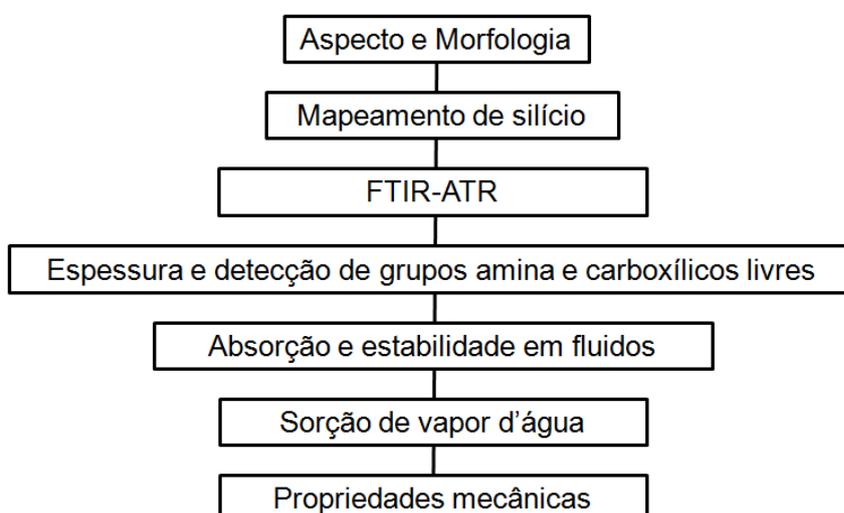
liberados, optou-se por avaliar outro agente bioativo que permitisse avaliar a factibilidade de liberação em proporções mais atrativas e potencialmente efetivas. O agente selecionado foi o extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot. Além do mais, a fim de melhorar as propriedades mecânicas destes biomateriais e possibilitar a obtenção também de dispositivos porosos, optou-se por preparar e caracterizar membranas com alginato de média viscosidade. Os resultados são apresentados no tópico a seguir.

4.2. Membranas flexíveis densas e porosas de quitosana complexada com alginato de média viscosidade

Após definir a concentração mais apropriada de PDMS para incorporar às membranas de quitosana-alginato (0,1 g/g com relação à massa de polissacarídeos), foram produzidas membranas com alginato de média viscosidade contendo ou não o agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B e o agente porogênico Kolliphor[®] P188 a uma concentração de 0,1% com relação ao volume de solução de alginato.

As membranas produzidas foram denominadas QA (para membranas de quitosana-alginato somente), QAS (para membranas contendo Silpuran[®] 2130 A/B), QAP (para membranas obtidas na presença de Kolliphor[®] P188) e QAPS (para membranas produzidas, simultaneamente, com a adição de Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188). Na Figura 4.14 são mostradas as caracterizações realizadas para essas formulações em forma de diagrama

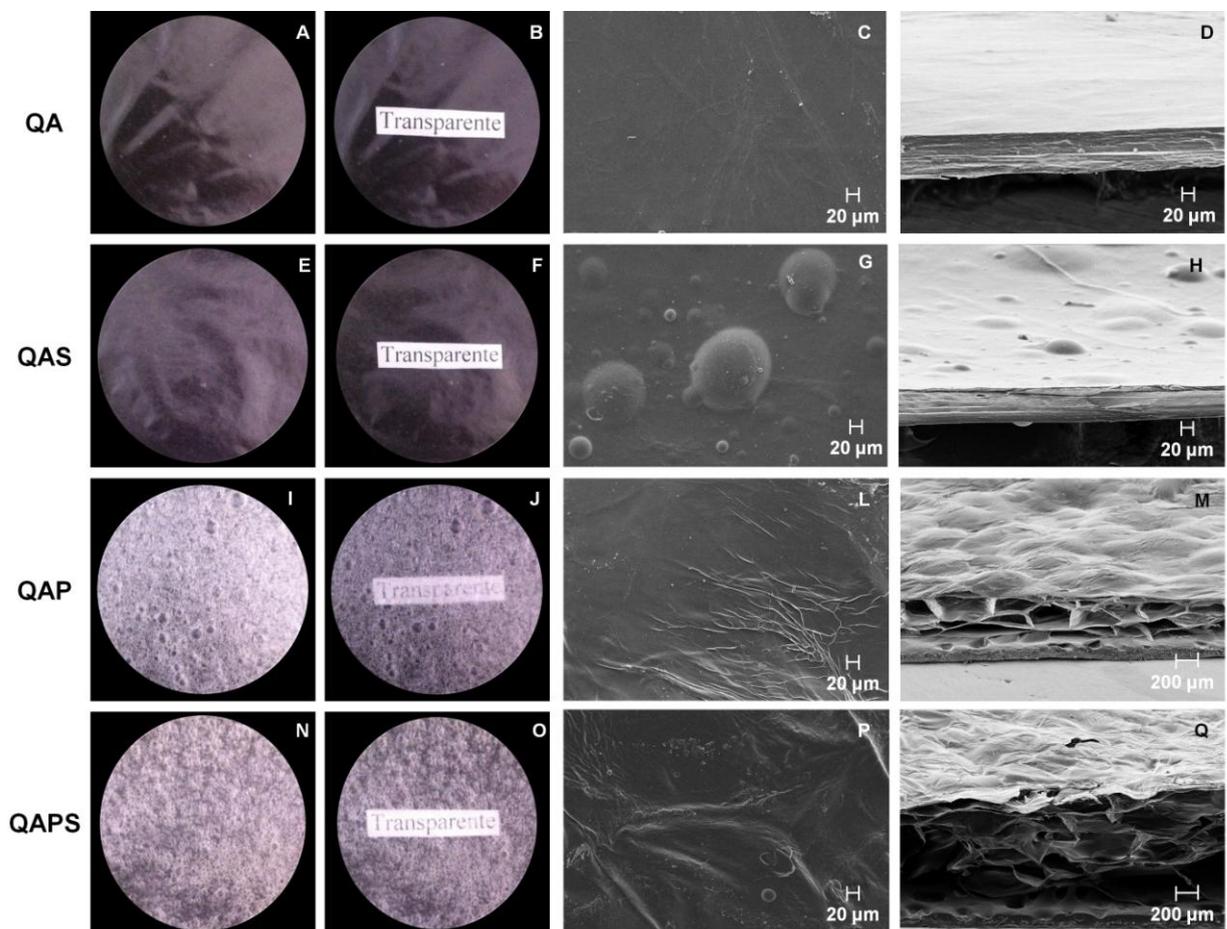
Figura 4.14 – Diagrama das caracterizações realizadas para as membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato.



4.2.1. Aspecto e morfologia das membranas

Na Figura 4.15 é mostrado o aspecto visual das membranas de quitosana complexadas com alginato de média viscosidade produzidas ou não na presença do agente siliconado e do tensoativo.

Figura 4.15 - Característica visual e morfológica de membranas de quitosana e alginato (QA) contendo o tensoativo Kolliphor[®] P188 (QAP), o agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) ou ambos (QASP).



Nota-se que as membranas densas de quitosana- alginato (QA) e quitosana-alginato-Silpuran[®] (QAS), não apresentaram diferenças quanto à homogeneidade e transparência dos filmes. A transparência de um curativo é uma vantagem considerável, tendo-se em vista que permite a inspeção da ferida sem a necessidade de remover o dispositivo, evitando o desconforto do paciente (Boateng *et al.*, 2008). Adicionalmente, observou-se que o filme de

QAS apresentou melhora na flexibilidade durante sua manipulação quando comparado à formulação de QA, fato este também observado por Pires e Moraes (2015). De acordo com as autoras, como as cadeias de siloxano proveniente do composto siliconado podem adotar várias configurações, sua adição ao complexo quitosana-alginato pode contribuir para o aumento da flexibilidade do dispositivo.

As formulações contendo Kolliphor[®] P188 (QAP e QAPS) apresentaram aspecto poroso e homogêneo, ao contrário do que foi obtido para as membranas preparadas com alginato de baixa viscosidade. Para a membrana de QAPS, o mesmo comportamento de melhora na flexibilidade durante o manuseio foi notado. A escolha do alginato de maior massa molar contribuiu para o aumento da viscosidade dinâmica da mistura, o que facilitou as interações por pontes de hidrogênio entre o polissacarídeo aniônico e o tensoativo, auxiliando na estabilização das bolhas formadas e na integridade da espuma durante a secagem.

Nota-se ainda que a porosidade resultante influenciou na transparência destes materiais. Apesar da diminuição na transparência dos dispositivos, a estrutura porosa tem papel fundamental no tratamento de feridas, uma vez que poros grandes e interconectados favorecem a migração e reorganização celular, assim como a difusão de fluidos e nutrientes, a e remoção de metabólitos secundários, sendo esta estrutura muito utilizada na confecção de suportes para o crescimento celular úteis na área de Engenharia de Tecidos, os *scaffolds* (Bueno et al., 2014; Bellini et al., 2012). Contudo, não só a ocorrência de poros é importante para a confecção dos *scaffold*, mas também seu tamanho, volume, distribuição e formato. O tamanho dos poros, por exemplo, é crucial para a penetração celular, produção de matriz extracelular e vascularização das áreas internas da matriz (El-Sherbiny e Yacoub, 2013). No entanto, o tamanho ideal do poro depende do propósito da aplicação do dispositivo como, por exemplo, a neovascularização requer poros de cerca de 5 μm (Brauker et al., 1995), enquanto para o crescimento de fibroblastos, os poros devem ter de 5 a 15 μm (Klawitter e Hulbert, 1971) e, para a reparação de pele de mamíferos adultos, entre 20 e 125 μm (Yannas et al., 1989). Mais recentemente, no entanto, tem-se o registro de recomendações mais claras, por exemplo, na área de engenharia de tecidos ósseos (Holzapfel et al., 2013). Neste caso, o tamanho recomendado é de 100 μm , mas para a osteogênese, são necessários poros maiores superiores a 300 μm . Supõe-se, nesta situação, que a interconectividade dos poros deva ser próxima de 100%, com interconexões de pelos menos 100 μm .

Bueno et al. (2014) avaliaram, através da técnica de picnometria de hélio, o tamanho dos poros das membranas de quitosana-alginato contendo o agente tensoativo e porogênico

Pluronic F68. Os autores relataram que poros com tamanho superior a $0,1 \mu\text{m}$ não foram considerados na análise, contudo, foi possível observar a presença de grande quantidade de poros de até 52 \AA ($5,2 \text{ nm}$). Ainda, segundo os autores, a técnica utilizada apresenta resultado mais preciso quando para a análise da densidade real do material; desta forma, salientam que a técnica mais apropriada para o dimensionamento do tamanho dos poros é a porosimetria de mercúrio por intrusão, mas que, para materiais poliméricos, tal método pode gerar resultados imprecisos.

Ainda na Figura 4.15 são mostradas as microscopias eletrônicas de varreduras das formulações. Assim como observado para as membranas produzidas com alginato de baixa viscosidade (Item 4.1.1), esta análise possibilitou confirmar o aspecto típico destes biomateriais, que apresentam estrutura relativamente homogênea e lamelar.

Como esperado, as membranas densas contendo o gel de silicone apresentaram gotículas dispersas por toda estrutura do material (Figuras 4.15G e 4.15H) e, como discutido anteriormente, estas podem ser consequência da alta viscosidade e da hidrofobicidade do agente siliconado, que desfavoreceram sua dispersão homogênea (Pires e Moraes, 2015; Estarlich *et al.*, 2011). Nota-se, no entanto, que o diâmetro das gotículas não é significativamente diferente daqueles observados nos filmes preparados com alginato de baixa viscosidade (entre 10 e $100 \mu\text{m}$). Isto mostra que não só a viscosidade do alginato pode interferir na redução e dispersão das bolhas de PDMS. Desta forma, pode-se também associar o efeito na dispersão das gotículas de gel de silicone à etapa de secagem dos dispositivos. A temperatura de secagem das membranas de quitosana-alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B produzidas por Pires e Moraes (2015), foi de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo obtidas gotículas com dimensões em torno de 30 e $120 \mu\text{m}$. Neste sentido, a maior temperatura de secagem pode ter acelerado a cinética de reticulação do gel de silicone, gerando menor homogeneidade na dispersão do PDMS no PEC de quitosana-alginato e, conseqüentemente, obtendo maiores dimensões de gotículas.

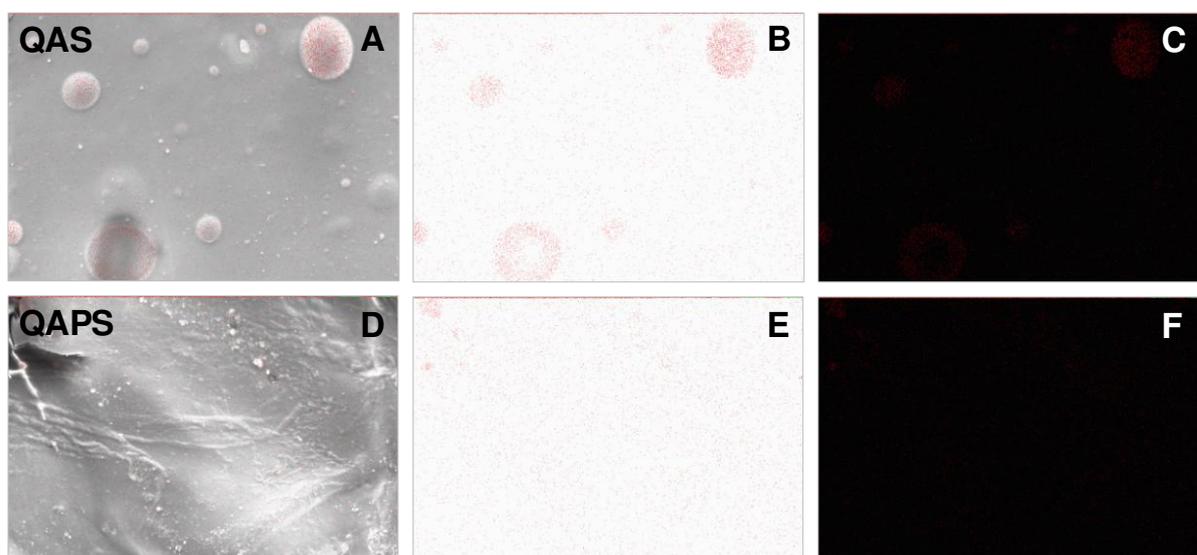
Para as amostras contendo o tensoativo (QAP e QAPS), observa-se que os poros se situam, primordialmente, na secção transversal do material e a superfície apresenta aspecto rugoso (que segue o contorno dos poros da estrutura alveolar da espuma seca) com algumas rupturas. Segundo Bueno e colaboradores (2014), as rupturas na superfície de membranas de quitosana-alginato preparadas na presença do tensoativo são indicativas do rompimento das bolhas de ar durante a etapa de secagem em estufa com circulação de ar. Alternativamente, tais rupturas podem ter ocorrido durante o processamento das amostras para a análise por

MEV, que envolve criofratura, deposição de ouro e exposição a vácuo. Em contrapartida, pode ser observado que não há presença de gotículas visíveis de PDMS nas amostras QAPS. Este comportamento pode ser devido à presença do tensoativo, que auxilia na diminuição da tensão superficial entre misturas imiscíveis (Fawcett *et al.*, 2012), facilitando a dispersão do gel de silicone. A fim de confirmar tal justificativa foi realizado o mapeamento de silício na matriz polimérica, mostrado a seguir.

4.2.2. Mapeamento de silício nas membranas

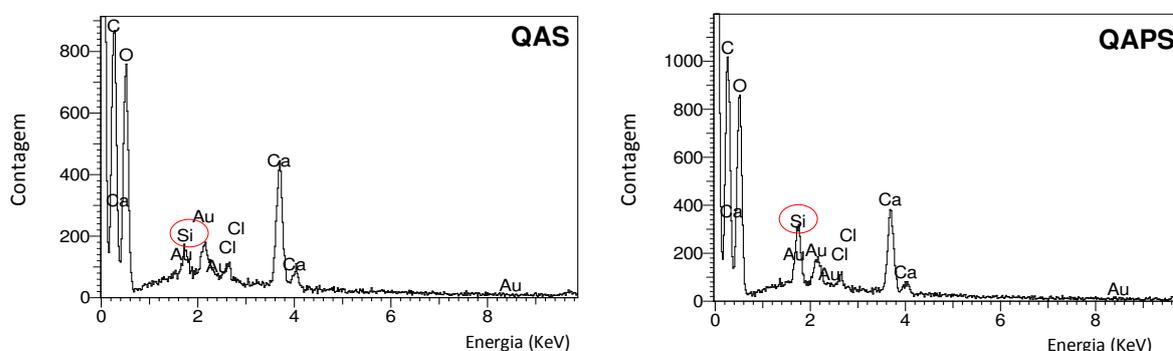
Nas Figuras 4.16 e 4.17 são mostrados os resultados obtidos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As micrografias com mapeamento de silício (Figura 4.16) mostram a deposição e aglomeração de silício (pontos vermelhos), proveniente do agente siliconado, dentro das gotículas da formulação de QAS. Em contrapartida, ratifica-se a ausência das gotículas e, conseqüentemente, de aglomerados de silício quando na presença do tensoativo (QAPS). Os espectros de EDS (Figura 4.17) mostram que, mesmo não apresentando as gotículas características da imiscibilidade do sistema, o silicone continua presente na estrutura da matriz de QAPS. Assim, confirma-se a hipótese de que o tensoativo compatibilizou a tensão superficial no complexo polimérico com a do PDMS, dispersando homogeneamente o silício anteriormente aglomerado nas gotículas.

Figura 4.16 – Mapeamento de silício das membranas flexíveis de quitosana e alginato na ausência (QAS) e presença do tensoativo Poloxamer 188 (QAPS).



Neste caso, devido ao caráter hidrofílico e lipofílico da molécula de Kolliphor[®] P188, houve favorecimento da homogeneização entre a solução de polissacarídeos e o agente siliconado através da orientação das cadeias do surfactante na interface das duas fases imiscíveis. Assim, a vantagem da associação de um tensoativo, como é o caso do Kolliphor[®] P188, nestes tipos de materiais é a sua função de reduzir a tensão interfacial entre fases hidrofílicas e hidrofóbicas e a estabilização da espuma.

Figura 4.17 – Espectros do mapeamento elemental das membranas flexíveis de quitosana e alginato produzidas na ausência (QAS) e na presença do tensoativo Kolliphor[®] P188 (QAPS).



4.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

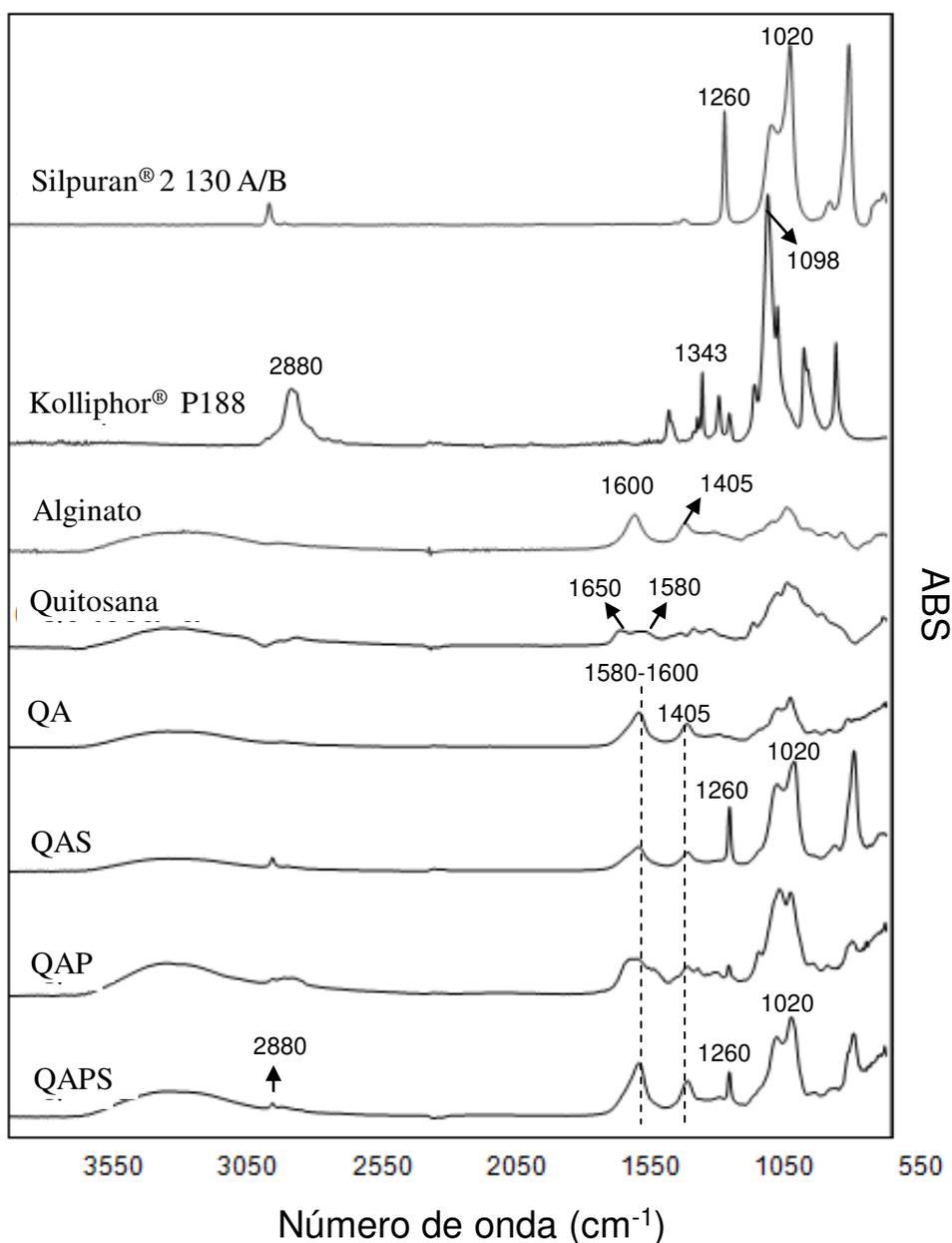
Na Figura 4.18 são mostrados os espectros obtidos para os polissacarídeos, Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188 isolados e também para as membranas flexíveis contendo ou não o agente tensoativo e o siliconado.

Nota-se que os picos característicos dos polissacarídeos (1580 e 1600 cm^{-1} para quitosana e alginato, respectivamente) foram encontrados nos espectros referentes a cada polissacarídeo isolado e, como já observado anteriormente, os mesmos ficam sobrepostos nas membranas. As membranas flexíveis também apresentaram os picos característicos do PDMS (1260 e 1020 cm^{-1}).

O que difere esta análise da anteriormente realizada para as membranas produzidas com alginato de baixa viscosidade, é a presença do tensoativo. O Kolliphor[®] P188 apresenta picos característicos em 2880 cm^{-1} e 1343 cm^{-1} , que correspondem às vibrações dos estiramentos C-H e O-H, respectivamente (Ansari *et al.*, 2015), e um pico pronunciado a 1098 cm^{-1} ,

correspondente ao grupo éter alifático (Wang *et al.*, 2010). Pode-se observar que estes picos não foram encontrados de forma clara nas formulações de QAP e QAPS. No entanto, na membrana de QAP, observa-se uma vibração na região de 2880 cm^{-1} , o que sugere a presença do tensoativo. Tendo-se em vista que o tensoativo utilizado não é iônico, que apresenta solubilidade relativamente elevada em água e que as interações deste composto com alginato por ligações de hidrogênio são relativamente fracas, o mesmo deve ter sido eficientemente removido do dispositivo durante as etapas de reticulação secundária e de lavagem.

Figura 4.18 – Espectros de absorção obtidos por FTIR-ATR dos polímeros isolados e das membranas preparadas na ausência e na presença de Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188.



4.2.4. Espessura das amostras secas e hidratadas

Na Tabela 4.10 são mostrados os dados obtidos para as amostras secas e úmidas das formulações flexíveis, densas ou porosas preparadas com alginato de média viscosidade, antes e após exposição à água a 37 °C por 24 h.

Tabela 4.10 – Espessura das membranas secas e úmidas preparadas pela complexação de quitosana e alginato de média viscosidade contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188.

Formulação	Espessura (mm)	
	Amostras secas	Amostras úmidas
QA	0,046 ± 0,005 ^a	0,293 ± 0,001 ^a
QAS	0,074 ± 0,002 ^a	0,103 ± 0,001 ^b
QAP	0,472 ± 0,023 ^b	0,949 ± 0,014 ^c
QAPS	0,488 ± 0,001 ^b	0,997 ± 0,002 ^d

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Nota-se uma alteração considerável entre as espessuras dos filmes preparados com alginato de baixa e média viscosidade (Tabelas 4.1 e 4.10, respectivamente). As membranas produzidas com alginato de baixa viscosidade apresentaram espessura significativamente maior do que os dispositivos desenvolvidos com alginato de média viscosidade, alcançando uma diferença média em torno de 56% para as amostras densas.

Os maiores valores obtidos anteriormente para o alginato de baixa viscosidade, como já mencionado, foram devido à utilização do alginato de baixa massa molar (Tópico 4.1.3). Já os dados de espessura encontrados para as membranas de quitosana-alginato produzidas com alginato de maior viscosidade se corroboram com os relatados na literatura, os quais abrangem uma faixa de 0,01 a 0,08 mm (Yan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2008; Pires e Moraes, 2015).

Não foram encontradas diferenças significativas, pelo teste de Tukey, para as amostras densas contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B. Este comportamento não foi observado por Pires e Moraes (2015), as quais notaram uma diminuição de 78% da espessura para as

amostras contendo o PDMS. Segundo as autoras, tal diminuição pode ter sido consequência da interação da platina do agente siliconado com os grupamentos amina da quitosana, favorecendo a maior compactação do dispositivo. Contudo, uma alternativa para justificar a hipótese de Pires e Moraes (2015) seria analisar a quantidade de grupos funcionais disponíveis da quitosana e do alginato associados ou não ao agente siliconado. Tal análise será apresentada no tópico seguinte.

Tendo-se em vista que no presente trabalho não houve diferenças significativas nesta propriedade quando na presença de Silpuran 2130[®] A/B, tanto para as amostras densas quanto para as porosas, pode-se considerar que tal comportamento foi decorrente da temperatura de secagem dos dispositivos, sendo utilizadas as temperaturas de 37 °C no presente trabalho e 60 °C por Pires e Moraes (2015).

Sabe-se que o aumento da temperatura eleva a energia cinética das moléculas e também a mobilidade das cadeias poliméricas (Shamsabadi *et al.*, 2014). Bueno (2015) estudou a influência do aumento da temperatura de secagem de membranas de quitosana-alginato e notou que houve uma diminuição na espessura dos materiais de 62% quando na elevação de temperatura de 37 para 60 °C. Adicionalmente, a temperatura para a gelificação máxima do Silpuran[®] 2130 A/B alcança cerca de 70 °C (Wacker Silicones, 2014), neste caso, possivelmente a temperatura utilizada por Pires e Moraes (2015) auxiliou, em maior proporção, a aproximação entre as cadeias de siloxano do gel de silicone e, consequentemente, na maior compactação da membrana. Contudo, uma alternativa para justificar tal suposição seria avaliar o comportamento do PDMS a partir do aumento da temperatura.

Como esperado, as amostras úmidas apresentaram maior espessura quando comparadas àquelas no estado seco. Contudo, nota-se que a formulação densa e úmida contendo o agente siliconado (QAS) mostrou-se menos espessa que o filme livre do mesmo (QA). Tal comportamento é justificado pela hidrofobicidade do Silpuran[®] 2130 A/B, que dificulta o contato da matriz polimérica com as soluções (Pires e Moraes, 2015).

Devido à maior proporção de espaços vazios, as membranas contendo o tensoativo (QAP e QAPS) apresentaram espessuras significativamente maiores que as densas, observando-se que a adição do agente siliconado não alterou tal propriedade. Membranas porosas de quitosana-alginato são relatadas na literatura com espessura média de 0,45 mm (Bueno e Moraes, 2011; Bueno *et al.*, 2014) e tais dados corroboram com o presente trabalho. Nota-se, no entanto, que a presença do PDMS (QAPS) aumentou em 5% a espessura do

dispositivo úmido quando comparado à formulação úmida na ausência do mesmo (QAP). Isto se deve à presença conjunta do tensoativo, que auxiliou na homogeneidade da mistura polimérica, proporcionando assim valores não muito discrepantes. Desta forma, possivelmente, a presença de Silpuran[®] 2130 A/B auxiliou na melhoria da flexibilidade das cadeias poliméricas e, tendo-se em vista que seu caráter apolar foi minimizado pela presença de surfactante, a acomodação de moléculas de água foi favorecida.

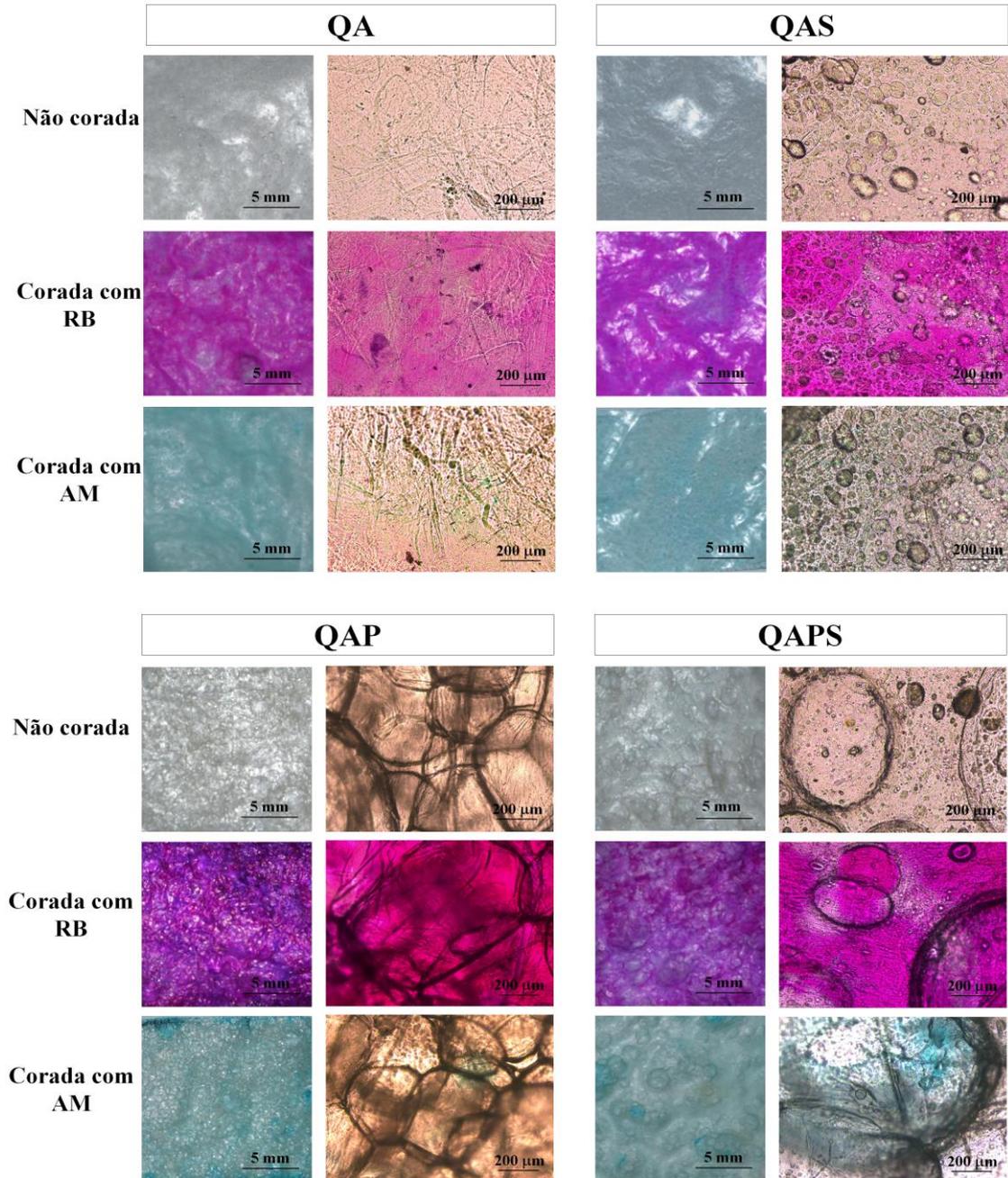
4.2.5. Detecção de grupamentos amina e carboxílico livres nas membranas

A fim de quantificar de forma indireta os grupamentos amina e carboxílico livres nas membranas de quitosana-alginato (QA) contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e Kolliphor[®] P188 (QAP) separadamente ou em conjunto (QAPS), foram utilizados os corantes de cargas opostas azul de metileno (carregado positivamente) e o rosa de bengala (carregado negativamente) para a detecção dos grupos carboxílicos residuais do alginato e amina da quitosana não ligados entre si, respectivamente.

Na Figura 4.19 são mostrados os aspectos e morfologias das formulações não coradas e coradas com rosa de bengala (RB) e azul de metileno (AM). Aparentemente, em todas as formulações a coloração rosa aparece de forma mais intensa, sugerindo maiores quantidades de grupamentos amina livres. Contudo, há a necessidade de confirmar tal análise com maior precisão, mesmo que de forma indireta. Neste sentido, foi também mensurada por espectrofotometria a absorbância dos corantes RB e AM, nos comprimentos de onda de 560 e 620 nm, respectivamente. Na Figura 4.20 são mostrados os valores de absorbância de ambos os corantes para cada uma das amostras.

Em geral, nota-se que há uma maior quantidade de grupamentos amina (corados com rosa de bengala) do que de carboxílicos (corados com azul de metileno) para todas as formulações, como também observado visualmente na Figura 4.19. Isto pode ser justificado pela massa molar dos polissacarídeos utilizados, tendo-se em vista que a quitosana e o alginato apresentam massa molar de $1,26 \times 10^6$ e $9,11 \times 10^4$ g/mol, respectivamente. Logo, ainda que utilizando a mesma proporção em massa dos polissacarídeos (1:1) para a confecção dos dispositivos, há um maior número de moléculas de quitosana do que de alginato, com uma diferença aproximada de 7%. Segundo os dados obtidos, a diferença entre a quantidade dos grupamentos carboxílicos e aminas remanescentes para todas as amostras variaram em torno de 6,5 a 7%, o que concorda com a hipótese relacionada às massas molares.

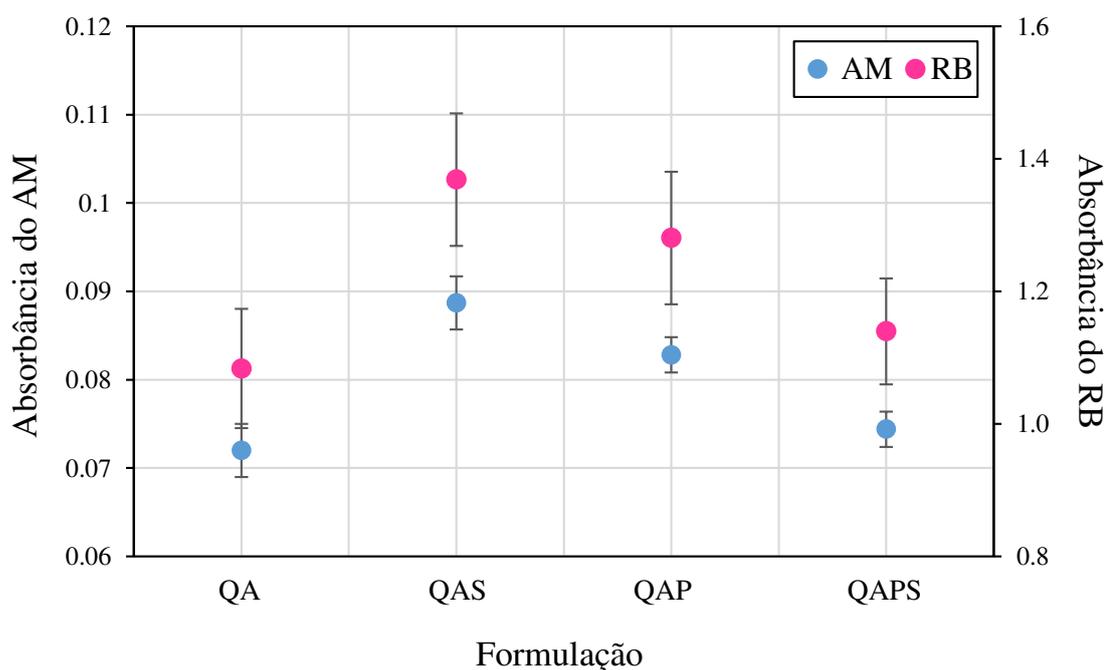
Figura 4.19 – Aspecto visual e morfológico das membranas de quitosana-alginato contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e/ou Kolliphor[®] P188, separadamente coradas ou não com rosa de bengala (RB) e azul de metileno (AM).



Como mencionado anteriormente, Pires e Moraes (2015) produziram membranas de quitosana-alginato contendo Silpuran[®] 2130 A/B e notaram diminuição significativa na espessura dos dispositivos quando na presença do agente siliconado. As autoras justificaram tal comportamento pela interação entre a platina contida no PDMS com os grupamentos amina da quitosana, auxiliando assim na compactação do material. No entanto, a análise de

detecção dos grupamentos funcionais remanescentes dos polissacarídeos realizada no presente trabalho mostrou que não há diminuição da quantidade de grupamentos amina livres quando na presença de Silpuran[®] 2130 A/B. Em contrapartida, observam-se maiores quantidades de tais grupos quando na presença de PDMS, com aumento expressivo de 26%.

Figura 4.20 – Valores de absorbância para as formulações coradas com azul de metileno (AM) e rosa de bengala (RB).



Desta forma, pode-se constatar que a diferença significativa encontrada por Pires e Moraes (2015) pode ser decorrente da maior temperatura de secagem do dispositivo (60 °C), a qual, devido à maior aproximação da temperatura de geleificação do agente siliconado (70 °C), auxiliou em maior proporção a compactação das cadeias de siloxano.

Em geral, a presença de Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) e Kolliphor[®] P188 (QAP) aumentam em média 25 e 17%, respectivamente, a proporção dos grupos funcionais disponíveis dos polissacarídeos. Possivelmente, a presença das cadeias do agente siliconado e do tensoativo entre as cadeias do PEC de quitosana-alginato bloqueiam estericamente as interações eletrostáticas. Nota-se, portanto, que a presença conjunta do gel de silicone e do surfactante (formulação QAPS) influencia na disponibilidade dos grupamentos remanescentes dos polissacarídeos, contudo, não contribui para a desestabilização estrutural do dispositivo.

Isto se deve à homogeneidade entre os polissacarídeos em suspensão com o agente siliconado através da orientação das cadeias do tensoativo na interface das duas fases imiscíveis.

4.2.6. Capacidade de absorção de fluidos fisiológicos pelas membranas

Na Tabela 4.11 são mostrados os dados obtidos para absorção de fluidos pelas membranas de quitosana e alginato de média viscosidade contendo ou não o agente siliconado e o porogênico após exposição a água, tampão fosfato salino (PBS) e solução salina (SS) por 24 horas.

Tabela 4.11 – Intumescimento das membranas preparadas pela complexação de quitosana e alginato de média viscosidade contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188.

Formulação	Absorção (g/g)		
	$S_{\text{Água}}$	S_{PBS}	S_{SS}
QA	4,95 ± 0,91 ^{aA}	16,66 ± 2,81 ^{aB}	13,97 ± 1,4 ^{aB}
QAS	1,66 ± 0,26 ^{aA}	15,46 ± 0,38 ^{aB}	13,06 ± 0,69 ^{aB}
QAP	22,31 ± 0,69 ^{bA}	27,26 ± 1,46 ^{bB}	29,81 ± 0,81 ^{bB}
QAPS	32,85 ± 3,69 ^{cA}	32,18 ± 0,78 ^{cA}	31,85 ± 0,98 ^{bA}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indicam que não há diferenças significativas entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

O intumescimento ou a capacidade de absorção das membranas densas (QA e QAS) variou de cerca de 2 a 5 g/g em água, 13 a 14 g/g em SS e 15 a 17 g/g em PBS. Apesar da menor tendência em absorver soluções pelas membranas de QAS, não foi verificada diferença significativa sobre os valores obtidos pelo teste de Tukey quando na presença de Silpuran[®] 2130 A/B.

Ao contrário do comportamento observado anteriormente para os dispositivos preparados com alginato de baixa viscosidade frente à exposição a PBS, os filmes preparados com alginato de média viscosidade permaneceram estáveis quando expostos a este fluido. Neste caso, possivelmente, a proporção de íons cálcio quelatados pelos íons fosfato foi menor pelo maior tamanho das cadeias de alginato, as quais apresentam mais disponibilidade de sítios para interação com o cálcio e também pontos de interação com o fluido (Bertran e Bondmeir, 2012). Os valores obtidos para absorção de PBS são similares aos encontrados por

Bueno *et al.* (2014), que alcançaram absorção por volta de 15 e 20 g/g para membranas densas e porosas, respectivamente.

Nota-se ainda que não houve diferenças estatísticas significativas para a absorção de PBS e SS pelas amostras. Como mencionado anteriormente, a presença de íons nas soluções pode desestabilizar as interações eletrostáticas entre os polissacarídeos e as dos íons cálcio com alginato, substituindo-os e, com isto, propiciando um aumento das interações polímero-água, conseqüentemente, elevando a capacidade da matriz polimérica de absorver fluidos (Mallepalli *et al.*, 2013).

Como esperado, os filmes porosos apresentaram maior absorção de fluidos quando comparado às membranas densas. No entanto, nota-se uma particularidade quanto à capacidade de absorção das formulações contendo o tensoativo e o agente siliconado em conjunto (QAPS), tendo-se em vista que tal filme absorveu as maiores quantidades de soluções, alcançando uma média de 32 gramas de fluidos por grama de polímero.

4.2.7. Perda de massa das membranas quando expostas a fluidos fisiológicos

Na Tabela 4.12 são mostrados os resultados para a perda de massa das distintas formulações após exposição por 7 dias em água, PBS e SS à temperatura de 37 °C.

Tabela 4.12 – Estabilidade das membranas preparadas pela complexação de quitosana e alginato de média viscosidade contendo ou não Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188.

Formulação	Perda de massa (%)		
	$L_{\text{Água}}$	L_{PBS}	L_{SS}
QA	6,69 ± 0,34 ^{aA}	11,93 ± 1,60 ^{aB}	11,71 ± 1,25 ^{aB}
QAS	2,50 ± 0,31 ^{bA}	8,52 ± 1,45 ^{bB}	4,62 ± 0,82 ^{bC}
QAP	12,27 ± 0,11 ^{cA}	15,96 ± 0,17 ^{cB}	14,65 ± 0,49 ^{cB}
QAPS	6,87 ± 0,63 ^{aB}	8,83 ± 0,55 ^{bA}	8,47 ± 0,58 ^{dA}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indicam que não há diferenças significativas entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Nota-se que, de modo geral, as formulações foram mais estáveis em água do que em PBS e SS, variando em torno de 2 e 13 % de perda de massa em água. Isto pode ser correlacionado aos resultados obtidos para absorção, tendo-se em vista que todas as amostras

intumesceram menos em água. Como mencionado anteriormente, quanto menor a capacidade de absorver um fluido, menor será o afastamento entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, menor será a solubilização do PEC (Bueno, 2010). Maior estabilidade em água foi também observada por Bierhalz e Moraes (2016) para as membranas produzidas com alginato de baixa viscosidade (Tabela 4.3).

As membranas densas contendo PDMS (QAS) foram consideradas as mais estáveis dentre todas as formulações, apresentando máxima perda de massa de 2, 5 e 8% em água, SS e PBS, respectivamente. Tal comportamento era já esperado devido à maior hidrofobicidade que a presença do gel de silicone propicia à matriz polimérica. Nesta mesma perspectiva, observa-se que a presença de Silpuran[®] 2130 A/B exerce o mesmo efeito quando na presença conjunta com Kolliphor[®] P188 (QAPS), constatando-se valores menores de perda de massa quando se compara à formulação preparada somente com o tensoativo (QAP). Nota-se, que a formulação QAPS apresenta os maiores valores de absorção para todos os fluidos testados. Neste caso, possivelmente, a maior absorção não se deve somente à melhora na homogeneidade da mistura, mas também à maior flexibilidade das cadeias poliméricas. Desta forma, a presença do agente siliconado contribui positivamente para o aumento da estabilidade do material que, mesmo com a homogeneização pela presença de Kolliphor[®] P188, ainda apresenta efeito hidrofóbico no dispositivo.

Os dados de perda de massa das membranas produzidas com alginato de média viscosidade obtidos no presente trabalho mostraram maiores estabilidades das formulações frente aos valores obtidos na literatura, tanto para as membranas densas que apresentam perda de massa entre 9 e 21% (Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015) quanto para as formulações porosas que variam em torno de 20 e 30% (Bueno *et al.*, 2014; Bierhalz e Moraes, 2016). Tal diferença pode ser decorrente das modificações do processamento e das matérias-primas. Bueno *et al.* (2014) produziram membranas densas e porosas de quitosana-alginato, no entanto, a etapa de ajuste de pH e secagem (temperatura) foram distintas das utilizadas no presente trabalho, tendo-se em vista que no referido trabalho as membranas apresentavam pH em torno de 5,3 e foram secas a 60 °C. Além do mais, os lotes das matérias-primas, como alginato e o tensoativo, não foram similares. Bierhalz e Moraes (2016) produziram formulações densas e porosas utilizando os mesmos lotes de polímeros, no entanto, a neutralização dos dispositivos foi realizada com concentração de NaOH de 1M, o que levou a um maior volume de tal solução no complexo polimérico. Assim,

apesar dos dados apresentarem valores próximos, modificações tanto no processamento quanto nos reagentes utilizados podem exercer influência nas propriedades do material.

Como conclusão dos dois últimos tópicos (itens 4.2.6 e 4.2.7), pode-se assumir que as membranas de QA e QAS são adequadas para aplicações em feridas de moderada exsudação. Já as formulações porosas (QAP e QAPS) seriam mais propícias para aplicação em lesões altamente exsudativas. Todos os dispositivos desenvolvidos apresentaram alta estabilidade com, no máximo, 15% de perda de massa após 7 dias de exposição aos fluidos. Logo, os mesmos podem ser utilizados por esse período sem a necessidade de remoção. Além do mais, devido à alta porosidade resultante da introdução do tensoativo na formulação, tais dispositivos podem auxiliar no crescimento celular, atuando assim como *scaffolds*.

4.2.8. Sorção de vapor d'água

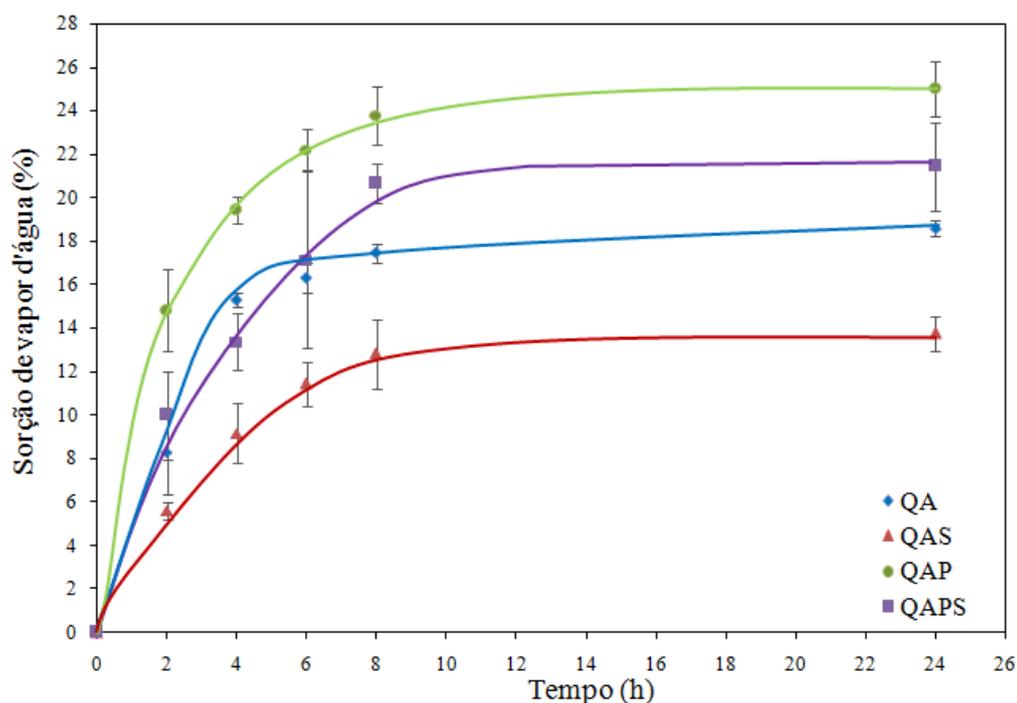
Na Figura 4.21 são mostradas as cinéticas de sorção de vapor d'água das membranas produzidas com alginato de média viscosidade (QA), na presença de Kolliphor[®] P188 (QAP), do agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) ou de ambos (QAPS). Todas as formulações apresentaram equilíbrio em torno de 8 horas, com exceção da membrana de QA que alcançou o equilíbrio a partir de 4 horas de ensaio. Logo, a presença do tensoativo e do agente siliconado, separadamente ou em conjunto, alterou o comportamento cinético de tal propriedade, possivelmente devido à presença de maior massa polimérica total no dispositivo por cm².

Nota-se que as membranas porosas apresentaram maiores taxas de sorção de vapor d'água, alcançando cerca de 25% e 21% para QAP e QAPS, respectivamente. Os maiores valores de sorção de água para membranas porosas também foram observados por Bueno *et al.* (2016) que produziram filmes com diferentes proporções de tensoativo (2 e 10% com relação a massa de polissacarídeo) e notaram que quanto maior a porosidade, ou seja, quanto maior a proporção de surfactante utilizada durante a preparação da membrana, maior a taxa de sorção de vapor d'água. Os autores atribuíram tal comportamento ao maior espaço disponível para acomodação das moléculas de água.

Já as membranas densas apresentaram valores inferiores às porosas, porém os dados obtidos corroboram os reportados na literatura para membranas densas de quitosana-alginato, em torno de 15,5% (Bueno *et al.*, 2016), e também para os valores obtidos para as formulações produzidas com alginato de baixa viscosidade (Tabela 4.6), as quais

apresentaram uma média de 16%, tanto na presença quanto na ausência do agente siliconado. Além do mais, é possível notar que a presença do agente siliconado (QAS), neste caso, influenciou na sorção de vapor d'água com uma diminuição de 26% quando comparada à formulação densa preparada na ausência de Silpuran[®] 2130 A/B (QA). Esta diminuição na capacidade de sorver vapor de água deve-se à hidrofobicidade do agente siliconado, fato este já discutido anteriormente.

Figura 4.21 – Cinética de sorção de vapor d'água das membranas de quitosana e alginato (QA) contendo o tensoativo Kolliphor[®] P188 (QAP), o agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B (QAS) ou ambos (QASP).



4.2.9. Propriedades mecânicas

Na Tabela 4.13 são mostrados os valores de tensão na ruptura, alongamento na ruptura e módulo de Young das membranas preparadas com alginato de média viscosidade, na ausência ou presença de tensoativo (QAP), agente siliconado (QAS) ou ambos em conjunto (QAPS).

Os dados de tensão na ruptura mostram que as formulações produzidas com alginato de média viscosidade apresentaram uma melhora significativa quando comparadas aos dispositivos desenvolvidos com alginato de baixa viscosidade (Tabela 4.5), notando-se um

aumento de 89% para membranas de QA e de 73% para as de QAS. Nesta mesma perspectiva, Bierhalz e Moraes (2016) compararam membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade e de média viscosidade, com diferentes razões mássicas dos polissacarídeos, e notaram aumento significativo de 45% para as formulações de maior viscosidade.

Tabela 4.13 – Propriedades mecânicas das membranas preparadas pela complexação de quitosana e alginato de média viscosidade na presença ou não de Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188.

<i>Formulação</i>	<i>Tensão na ruptura (MPa)</i>	<i>Alongamento na ruptura (%)</i>	<i>Módulo de Young (MPa)</i>
QA	30,30 ± 2,16 ^a	2,83 ± 0,81 ^a	22,68 ± 2,92 ^a
QAS	45,73 ± 3,47 ^b	4,65 ± 1,03 ^b	16,76 ± 1,62 ^b
QAP	3,88 ± 0,59 ^c	2,15 ± 0,28 ^a	1,52 ± 0,30 ^c
QAPS	10,73 ± 0,76 ^d	2,41 ± 0,55 ^a	0,60 ± 0,09 ^d

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Como esperado, as formulações porosas apresentaram estrutura mais frágil e, conseqüentemente, tensão na ruptura inferior às densas. Tal comportamento foi também relatado por Bierhalz e Moraes (2016) e Bueno *et al.* (2014) para membranas de quitosana-alginato e por Bellini *et al.* (2012) para membranas de quitosana-xantana. No entanto, observa-se que a presença do agente siliconado aumentou em 64% tal propriedade, o que contribui positivamente para as formulações. Desta forma, os valores obtidos para as membranas de QA, QAS e QAPS estão dentro dos requisitos básicos para utilização como curativos para lesões de pele, tendo-se em vista que são compatíveis com a tensão deste tecido, que varia de cerca de 5 a 30 MPa (Evans *et al.*, 2013).

Tendo-se em vista que o alongamento na ruptura da pele sadia varia em torno de 35 a 115% (Khan e Ahmad, 2013), os dispositivos produzidos no presente trabalho não apresentaram valores adequados para esta propriedade quando secas. Os dados obtidos corroboram os relatados na literatura para membranas de quitosana e alginato (Yan *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015; Bierhalz e Moraes, 2016). Desta forma, não se recomenda a aplicação de membranas

secas em feridas localizadas em regiões altamente articuladas.

Nota-se que a presença do agente siliconado diminuiu o módulo de Young das formulações, confirmando que o PDMS auxilia positivamente na melhora da flexibilidade das membranas de quitosana-alginato. Como mencionado anteriormente, o módulo elástico (módulo de Young) da pele pode variar entre 0,02 e 57 MPa. Logo, todas as formulações desenvolvidas apresentam valores dentro da faixa requerida em condições de umidade em equilíbrio com a do ambiente (40%).

Na Tabela 4.14 mostra-se, de forma sumarizada, as características mais relevantes das membranas produzidas com alginato de baixa e média viscosidade desenvolvidas no presente trabalho.

Tabela 4.14 - Comparação das características das membranas de quitosana e alginato de baixa (BV) e média viscosidade (MV) produzidas neste trabalho contendo ou não 0,10 g do agente siliconado Silpuran[®] 2130 A/B e 0,10 g tensoativo Kolliphor[®] P188 por grama de polissacarídeos.

Características	Alginato BV			Alginato MV			
	QA	QAS	QAP	QA	QAS	QAP	QAPS
Aspecto da matriz	denso	denso	denso	denso	denso	poroso	poroso
Espessura (mm)	0,11	0,16	NR	0,046	0,074	0,472	0,488
Absorção de PBS (g/g) - 24 horas	NR	NR	NR	16,66	15,46	27,26	32,18
Perda de massa (%)	NR	NR	NR	11,93	5,52	15,96	8,83
Sorção de vapor d'água (%)	14,60	17,15	NR	18,58	13,75	24,99	21,43
Tensão na ruptura (MPa)	3,41	12,13	NR	30,30	45,73	3,88	10,73
Propriedades mecânicas							
Alongamento na ruptura (%)	5,94	4,73	NR	2,83	4,65	2,15	2,41
Módulo de Young (MPa)	2,43	1,81	NR	22,68	16,76	1,52	0,60

NR: ensaio não realizado

Os dispositivos apresentaram propriedades promissoras para uso como curativos, sendo as formulações produzidas com alginato de média viscosidade as que exibiram os melhores resultados quanto à capacidade de absorção, estabilidade e propriedades mecânicas. Uma possível alternativa para a aplicação destas membranas seria no campo odontológico como, por exemplo, barreira de regeneração de tecidos gengivais, mucosas e mesmo de tecidos duros, devido à capacidade de absorver fluidos e à degradabilidade previsível dos materiais, características estas primordiais na confecção de biomembranas odontológicas (Song *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2016). Contudo, estudos detalhados sobre a capacidade destas membranas flexíveis, densas e porosas de auxiliarem na reparação tecidual, como na promoção de regeneração óssea de forma previsível, são necessários para se analisar a factibilidade de tal aplicação (Costa *et al.*, 2016).

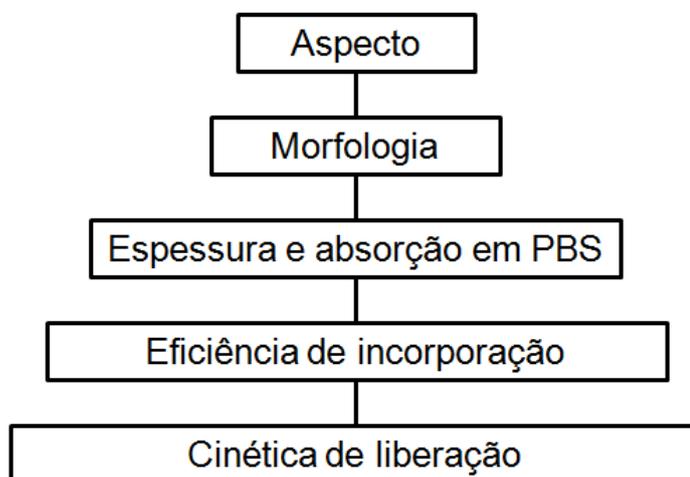
Uma vez que os valores obtidos de praticamente todas as caracterizações das membranas produzidas com alginato de média viscosidade foram satisfatórios do ponto de vista de aplicação como curativos, foi incorporado às membranas flexíveis, densas e porosas, o extrato padronizado da planta *Arrabidaea chica* Verlot. Adicionalmente, uma alteração foi realizada durante o processamento dos materiais a partir deste ponto. Uma vez que após a etapa de secagem as formulações apresentavam odor de ácido acético, mesmo após a neutralização, a proporção de ácido acético na solução de quitosana foi diminuída para 1% (v/v).

4.2.10. Efeito da adição de diferentes concentrações do extrato de Arrabidaea chica Verlot nas características das membranas de quitosana-alginato

Neste tópico são apresentados os resultados referentes às características das membranas preparadas com alginato de média viscosidade (além dos outros polímeros) contendo o extrato padronizado da planta *Arrabidaea chica* Verlot. Tendo-se em vista que não há relatos na literatura sobre a incorporação deste extrato em membranas poliméricas, pretendeu-se analisar, inicialmente, o efeito da adição de diferentes proporções (33,3, 66,7, 100,0 e 133,3 mg de extrato por grama de quitosana-alginato) de extrato de *A. chica* nas características das matrizes de quitosana-alginato (QA). O extrato dissolvido em 1 mL de etanol foi diretamente adicionado à mistura de polímeros na fase de produção das membranas. As amostras foram caracterizadas de acordo com o diagrama mostrado na Figura 4.22.

Após a análise dos dados, a proporção que apresentou o melhor desempenho quanto à quantidade liberada em solução foi selecionada para incorporação nas demais formulações (QAS, QAP e QAPS) pelo mesmo método, a fim de avaliar as características de liberação das distintas matrizes, assim como a influência do agente siliconado e do tensoativo separadamente e em conjunto na cinética de liberação. Para tal, monitorou-se a concentração das antocianinas totais, que absorvem luz a 470 nm.

Figura 4.22 – Diagrama das caracterizações das membranas de quitosana e alginato contendo diferentes concentrações do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.



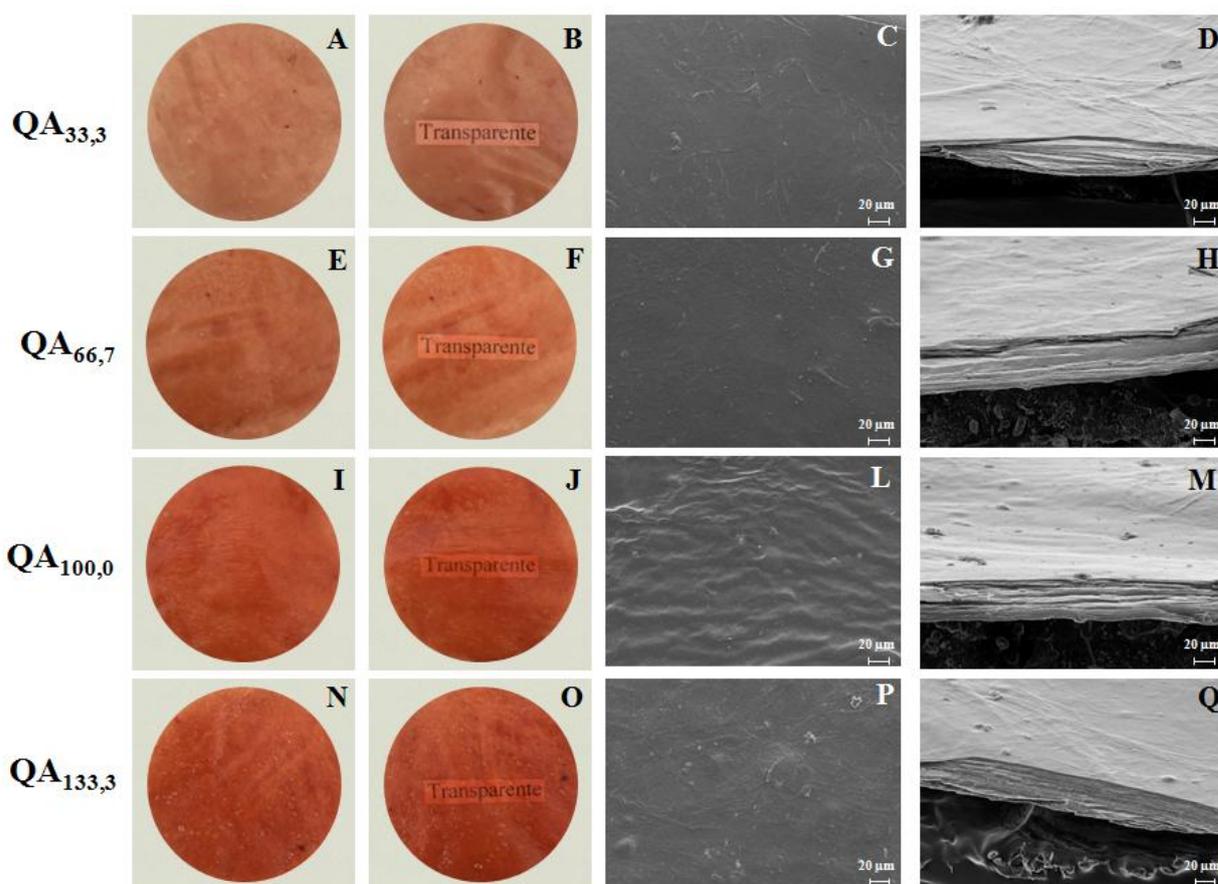
4.2.10.1. Aspecto das membranas de quitosana-alginato contendo distintas concentrações do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot

Na Figura 4.23 são mostrados os aspectos visuais e morfológicos das membranas de quitosana-alginato produzidas na presença do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot nas proporções de 33,3, 66,7, 100,0 e 133,3 mg de extrato por g dos polissacarídeos Q e A . As amostras foram denominadas como QA_{33,3}, QA_{66,7}, QA_{100,0} e QA_{133,3}.

O extrato de *A. chica* é fonte de antocianinas (pigmentos) denominadas carajurina e carajurona. Estes pigmentos insolúveis apresentam coloração vermelho-escuro ou vermelho-tijolo (Aro *et al.*, 2013; Medina, 2014). Desta forma, pode-se observar que as membranas contendo o extrato apresentaram tal coloração que tende ao vermelho. Nota-se ainda que, visualmente, ao aumentar a concentração do composto, a cor avermelhada se intensifica gradualmente. Adicionalmente, apesar da transparência dos materiais ser afetada com o

aumento da concentração do composto bioativo, ainda é possível considerar que todos os dispositivos apresentaram transparência suficiente para permitir inspecionar a ferida a ser tratada sem a remoção do curativo.

Figura 4.23 – Aspecto visual e morfológico das membranas de quitosana-alginato produzidas na presença do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot nas proporções 33,3, 66,7, 100,0 e 133,3 mg/g.



As morfologias de superfície e seção transversal das amostras mostram que a presença de *A. chica* não exerceu alterações significativas na estrutura das membranas, que permaneceram com aspecto homogêneo e estrutura lamelar. Além do mais, nota-se que o extrato ficou adequadamente disperso em forma solúvel na matriz polimérica, tendo-se em vista que não foi possível visualizar agregados do extrato nas membranas. Uma vez que o extrato padronizado de *A. chica* é praticamente insolúvel em água, esta homogeneidade em sua distribuição se deve à boa dissolução do composto em etanol anteriormente à sua adição ao complexo polimérico e potencialmente a sua interação com componentes na matriz.

4.2.10.2. *Espessura e capacidade de absorção em PBS das membranas de quitosana-alginato contendo distintas concentrações do extrato de Arrabidaea chica Verlot*

Na Tabela 4.15 são mostrados os valores obtidos para espessura e absorção em PBS das membranas de quitosana-alginato (QA) contendo distintas formulações do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

Tabela 4.15 – Espessura e absorção das membranas de quitosana-alginato contendo o extrato diferentes proporções do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

<i>Formulação</i>	<i>Espessura de amostras secas (mm)</i>	<i>Capacidade de absorção (g/g)</i>
QA _{33,3}	0,059 ± 0,004 ^a	21,32 ± 0,24 ^a
QA _{66,7}	0,060 ± 0,005 ^a	21,68 ± 0,11 ^a
QA _{100,0}	0,061 ± 0,006 ^a	21,99 ± 0,12 ^a
QA _{133,3}	0,080 ± 0,006 ^b	28,82 ± 0,18 ^b

Mesma letra na mesma colina indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

As membranas apresentaram espessuras entre 0,06 e 0,08 mm, sendo a única diferença estatística encontrada para a formulação preparada na presença da maior quantidade de *A. chica* (QA_{133,3}). Apesar da homogênea distribuição do composto pela matriz de quitosana-alginato, nota-se um aumento na espessura em torno de 70% para a formulação de 133,3 mg/g de *A. chica* quando comparada às outras (Tabela 4.10). Desta forma, apesar da prévia dissolução do composto, a presença do extrato exerceu influência nesta propriedade devido ao maior aumento percentual da massa contida no dispositivo, tendo-se aumento de 3,23; 6,25; 9,09 e 11,76% para as proporções de 33,3, 66,6 e 100,0 e 133,3 mg/g de *A. chica*, consequentemente.

Os valores de absorção em PBS, também mostrados na Tabela 4.15, indicam o mesmo comportamento estatístico observado para os dados de espessura, em que a diferença significativa encontrada foi para a formulação de QA_{133,3}. Em geral, as membranas preparadas na presença de distintas concentrações de extrato apresentaram absorção em torno de 21 e 29 gramas de PBS por grama de polímero. Os resultados obtidos são superiores aos apresentados na Tabela 4.11 para a formulação de QA, a qual alcançou absorção máxima nesse fluido de 17 g/g. Como já mencionado anteriormente, geralmente, as quantidades de

fluidos absorvidos pelas membranas podem ser diretamente relacionadas à espessura, tendo-se em vista que quanto maior a espessura maior será a capacidade do material em absorver as soluções em que foram expostos, em decorrência do maior afastamento das lamelas e da própria presença de outros compostos adicionados à formulação das membranas que sejam capazes de se associar à solução.

4.2.10.3. Eficiência de incorporação de distintas concentrações do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot nas membranas de quitosana-alginato

Na Tabela 4.16 são mostrados os valores de eficiência de incorporação de extrato adicionado à mistura das membranas nas proporções de 33,3, 66,6 e 100,0% e 133,3 mg/g, avaliados considerando as antocianinas totais como compostos de referência (repórteres) no extrato, devido à sua elevada absorção de luz a 470 nm. A eficiência de incorporação foi, portanto, calculada através das medidas de absorbância a 470 nm das soluções de lavagem das membranas como explicado no item 3.2.16.

Tabela 4.16 – Eficiência de incorporação das distintas proporções do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot incorporado nas membranas de quitosana-alginato.

Formulação	Massa de extrato adicionado por membrana (mg)	Massa de extrato incorporado por membrana (mg)	Eficiência de incorporação (%)
QA _{33,3}	30	24,13 ± 0,05 ^a	80,43 ± 0,16 ^a
QA _{66,7}	60	50,16 ± 1,34 ^b	83,61 ± 2,24 ^b
QA _{100,0}	90	78,97 ± 1,40 ^c	87,74 ± 1,55 ^c
QA _{133,3}	120	105,21 ± 1,36 ^d	87,67 ± 1,13 ^c

Mesma letra na mesma colina indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Em geral, os valores de eficiência de incorporação do extrato foram altos, variando de cerca de 80 a 88%, sendo as proporções de 100,0 e 133,3 mg/g as que apresentaram os maiores valores.

A análise estatística pelo teste de Tukey sugere que há uma tendência no aumento da massa do extrato incorporado com o aumento da massa do composto adicionado. No entanto,

as formulações com proporção inicial de 100,0 e 133,3 mg/g de *A. chica* não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à eficiência de incorporação. Tendo-se em vista que a planta *Arrabidaea* é rica em taninos, os quais são compostos fenólicos que possuem a capacidade de se ligarem fortemente a outras moléculas, pode-se supor que houve uma interação, possivelmente por pontes de hidrogênio, entre os taninos e os polissacarídeos da membrana. Além do mais, as moléculas de carajurina e carajurona apresentam potencial para realizar ligações de hidrogênio, uma vez que apresentam 6 e 7 regiões para este tipo de interação, respectivamente (PubChem, 2017). Desta forma, tais características de possíveis interações podem auxiliar fortemente na retenção dos componentes do extrato na matriz polimérica, sendo que para proporções próximas a 100,0 mg/g de extrato pode ter ocorrido saturação do sistema.

4.2.10.4. Cinética de liberação das distintas concentrações do extrato de Arrabidaea chica Verlot nas membranas de quitosana-alginato

A fim de verificar se as membranas de quitosana-alginato (QA) produzidas contendo distintas concentrações do extrato padronizado de *A. chica* são capazes de liberar seus componentes para uso tópico, foi realizado o estudo da cinética de liberação do extrato em meio que simula o ambiente fisiológico (PBS). Tendo-se em vista que o extrato é praticamente insolúvel em água, foi adicionado ao meio de liberação 20% (v/v) de etanol. O extrato córneo é uma estrutura semipermeável que permite a passagem seletiva de diferentes compostos. Uma vez que apresenta alto teor lipídico no espaço intercelular, o extrato córneo exibe também caráter hidrofóbico. Da mesma forma, as matrizes lipídicas estão presentes ao redor das células como, por exemplo, em forma de uma matriz circundante e na membrana celular. Desta forma, quando um fármaco hidrofóbico é administrado topicamente, a sua difusão para a rede sanguínea se deve à sua partição entre as partes hidrofóbicas do tecido (Klaassen e Watkins, 2012). Contudo, este processo acontece por etapas, sendo que o composto bioativo precisa, primeiramente, atravessar o extrato córneo, seguido da difusão através dos lipídios que circundam as células e, posteriormente, da membrana celular. Neste sentido, a adição de etanol ao meio de liberação é uma alternativa que pode simular tais frações hidrofóbicas contidas no tecido.

Na Figura 4.24 são mostrados os resultados da cinética de liberação do extrato padronizado de *A. chica* (expressos com base na medida das antocianinas totais) a partir das membranas de QA. Na Tabela 4.17 estão indicadas as concentrações finais atingidas no

equilíbrio para cada formulação testada, assim como as porcentagens de extrato liberado após 8 e 48 h de ensaio.

Figura 4.24 – Cinética de liberação das membranas de quitosana-alginato preparadas nas proporções de 33,3, 66,7, 100,0 e 133,3 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot nas membranas. Resultados expressos em microgramas de agente ativo por miligrama de polissacarídeos (A) e em microgramas de agente ativo por mililitro de solução receptora (B).

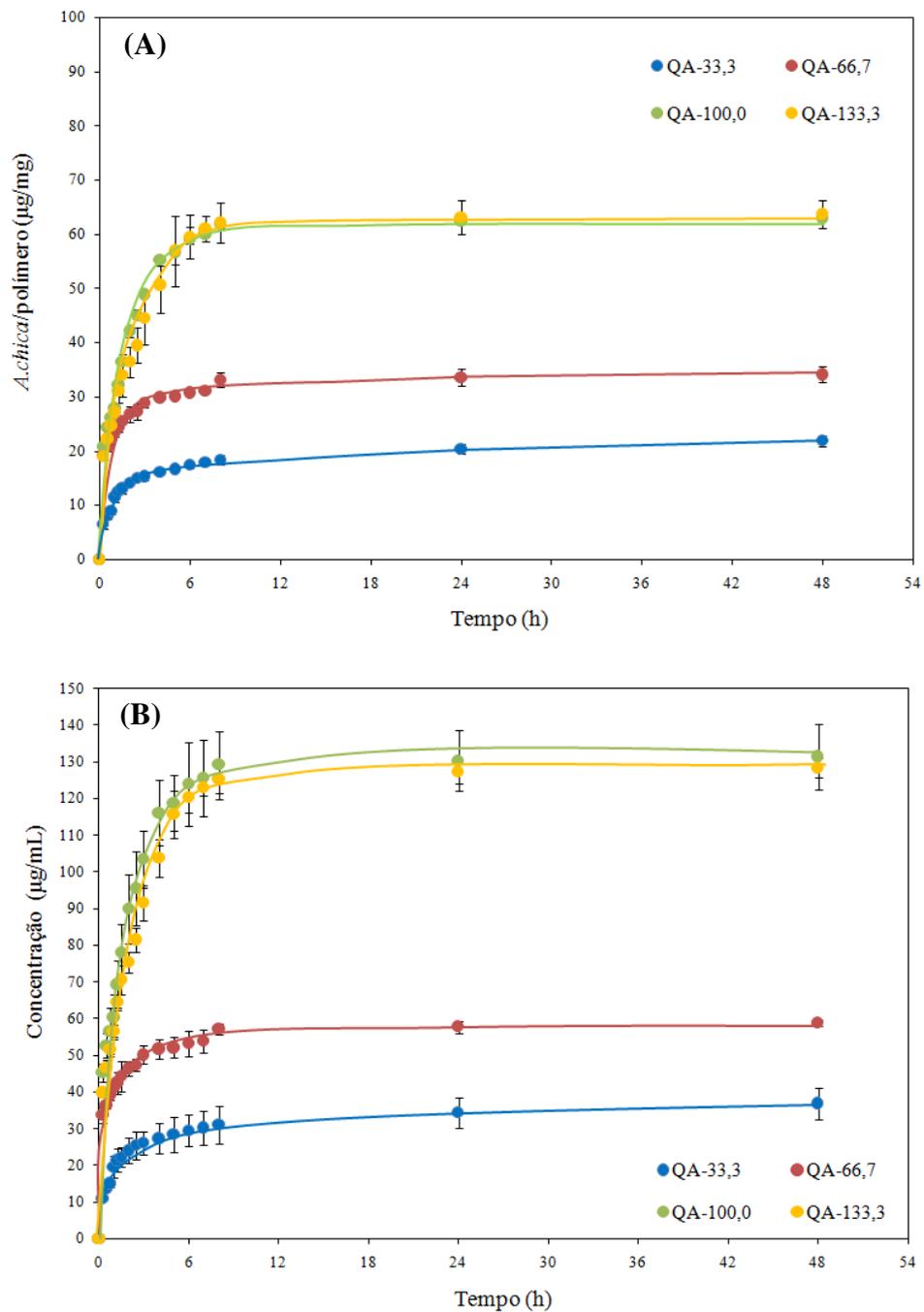


Tabela 4.17 – Fração do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot liberado pelas membranas após 8 e 24 horas de ensaio e tempos aproximados para se atingir o platô de equilíbrio na liberação.

Formulação	Tempo para atingir o equilíbrio (h)	Fração do extrato liberado (%) em 8 h	Fração do extrato liberado (%) em 48 h
QA _{33,3}	4	1,83 ± 0,18 ^{aA}	2,18 ± 0,09 ^{aB}
QA _{66,7}	4	3,57 ± 0,00 ^{bA}	3,40 ± 0,24 ^{bA}
QA _{100,0}	8	6,18 ± 0,29 ^{cA}	6,29 ± 0,25 ^{cA}
QA _{133,3}	8	5,76 ± 0,38 ^{cA}	5,87 ± 0,26 ^{cA}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Observa-se que para as concentrações de 33,3 e 66,7 mg/g o equilíbrio foi atingido já nas primeiras horas de ensaio (4 horas). Já para as amostras contendo 100,0 e 133,3 mg/g de extrato, o equilíbrio foi alcançado praticamente após 8 horas de ensaio. Nota-se uma tendência de aumento na fração de extrato liberado com o aumento da concentração do extrato de *A. chica*, observando-se que as formulações contendo 100,0 e 133,3 mg/g do composto não apresentaram diferenças significativas entre si, alcançando em torno de 6% de eficiência de liberação.

De acordo com Bueno (2015), o fato de uma matriz polimérica não liberar a totalidade do composto bioativo incorporado pode ser uma alternativa atraente. Tendo-se em vista que parte do extrato ficou retido na matriz de QA, o mesmo pode agir também como reservatório do agente bioativo durante o contato com a ferida.

Nota-se que as formulações preparadas nas duas menores razões mássicas extrato/polissacarídeo atingem muito rapidamente o equilíbrio, além de disponibilizarem menor quantidade de ativos em solução. O desempenho das formulações preparadas nas razões mássicas mais elevadas, por outro lado, é aproximadamente igual, tanto em termos do tempo de liberação contínua quanto das concentrações de extrato atingidas na solução receptora. A formulação QA_{100,0} mostra-se como potencialmente a mais atrativa dentre as testadas, pois envolve menor dispêndio de extrato por quilograma de polissacarídeo para levar aos mesmos resultados favoráveis que a formulação QA_{133,3}. Entretanto, esta conclusão parcial deve ser também analisada frente à concentração desejável de agente ativo liberado na lesão, concentração esta que resulte no fechamento da lesão e que não seja irritante ou citotóxica ao paciente.

Não há relatos na literatura sobre a efetividade de liberação do extrato padronizado de *A. chica* incorporado em membranas poliméricas. Há, no entanto, dados de veiculação do extrato na forma de solução (Jorge *et al.*, 2008), de creme (Sousa, 2013; Sá *et al.*, 2016) ou incorporada a nanopartículas (Medina *et al.*, 2015) que podem ser avaliados visando ao estabelecimento das metas terapêuticas de disponibilização do extrato em lesões de pele em condições seguras no que se refere à citotoxicidade.

Jorge *et al.* (2008), por exemplo, avaliaram as propriedades cicatrizantes do extrato de *A. chica* em aplicações tópicas em ratos Wistar na concentração de 100 mg/mL (200 µL/ferida/dia) e, através da análise por determinação de colágeno, notaram que o tratamento reduziu em 96% a ferida que compreendia uma área de 1,5 cm², enquanto o controle (solução salina) reduziu apenas 36%.

Nessa mesma perspectiva, Sousa (2013) preparou cremes contendo ou não 2,5% (m/m) do extrato na sua forma livre e microencapsulada em diferentes matrizes poliméricas (goma guar, goma de cajueiro e mistura de goma guar com maltodextrina) e os aplicou em úlceras de ratos Wistar. A autora notou que para todas as formulações a contração da ferida foi significativamente maior quando na presença do composto bioativo, alcançando cerca de 70 e 80% na cicatrização, enquanto o grupo controle apresentou 37% no fechamento das úlceras, após 10 dias de tratamento.

Medina e colaboradores (2015) produziram nanopartículas de quitosana contendo 10, 15 e 25% do extrato de *A. chica* com relação à massa de quitosana e analisaram a viabilidade celular após exposição por 24, 48 e 72 horas às nanopartículas contendo ou não o extrato e também ao extrato isolado. Os autores observaram que a viabilidade máxima das células (100%), quando em contato com o extrato isolado, foi na concentração de 125 µg/mL, no entanto, a viabilidade decresce após esta concentração. Quando o extrato foi incorporado nas nanopartículas de quitosana, a máxima viabilidade celular foi alcançada, quando comparado ao controle, em concentrações de até 500 µg/mL, o que indica efeito protetor das células da ação direta do extrato pela matriz de quitosana das nanopartículas.

Sá *et al.* (2016), investigaram o efeito cicatrizante do extrato de *A. chica* veiculado em um creme de base aquosa na cicatrização de lesões em ratos Webster por 21 dias. Os autores notaram que a cicatrização foi mais acelerada na fase inicial do tratamento, não sendo observadas respostas significativas ao final dos 21 dias. Além do mais, análises de citotoxicidade mostraram que na concentração acumulada de 190 µg/mL de extrato, houve efeito citotóxico a macrófagos. Segundo os autores, muitos fatores externos podem influenciar

o processo de cicatrização, como as infecções, as técnicas cirúrgicas, má nutrição ou deficiência de vitaminas dos pacientes e também a ausência de curativos. Tendo-se em vista que os autores não utilizaram nenhuma proteção na área da lesão, os mesmos alegaram que, possivelmente, a falta de uma camada protetora, como o curativo, pode ter influenciado no retardamento da cicatrização após os 21 dias de tratamento, salientando assim a importância de estudos adicionais sobre a ação do extrato de *A. chica*.

Observa-se, portanto, que as concentrações de extrato de *A. chica* que menos comprometeram a viabilidade celular foram as apresentadas por Sá *et al.* (2016) e Medina *et al.* (2015) na forma livre e encapsulada do agente bioativo, de 125-200 e 500 µg/mL, respectivamente, determinadas pelo método de MTT. No presente trabalho, uma ampla gama de concentrações de extrato liberado no meio PBS contendo 20% de etanol após 8, 24 e 48 horas foi observada, de forma dependente da razão inicial extrato/polissacarídeo, conforme apresentado na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Concentrações máximas do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot liberado após 8, 24 e 48 horas em contato com o meio PBS contendo 20% (v/v) de etanol.

Formulação	Concentração no tempo de 8 h (µg/mL)	Concentração no tempo de 24 h (µg/mL)	Concentração no tempo de 48h (µg/mL)
QA _{33,3}	31,10 ± 5,16 ^{aA}	34,40 ± 4,07 ^{aA}	36,85 ± 4,31 ^{aA}
QA _{66,7}	57,11 ± 1,53 ^{bA}	57,77 ± 1,66 ^{bA}	58,80 ± 0,94 ^{bA}
QA _{100,0}	129,17 ± 9,27 ^{cA}	130,32 ± 8,33 ^{cA}	131,46 ± 8,87 ^{cA}
QA _{133,3}	125,28 ± 28,18 ^{cA}	127,24 ± 29,73 ^{cA}	128,29 ± 29,56 ^{cA}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Constata-se que quanto maior a concentração de *A. chica* nas amostras de QA, maior é a quantidade de extrato liberado, observando-se que não há diferenças significativas na liberação entre 8 e 48 h para cada tipo de formulação, o que já era esperado devido ao formato assintótico das curvas de liberação após seus respectivos períodos de equilíbrio.

Nota-se que todos os valores obtidos foram inferiores a 200 µg/mL, concentração esta considerada citotóxica quando em solução. Ainda, é possível observar que os maiores valores liberados de extrato foram referentes às formulações preparadas com 100,0 e 133,3 mg/g do

extrato, as quais liberaram entre 125 e 131 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, segundo o teste de Tukey não há diferenças significativas entre os valores liberados de tais formulações. Adicionalmente, análises de viabilidade celular realizadas por Medina *et al.* (2015) mostraram que mesmo em baixas concentrações, em sua forma livre ou encapsulada, o extrato mantém a viabilidade celular máxima (100%), uma vez que a concentração mínima testada foi de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando-se os resultados obtidos para as formulações de QA contendo distintas concentrações de *A. chica*, as amostras que apresentaram os melhores desempenhos quanto à eficiência de incorporação e liberação foram as contendo as maiores proporções iniciais (100,0 e 133,3 mg/g) do extrato. Uma vez que os dados entre essas amostras não são estatisticamente diferentes entre si, a formulação contendo 100,0 mg/g do composto bioativo foi a selecionada para a continuidade do trabalho. Esta condição de preparação mostra-se mais competitiva do ponto de vista econômico considerando-se que, com menor massa inicial de extrato adicionado, se atinge aproximadamente o mesmo desempenho em termos de concentração final de agente bioativo liberado na solução,

4.2.11. Efeito da adição de 100,0 mg/g do extrato de Arrabidaea chica Verlot nas características das membranas de quitosana-alginato

Tendo-se em vista que não houve diferenças significativas entre as maiores concentrações testadas do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot a partir das análises realizadas, neste tópico foi utilizada a proporção de 100,0 mg/g de extrato de *A. chica* para a incorporação nas membranas flexíveis densas e porosas de quitosana-alginato. Tais formulações foram caracterizadas como mostrado na Figura 4.25.

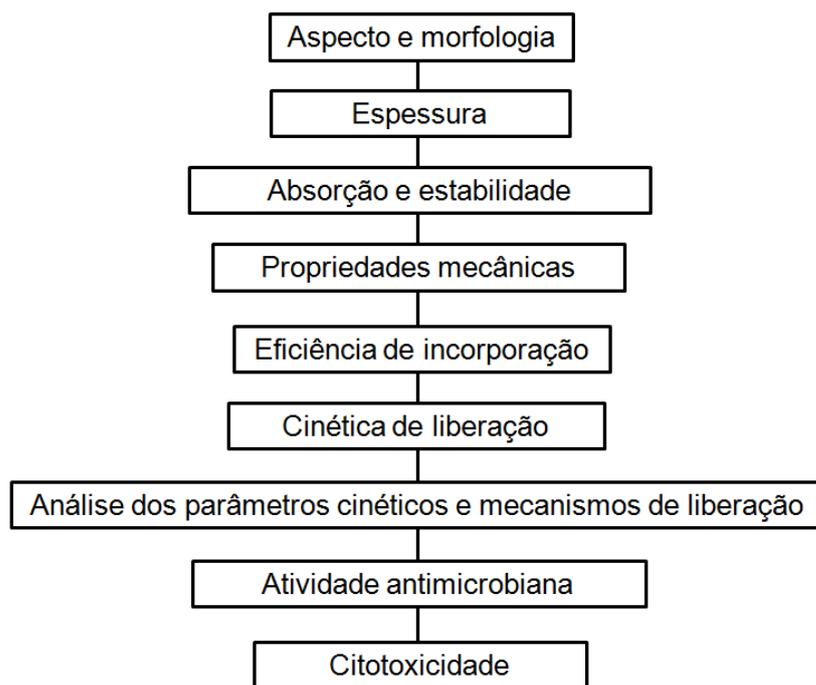
4.2.11.1. Aspecto das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de Arrabidaea chica Verlot

Na Figura 4.26 são mostrados os aspectos visuais e morfológicos das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana e alginato contendo 100,0 mg/g do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot.

Como esperado, todas as formulações exibiram coloração vermelho escuro ou vermelho-tijolo. As formulações densas (QA_{100,0} e QAS_{100,0}) não apresentaram diferenças quanto à homogeneidade e transparência dos filmes. Em contrapartida, as membranas de

QAP_{100,0} e QAPS_{100,0} mostraram-se mais opacas, o que se deve à presença dos poros resultantes da adição do tensoativo, influenciando na transparência dos dispositivos.

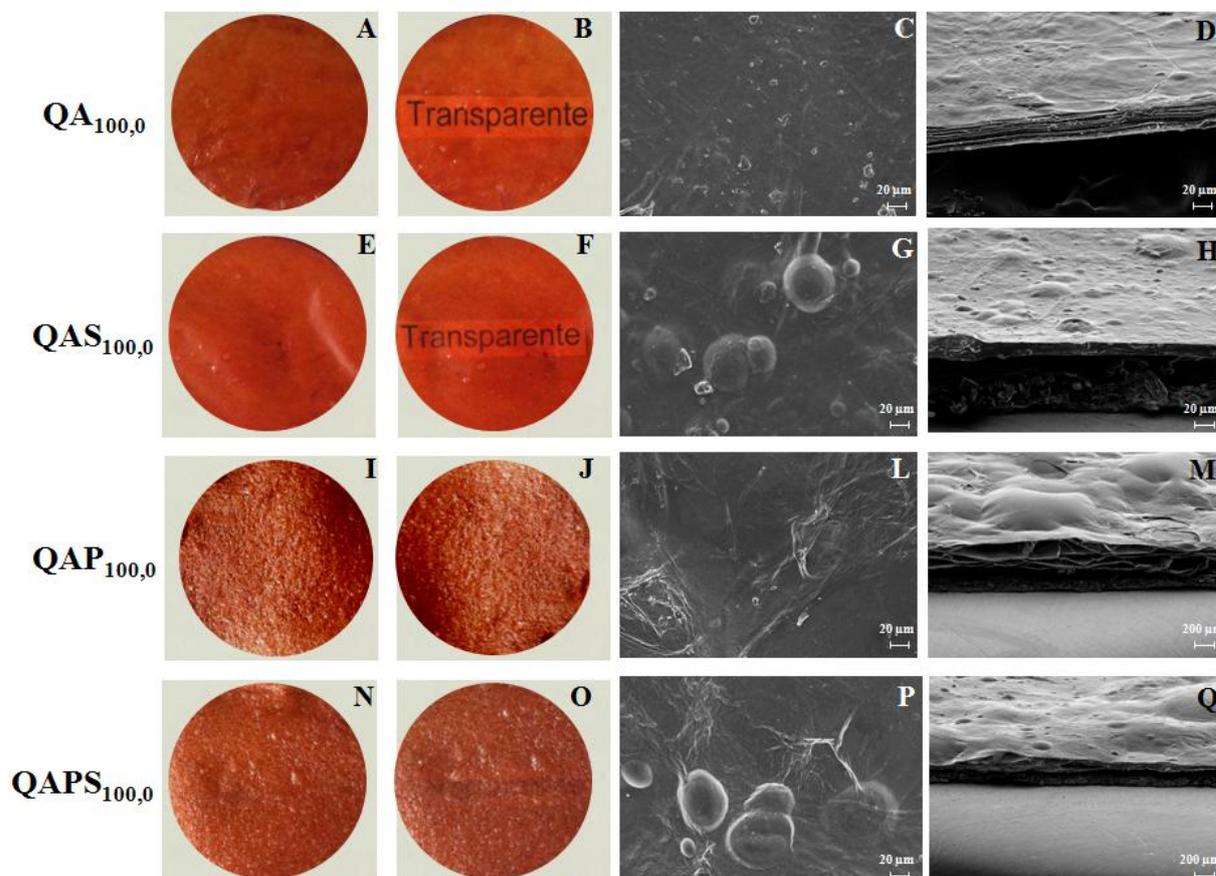
Figura 4.25 – Diagrama das caracterizações das membranas de quitosana-alginato contendo 100 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeo.



Em geral, a presença do extrato de *A. chica* influenciou na transparência dos filmes devido à coloração avermelhada do mesmo e também, possivelmente, às pequenas precipitações do composto no material. Nota-se, no entanto, que quando comparado aos dispositivos preparados na ausência de tal composto (Figura 4.15), o extrato diluído não atribuiu modificações estruturais visíveis a olho nu nos filmes que o contém.

Como observado anteriormente, a presença de *A. chica* não exerceu alterações significativas na morfologia das membranas, que permaneceram com estruturas homogêneas e lamelares. No entanto, ao contrário do que observado nas Figuras 4.15P e 4.15Q, a presença de gotículas do agente siliconado foi observada mesmo na presença do tensoativo. Isto pode ser decorrente da presença de etanol na mistura polimérica que, possivelmente, influenciou no efeito de homogeneização do surfactante entre o PEC de quitosana e alginato e o gel de silicone. Apesar disso, a presença de Kolliphor[®] P188 exerceu o efeito porogênico requerido para tal formulação.

Figura 4.26 – Aspecto visual das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato produzidas na presença de 100,0 mg do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot por grama de polissacarídeos.



4.2.11.2. Espessura de amostras secas, absorção e perda de massa em PBS das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot

Na Tabela 4.19 são mostrados os valores obtidos para a espessura de amostras secas e também para absorção e perda de massa em PBS das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

A presença de 100,0 mg/g do extrato de *A. chica* não alterou significativamente a espessura dos dispositivos quando comparados às formulações preparadas na ausência do extrato (Tabela 4.10), tendo as membranas porosas maiores valores de espessura, como esperado.

Os dados de absorção e perda de massa em PBS pelas membranas contendo *A. chica* mostram que, quando comparados às formulações livres do extrato (Tabelas 4.11 e 4.12,

respectivamente), não há alterações em tais propriedades. Os filmes porosos apresentaram maiores valores de absorção em PBS, corroborando com os dados de espessura, já as formulações contendo Silpuran[®] 2130 A/B (QAS_{10%} e QAPS_{10%}) exibiram menores valores de perda de massa.

Tabela 4.19 – Espessura, absorção e perda de massa em PBS das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

<i>Formulação</i>	<i>Espessura de amostras secas (mm)</i>	<i>Capacidade de absorção (g/g)</i>	<i>Perda de massa (%)</i>
QA _{100,0}	0,060 ± 0,007 ^a	20,07 ± 0,18 ^a	16,82 ± 1,02 ^a
QAS _{100,0}	0,078 ± 0,002 ^a	16,24 ± 0,22 ^a	9,43 ± 0,21 ^b
QAP _{100,0}	0,503 ± 0,061 ^b	32,75 ± 0,31 ^b	17,71 ± 0,14 ^a
QAPS _{100,0}	0,496 ± 0,059 ^b	33,65 ± 0,19 ^b	10,15 ± 0,53 ^b

Mesma letra na mesma colina indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

4.2.11.3. Propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot

A fim de avaliar se a adição do extrato diluído em etanol durante o processamento do material poderia influenciar nas propriedades mecânicas das membranas, foram realizadas também análises de tensão na ruptura, alongamento na ruptura e módulo de Young. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Propriedades mecânicas das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

<i>Formulação</i>	<i>Tensão na ruptura (MPa)</i>	<i>Alongamento na ruptura (%)</i>	<i>Módulo de Young (MPa)</i>
QA _{100,0}	30,22 ± 1,26 ^a	2,46 ± 0,44 ^a	18,00 ± 1,07 ^a
QAS _{100,0}	42,14 ± 0,95 ^b	1,55 ± 0,75 ^b	14,45 ± 2,12 ^b
QAP _{100,0}	3,84 ± 0,42 ^c	2,64 ± 0,29 ^a	1,78 ± 0,13 ^c
QAPS _{100,0}	8,36 ± 0,96 ^d	2,63 ± 0,37 ^a	0,83 ± 0,50 ^d

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Ao comparar os valores obtidos com os da Tabela 4.13, nota-se que os dados de resistência à tração, alongamento na ruptura e elasticidade não sofreram alterações quando na presença do extrato, com exceção do alongamento na ruptura da formulação de QAS_{100,0} que diminuiu em torno de 33%. Tendo-se em vista que o processamento do material é realizado em escala laboratorial e podem ocorrer pequenas diferenças na distribuição da mistura polimérica nas placas de moldagem entre diferentes bateladas, particularmente em sistemas pouco miscíveis, como é o caso da formulação QAS, a variação de dados é esperada. De fato, a variação observada encontra-se dentro dos resultados típicos para alongamento na ruptura das membranas obtidas por complexação entre quitosana e alginato (Yan *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015; Bierhalz e Moraes, 2016).

Desta forma, pode-se concluir que a presença do extrato padronizado *Arrabidaea chica* Verlot não influencia de forma expressiva nas características físico-químicas das membranas produzidas no presente trabalho.

A seguir, são mostrados os resultados da cinética de liberação do extrato das membranas densas, flexíveis e porosas de quitosana-alginato.

4.2.11.4. Eficiência de incorporação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot incorporado na proporção de 100,0 mg/g nas membranas de quitosana-alginato

Na Tabela 4.21 são mostrados os valores de eficiência de incorporação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot adicionado às membranas na proporção de 100,0 mg/g. Como mencionado anteriormente, a eficiência de incorporação foi estimada através das medidas de absorvância (470 nm) das soluções de lavagem das membranas, como descrito no item 3.2.16.

Todas as formulações apresentaram valores de eficiência de incorporação variando de 87 a 90%, não sendo observadas diferenças significativas entre os valores através da análise de Tukey.

Bueno (2016) produziu membranas densas e porosas de quitosana-alginato contendo o antimicrobiano solúvel polihexametileno biguanida (PHMB) e notou que as amostras mais porosas apresentaram menores eficiências de incorporação, sugerindo que grande parte do PHMB pode ter sido liberada durante as etapas de reticulação secundária e lavagens. Tal comportamento não corrobora com o presente estudo, tendo-se em vista que não foram observadas diferenças significativas entre os valores liberados durante a reticulação

secundária e lavagem com água pelas distintas formulações, como pode ser observado na Tabela 4.22. Tendo-se em vista que os poros das membranas não são eficientemente interconectados, como pode ser observado nas Figuras 4.26M e 4.26Q, supõe-se que a difusão da solução contendo o extrato para fora da matriz durante as etapas de lavagem pode ser dificultada. Além do mais, pode-se supor que possam ter ocorrido interações do tipo ligações de hidrogênio entre as moléculas do extrato com a quitosana e o alginato e até mesmo com o agente siliconado.

Tabela 4.21 – Eficiência de incorporação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot adicionado às membranas de diferentes formulações na proporção de 100,0 mg/g.

Formulação	Massa de extrato adicionado por membrana (mg)	Massa de extrato incorporado por membrana (mg)	Eficiência de incorporação (%)
QA _{100,0}	90	78,37 ± 0,77 ^a	87,08 ± 0,85 ^a
QAS _{100,0}	90	78,44 ± 1,41 ^a	87,15 ± 1,57 ^a
QAP _{100,0}	90	79,49 ± 2,21 ^a	88,33 ± 2,45 ^a
QAPS _{100,0}	90	81,02 ± 0,28 ^a	90,02 ± 0,31 ^a

Mesma letra na mesma colina indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Tabela 4.22 – Perda mássica do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot após cada etapa do processo de lavagem das membranas estimada por medida de absorbância a 470 nm.

Formulação	Massa de extrato adicionado por membrana (mg)	Perda por membrana a cada etapa do processo (mg)		
		Reticulação secundária com CaCl ₂	1 ^a lavagem com água	2 ^a lavagem com água
QA _{100,0}	90	4,39 ± 0,01 ^a	4,75 ± 0,59 ^a	2,48 ± 0,19 ^a
QAS _{100,0}	90	4,80 ± 0,72 ^a	3,59 ± 0,42 ^a	3,16 ± 1,71 ^a
QAP _{100,0}	90	4,11 ± 0,81 ^a	3,70 ± 1,59 ^a	2,68 ± 0,19 ^a
QAPS _{100,0}	90	3,54 ± 0,01 ^a	3,91 ± 0,32 ^a	1,53 ± 0,60 ^a

Mesma letra na mesma colina indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

4.2.11.5. Cinética de liberação do extrato de “*Arrabidaea chica*” Verlot adicionado às membranas de diferentes formulações na proporção de 100,0 mg/g

Os perfis de liberação do extrato de *A. chica* contido nas amostras de QA, QAS, QAP e QAPS preparadas na presença de 100,0 mg/g do extrato foram realizadas através de duas abordagens (sem troca do meio de liberação e com troca total do mesmo) a fim de analisar se poderia ocorrer saturação do meio durante o ensaio. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.27 e 4.28.

Figura 4.27 – Perfis de liberação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot nas membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato utilizando a abordagem sem troca do meio de liberação. Resultados expressos em microgramas de agente ativo por miligrama de polissacarídeos (A) e em microgramas de agente ativo por mililitro de solução receptora (B).

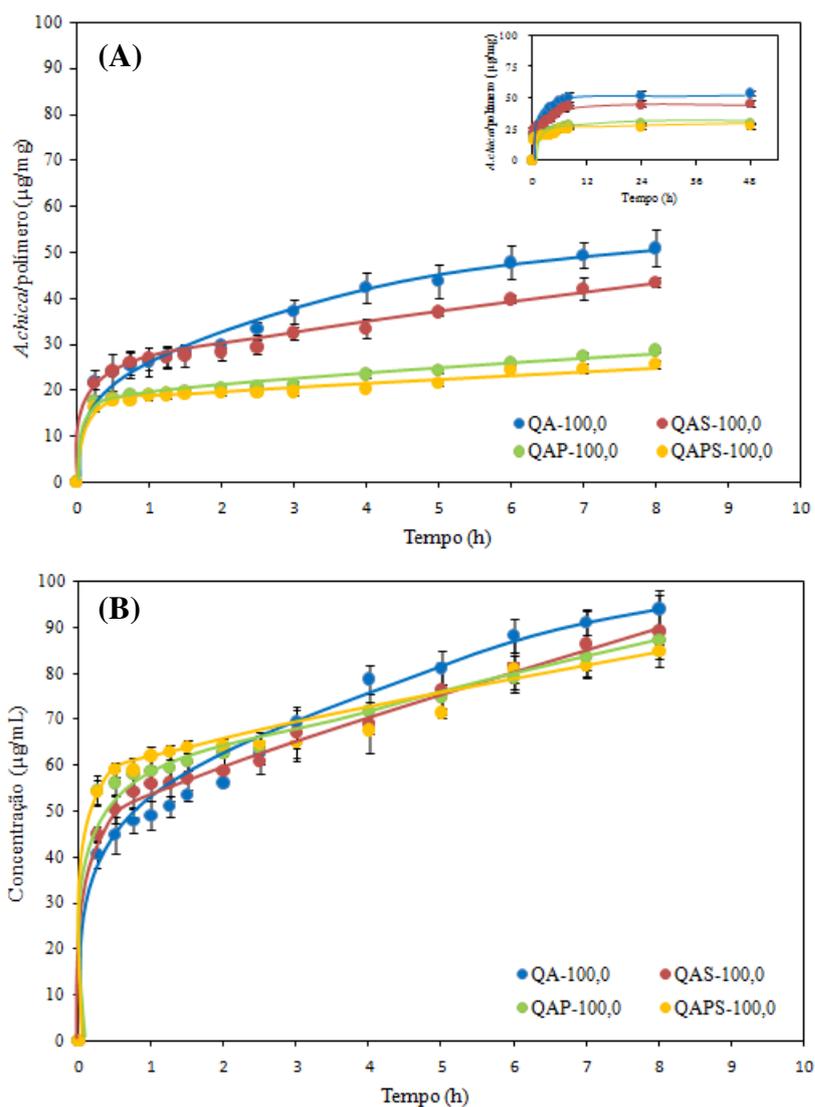
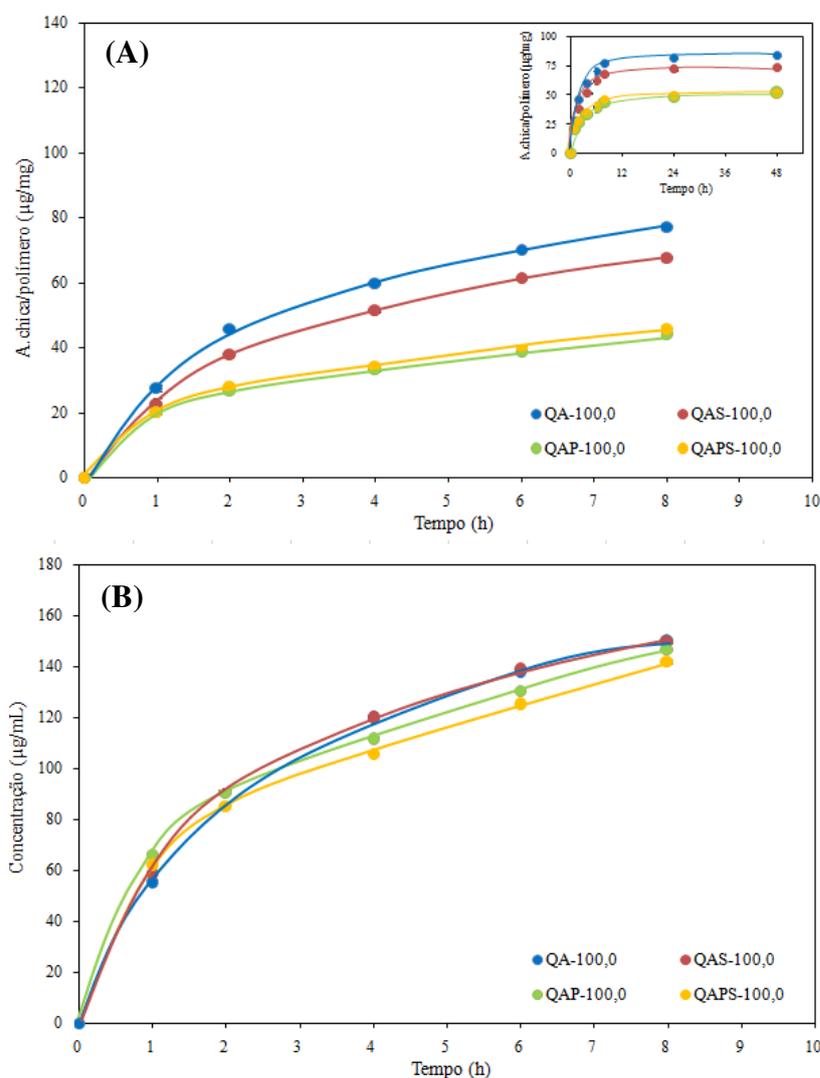


Figura 4.28 – Perfis de liberação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot nas membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato utilizando a abordagem de troca total do meio de liberação. Resultados expressos em microgramas de agente ativo por miligrama de polissacarídeos (A) e em microgramas de agente ativo por mililitro de solução receptora (B).



A análise do comportamento cinético observado para todas as amostras é resumida na Tabela 4.23, na qual se compara o período no qual foi atingido o equilíbrio na liberação do extrato de *A. chica* e também a porcentagem de liberação do mesmo para cada abordagem de liberação utilizada.

Nota-se que, quando não há troca do meio de liberação, possivelmente ocorre saturação da solução, obtendo-se quantidades do extrato liberado inferiores às obtidas quando o fluido

de liberação foi trocado integralmente. Isto corrobora com os dados de fração de extrato liberado, como pode ser observado na Tabela 4.23.

Tabela 4.23 – Comportamento das membranas com relação à cinética de liberação das amostras QA, QAS, QAP e QAPS preparadas na presença de 10% do extrato de *A. chica*.

Formulação	Sem troca do meio		Com troca total do meio	
	Tempo para atingir o equilíbrio (h)	Fração de extrato liberada em 48 h (%)	Tempo para atingir o equilíbrio (h)	Fração de extrato liberada em 48 h (%)
QA _{100,0}	8	5,38 ± 0,16 ^{aA}	8	9,18 ± 0,19 ^{aB}
QAS _{100,0}	7	4,71 ± 0,01 ^{bA}	8	7,97 ± 0,63 ^{bB}
QAP _{100,0}	6	3,03 ± 0,05 ^{cA}	8	5,19 ± 0,32 ^{cB}
QAPS _{100,0}	6	2,69 ± 0,17 ^{cA}	8	5,15 ± 0,25 ^{cB}

Mesma letra minúscula na mesma coluna e mesma letra maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, intervalo de confiança 95%).

Pode-se constatar que os formatos das curvas de liberação são similares para as duas abordagens utilizadas, tendo-se para as formulações porosas (QAP_{100,0} e QAPS_{100,0}) menores quantidades do composto bioativo liberado e, conseqüentemente, menores eficiências de liberação. Bueno (2015) observou que não houve tendência de variação da quantidade de PHMB liberada em função da porosidade das amostras, supondo que a incorporação e a liberação são controladas pela afinidade entre o composto bioativo e os polissacarídeos.

Os dados obtidos para as membranas flexíveis, densas e porosas contendo o extrato padronizado de *A. chica* mostraram que a presença do agente siliconado e do tensoativo influenciaram significativamente na liberação do composto. Desta forma, confirma-se que podem ter ocorrido interações do tipo ligações de hidrogênio entre as moléculas do extrato e as dos polímeros que compõem os filmes. Assim, quanto maior a quantidade de polímeros na mistura, mais disponibilidade de pontos para interações pode ocorrer. Logo, o comportamento cinético de um fármaco é diretamente relacionado à sua característica estrutural e também da matriz polimérica à qual será incorporado.

A fim de analisar os mecanismos primordiais que controlam a liberação de *A. chica* pelas distintas matrizes produzidas neste trabalho, foi realizado um tratamento matemático dos dados de liberação e os resultados são mostrados no próximo item.

4.2.11.6. Análise dos parâmetros cinéticos e mecanismos de liberação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot das matrizes flexíveis, densas e porosas de quitosana e alginato

A liberação de um composto bioativo a partir de matrizes poliméricas é resultante da interação entre os materiais que compõem o dispositivo e também dos fenômenos envolvidos, como intumescimento, dissolução, difusão e erosão da matriz quando em contato com fluido de liberação (Lopes *et al.*, 2005). Desta forma, para a aplicação de um modelo matemático há a necessidade de conhecer as características dos materiais a serem estudados.

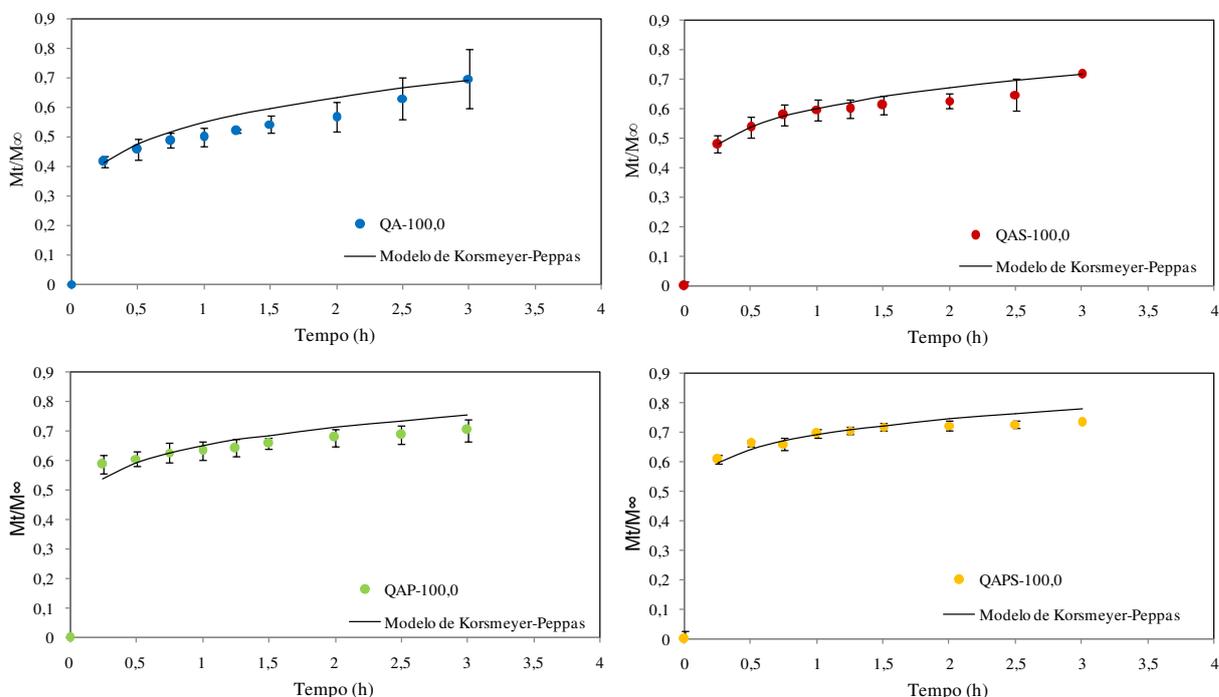
Diante disto, o modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer *et al.*, 1983) foi aplicado no presente trabalho para as formulações submetidas à liberação sem troca do meio. Na Tabela 4.24 são mostrados os valores dos parâmetros cinéticos calculados para as formulações QA, QAS, QAP e QAPS preparadas na presença de 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot. Foi considerado como M_{∞} o valor da concentração de extrato de *A. chica* alcançada no platô de cada formulação, conforme também indicado na Tabela 4.24. Na Figura 4.29 são mostrados os gráficos com o ajuste do modelo de Korsmeyer-Peppas aos dados de liberação na região de concentração inferior a 60% da concentração de equilíbrio M_{∞} .

Tabela 4.24 – Parâmetros da equação do modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas para os dados de liberação *in vitro* do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na região de concentração inferior a 60% da concentração de equilíbrio M_{∞} .

Formulação	M_{∞} ($\mu\text{g/mL}$)	n	k (min^{-1})	r^2	Mecanismo cinético
QA _{100,0}	98,99 \pm 11,18	0,2095	0,2327	0,888	Difusão Fickiana
QAS _{100,0}	93,49 \pm 5,26	0,1610	0,3113	0,903	Difusão Fickiana
QAP _{100,0}	92,41 \pm 3,36	0,1347	0,3742	0,894	Difusão Fickiana
QAPS _{100,0}	89,09 \pm 4,78	0,1060	0,4490	0,893	Difusão Fickiana

Nota-se que os valores de r^2 foram relativamente próximos de um, indicando que o modelo ajustou satisfatoriamente os dados de liberação das diferentes formulações. Tendo-se em vista que os valores de n foram menores que 0,5, o mecanismo primordial na cinética de liberação do extrato foi regido pelo processo Fickiano para todas as amostras, ou seja, a penetração do solvente é o passo limitante para a velocidade da liberação.

Figura 4.29 – Ajuste do modelo de Korsmeyer-Peppas aos dados de liberação do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato, na região de concentração inferior a 60% da concentração de equilíbrio M_{∞} .



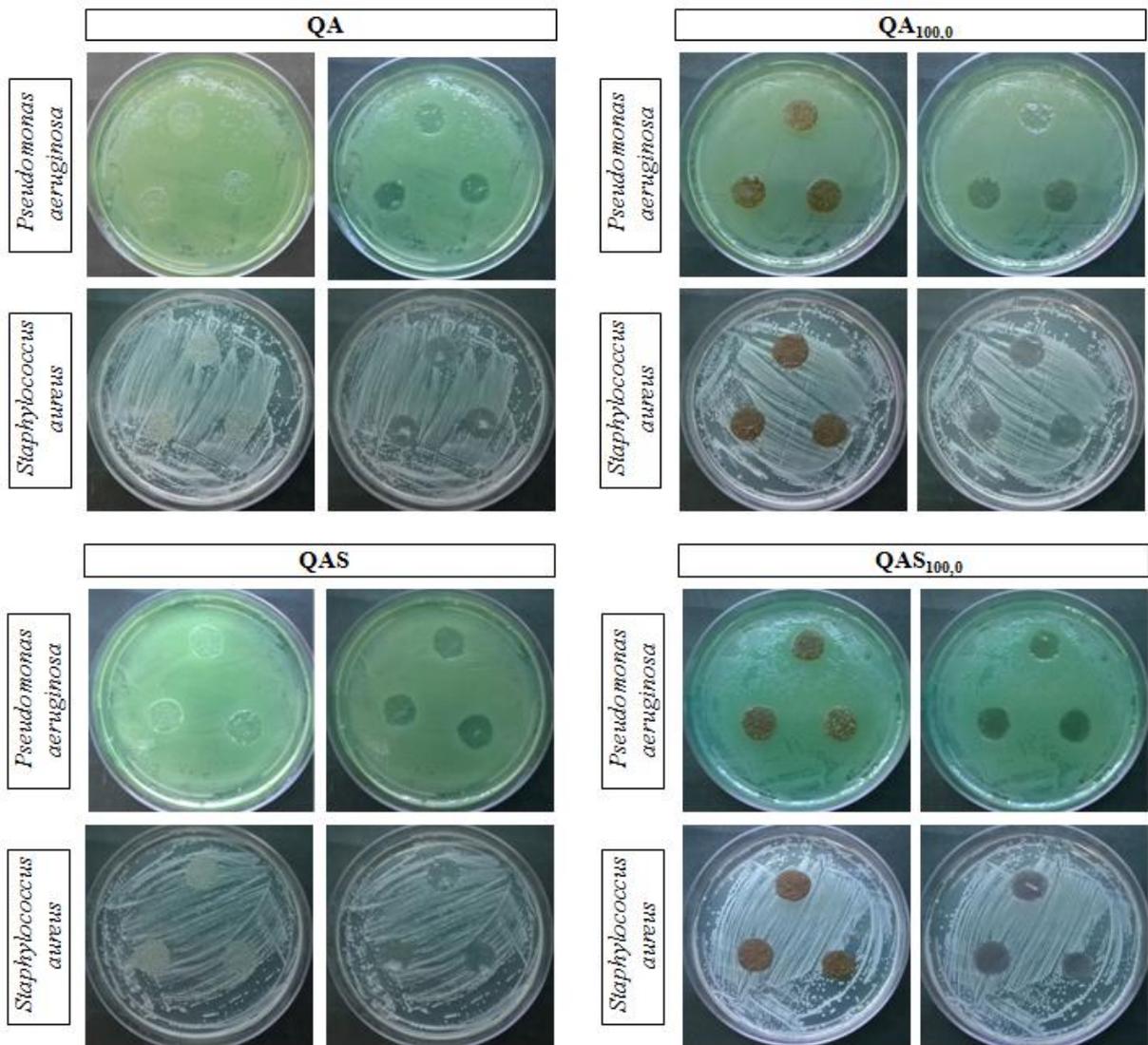
No entanto, ao se analisar o parâmetro k , nota-se que valores distintos foram obtidos para a constante cinética da liberação entre as amostras, com tendência de aumento quando na presença isolada ou simultânea do agente siliconado e do tensoativo. Tal comportamento sugere que a incorporação de um novo elemento na matriz de quitosana-alginato pode influenciar diretamente a velocidade de liberação do composto bioativo. Tais dados corroboram com os anteriormente obtidos para os perfis de liberação do extrato de *A. chica* das formulações de QAS, QAP e QAPS (Figura 4.21 e Tabela 4.24), as quais alcançaram o platô de equilíbrio na liberação em menor tempo que a de QA.

4.2.11.7. Atividade antimicrobiana das membranas de quitosana-alginato contendo 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot

Os riscos de infecção de lesões de pele por organismos resistentes a antibióticos são altamente comuns em pacientes submetidos à hospitalização prolongada ou aos quais são administrados antibióticos em doses e períodos não adequados, sendo as bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*,

respectivamente, algumas das mais recorrentes (Ki e Rotstein, 2008). Nesta perspectiva, testes de halo de inibição foram realizados com essas duas bactérias a fim de verificar a atividade antimicrobiana das membranas contendo ou não o extrato padronizado da *Arrabidaea chica* Verlot. Os resultados para as amostras densas e porosas são mostrados nas Figuras 4.30 e 4.31, respectivamente.

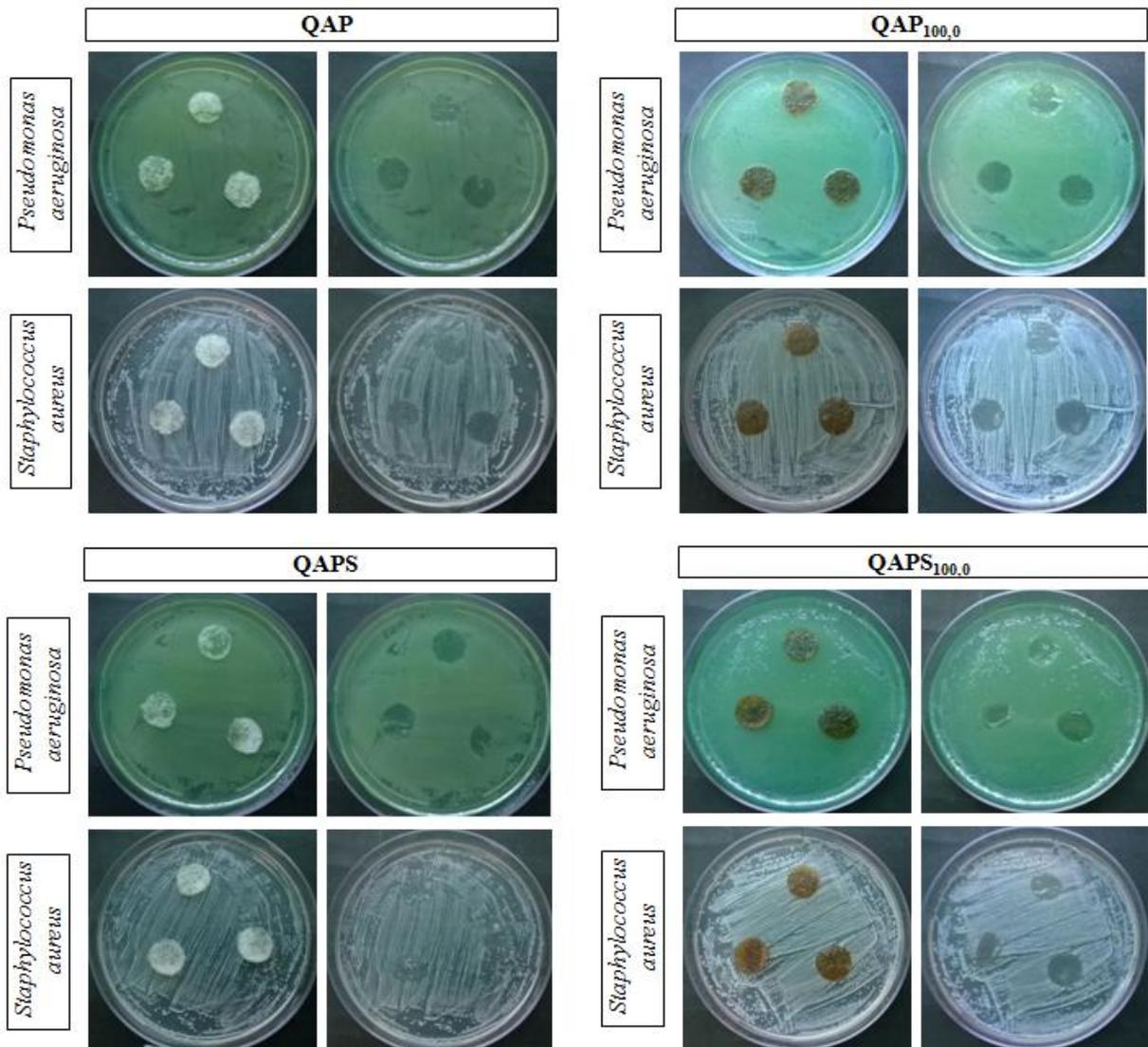
Figura 4.30 – Análise da atividade antimicrobiana de membranas densas de QA e QAS contendo ou não extrato de *Arrabidaea chica* Verlot contra culturas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.



Verificou-se que todas as membranas preparadas na ausência ou na presença do extrato

de *A. chica* não apresentaram halo de inibição contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Além do mais, foi observado crescimento das bactérias testadas na superfície das membranas, indicando que o contato não inibe o desenvolvimento dos microrganismos.

Figura 4.31 – Análise da atividade antimicrobiana de membranas densas de QAP e QAPS contendo ou não extrato de *Arrabidaea chica* Verlot contra culturas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.



Bueno (2015) avaliou o efeito antimicrobiano de membranas densas e porosas de quitosana-alginato contendo o antimicrobiano PHMB e observou que as membranas preparadas na ausência do composto bioativo não apresentaram formação de halo de inibição

contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O mesmo comportamento foi encontrado por Girata (2001) e Rodrigues (2008) para membranas densas de quitosana-alginato e por Veiga (2012) para membranas densas de quitosana-xantana. Em contrapartida, segundo Yu *et al.* (2005), à medida em que o PEC de quitosana-alginato é dissociado no organismo, a quitosana pode liberar grupamentos amina positivos, os quais podem interagir com os componentes negativos da parede celular das bactérias, exercendo assim efeito antimicrobiano.

Alves (2008) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de soluções contendo o extrato de *Arrabidaea chica* Verlot (62,5 a 500 mg/mL) e notou que o composto bioativo não é efetivo contra *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, apresenta uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 62,5 mg/mL do extrato para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Apesar desta constatação sobre a ausência de efeito do extrato de *A. chica* sobre *P. aeruginosa*, no presente trabalho foi realizada tal análise devido às modificações na forma de obtenção do extrato entre os trabalhos, tendo-se em vista que Alves (2008) utilizou apenas solução hidroetanólica (etanol a 70% em volume) para a obtenção do extrato, enquanto que no presente trabalho foi utilizada solução hidroetanólica a 70% acidificada com 0,3% de ácido cítrico. Neste sentido, alterações na extração de diferentes compostos com atividades também distintas poderiam ter ocorrido. Apesar disso, ratificou-se que o extrato padronizado de *A. chica*, de fato, não exerce inibição do crescimento de tal bactéria.

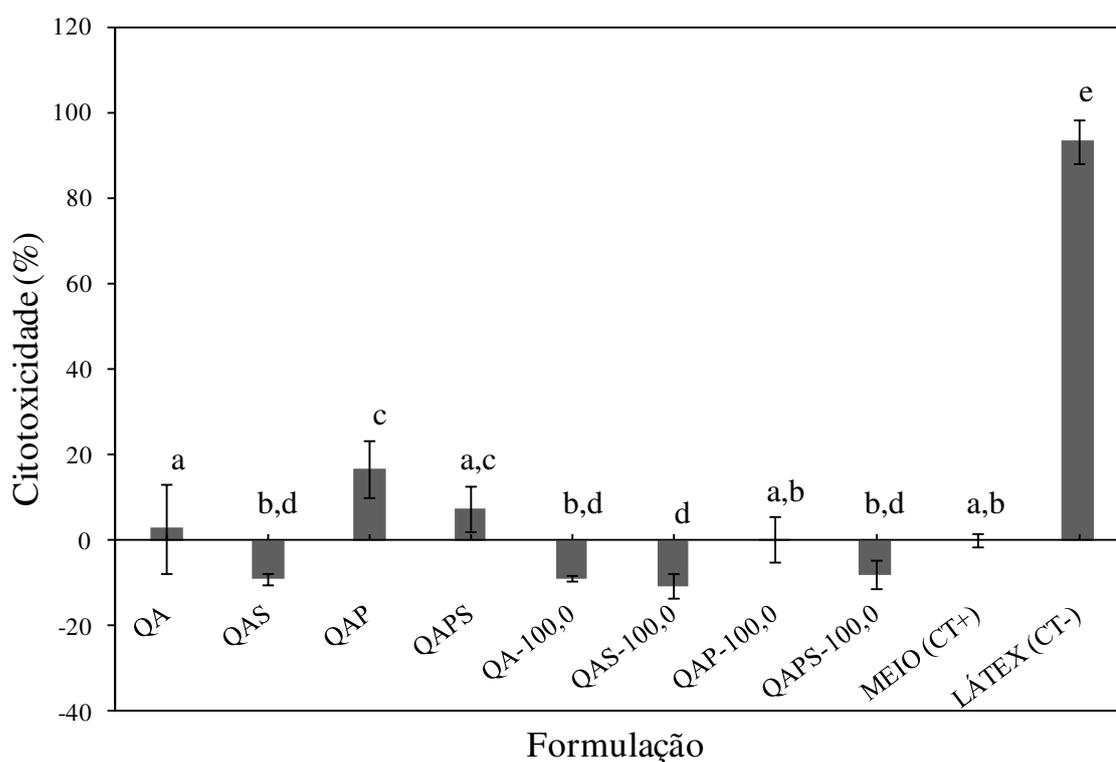
Segundo a análise de liberação realizada, as membranas flexíveis, densas e porosas liberam em torno de 90 e 100 µg/mL de extrato quando imersas em solução de PBS contendo 20% de etanol até 48 h. Assim, as baixas concentrações liberadas do extrato de *A. chica*, sendo estes valores inferiores ao MIC para a bactéria *Staphylococcus aureus*, justificam a ausência de efeito contra tal microrganismo.

4.2.11.8. Efeito citotóxico das membranas de quitosana-alginato contendo 100 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot

A fim de avaliar se as membranas flexíveis, densas e porosas preparadas na presença ou ausência de 100,0 mg/g do extrato de *A. chica* podem ser deletérias a células de mamíferos, foi realizada a análise da toxicidade que os eluatos das membranas poderiam exercer sobre a linhagem de células Vero (fibroblastos) após 24 h. Os resultados obtidos são mostrados na

Figura 4.32.

Figura 4.32 – Citotoxicidade das membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato preparadas na presença ou ausência de 100,0 mg/g do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.



Observa-se que os extratos das formulações não resultam em considerável morte celular. Bueno (2015) também observou que membranas densas e porosas de quitosana-alginato não afetam negativamente o crescimento de células L929. Adicionalmente, Caetano *et al.* (2014) avaliaram a eficácia de membranas densas de quitosana-alginato na aceleração de cicatrização de ratos Wistars e notaram que, além de auxiliarem na modulação da fase inflamatória, as membranas estimulam a proliferação de fibroblastos.

A citotoxicidade do extrato padronizado de *A. chica* a fibroblastos gengivais humanos (linhagem PT64-04HF) foi avaliada por Zago (2014) pelo método de cristal violeta. A autora analisou a exposição das células ao extrato padronizado nos tempos de 24 e 72 h e notou efeito citotóxico em concentrações do extrato acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sá *et al.* (2016) analisaram, através do método de MTT, a citotoxicidade do extrato padronizado a macrófagos peritonias de camundongos (BALB) e observaram que na

concentração de 189,9 µg/mL houve uma diminuição de 50% da viabilidade celular. Taffarelo *et al.* (2013) avaliaram a citotoxicidade do extrato de *A. chica* em fibroblastos de camundongos (linhagem 3T3) também empregando MTT e notaram que o extrato estimula o crescimento celular nas concentrações testadas de 0,25, 2,5 e 25 µg/mL. Ressalta-se que os filmes flexíveis, densos e porosos produzidos na presença de 100,0 mg/g do extrato padronizado de *A. chica* desenvolvidos no presente trabalho liberaram em torno de 100 µg/mL de extrato após 48 horas, como mostrado no Item 4.2.11.5, o que demonstra que a quantidade máxima liberada não induz efeito deletérios às células.

Segundo a análise estatística dos dados obtidos, não há uma tendência de citotoxicidade a células Vero quando na presença de Silpuran[®] 2130 A/B, Kolliphor[®] P188 e/ou do extrato padronizado de *A. chica*. Neste caso, pode-se concluir que os dispositivos desenvolvidos no presente trabalho não acarretam em citotoxicidade, confirmando que todas são potencialmente seguras para uso em humanos. Este resultado era já esperado, uma vez que todos os componentes isolados são reconhecidamente seguros.

4.2.11.9. *Recomendações quanto à aplicação clínica das membranas*

Com base em dados *in vivo* da teste de curativos produzidos fundamentalmente a partir de quitosana e alginato obtidos em colaboração com outros grupos de pesquisa (Paulo *et al.*, 2007; Caetano *et al.*, 2014; Colpas, 2015), apresenta-se, nesta seção, recomendações gerais para a aplicação clínica das membranas desenvolvidas no presente trabalho.

Sugere-se que, previamente à aplicação, as membranas de quitosana-alginato sejam intumescidas em soro fisiológico, por pelo menos 30 minutos, a fim de auxiliar na manipulação e aplicação na área lesada. Uma vez que a membrana não adere fortemente por si ao leito da ferida (Caetano *et al.*, 2014), a aplicação concomitante com um gel aderente, como a cola de fibrina (Colpas, 2015), é uma alternativa eficaz, simples e segura. Para fixar as bordas das membranas ao tecido sadio, sugere-se utilizar fita micropore. Fica a critério dos profissionais da área médica cobrir a membrana com uma fina camada de gaze para que o paciente não entre em contato visual com a ferida, evitando desconforto psíquico, e também para aumentar a proteção da região lesada a estímulos mecânicos.

O paciente pode tomar banho normalmente se a membrana estiver presa à lesão com o auxílio da cola de fibrina.

De acordo com o observado por Colpas (2015), apesar de em alguns casos se ter notado

descolamento de membranas do tipo QA da lesão após cerca de três dias do início do tratamento efetuado em conjunto com a inoculação de células autólogas, se a membrana não se destacar por si, não há necessidade de troca da membrana. E, como o fechamento da lesão parece ocorrer preferencialmente de fora para dentro, pode-se cortar progressivamente com uma tesoura as bordas da membrana que se localizam em regiões já recuperada da pele, pois nessas partes do organismo, o descolamento ocorre naturalmente da lesão em cicatrização.

5. CONCLUSÕES

As membranas de quitosana complexada com alginato de baixa viscosidade preparadas na proporção de 0,01 a 0,20 g de Silpuran[®] 2130 A/B por grama de quitosana-alginato apresentaram-se íntegras e homogêneas, com exceção da formulação contendo 0,20 g/g que não se mostrou estável estruturalmente. A formulação que obteve o melhor desempenho quanto à resistência à tração foi a contendo 0,10 g/g de PDMS (QAS10), sendo esta formulação caracterizada como não hemolítica e com caráter trombogênico.

A incorporação dupla de timol e betacaroteno nas membranas de QAS10 pelas três metodologias distintas não exerceu influência considerável nas características dos materiais. O timol somente foi incorporado por impregnação em solução e por mediação de CO₂ supercrítico, porém baixa eficiência de incorporação foi encontrada, alcançando cerca de 0,2% para todas as metodologias. Ainda, o máximo liberado de timol pelas membranas flexíveis foi 3,9 µg /mg para o sistema supercrítico a uma taxa de despressurização de 10 bar/min , sendo a maior parte do composto retido na matriz. As distintas taxas de despressurização (5 e 10 bar/min) não resultaram em alterações na incorporação e liberação de timol. Análises de FTIR mostram a presença de betacaroteno na estrutura do material para todas as metodologias de incorporação, no entanto, o mesmo somente foi liberado para a metodologia mediada por CO₂ supercrítico a 10 bar/min, alcançando o máximo de 1,2 µg /mg e obtendo eficiência de incorporação de 33%.

A utilização de alginato de média viscosidade para a produção de membranas flexíveis, densas e porosas apresentou vantagens apreciáveis para o tratamento de lesões de pele, como melhora no intumescimento em fluidos, sorção de vapor d'água, estabilidade e resistência à tração.

A incorporação de distintas proporções do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot por adição direta à mistura de quitosana-alginato conferiu coloração avermelhada aos biomateriais e levou a eficiências de incorporação em torno de 85 a 91%, sendo selecionada a formulação na proporção de 100,0 mg/g de *A. chica* por apresentar as maiores eficiências de incorporação e adequados valores de liberação, alcançando 131 µg/mL após 48 horas. Desta forma, esta proporção do extrato foi adicionada nas membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato. Todas as formulações apresentaram eficiência de incorporação de cerca de 90%, no entanto, foram as amostras densas que apresentaram os maiores valores liberados de extrato, atingindo o máximo de 54 µg/mL após

48 horas. As análises dos perfis cinéticos da liberação do extrato de *A. chica* e do ajuste matemático ao modelo de Korsmeyer-Peppas mostraram que a presença de Silpuran[®] 2130 A/B e Kolliphor[®] P188 influenciam na velocidade de liberação do composto bioativo, uma vez que alcançam o platô de equilíbrio na liberação em menor tempo que a membrana densa de quitosana-alginato. A liberação do extrato de *A. chica* não apresentou eficiência contra bactérias, no entanto, não influenciou negativamente a proliferação e a viabilidade de células Vero.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Avaliação do comportamento do Silpuran[®] 2130 A/B a partir do aumento da temperatura a fim de confirmar se o mesmo apresenta comportamento típico na cinética de gelificação.

b) Adição de glicerol na solução de reticulação secundária e água de lavagem a fim de avaliar uma melhora na flexibilidade do material.

c) Homogeneização do PEC de quitosana-alginato com Turrax para auxiliar na melhoria da dispersão do PDMS.

d) Incorporação de diferentes concentrações de timol e betacaroteno em membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana complexada com alginato de média viscosidade utilizando a metodologia de impregnação em solução e por mediação de CO₂ supercrítico.

e) Incorporação do extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot em membranas flexíveis, densas e porosas de quitosana-alginato através da metodologia de impregnação em solução a fim de comparação com a adição direta do extrato durante o processamento do material.

f) Avaliação da capacidade hemolítica e trombogênica das membranas contendo o extrato de *Arrabidaea chica* Verlot.

g) Realização do ensaio de proliferação de fibroblastos sobre as matrizes densas e porosas.

h) Análise de potenciais efeitos e mutagênicos das membranas.

i) Estudo detalhado sobre a eficiência das membranas flexíveis, densas e porosas contendo ou não o extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot na cicatrização *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ågren, M. “Wound Healing Biomateriais: Functional Biomaterials”. 1º Edição. Woodhead Publishing, 2016. 542 p.

Alcerito, T.; Barbo, F.E.; Negri, G.; Santos, D.Y.A.C.; Meda, C.I.; Young, M.C.M.; Chávez, D.; Blatt, C.T.T. “Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity”. *Biochemical Systematic and Ecology*, v.30, p.667-683, 2002.

Almeida, T.L. “Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico”. Dissertação de mestrado; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo; São Paulo, 2009.

Al-Shahrani, M.H.; Mahfoud, M.; Anvarbatcha, R.; Athar, M.T.; Al Asmari, A. “Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil”. *Pharmacognosy Communications*, v.7, p.34-40, 2017.

Altiok, D.; Altiok.; Tihminlioglu, F. “ Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications”. *Journal of Material Science*, v.21, p.2227-2236, 2010.

Alves, M.S.M. “Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl) B. Verlt”. Dissertação de mestrado; Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará; Belém, Pará, 2008.

American Society for Testing and Materials ASTM F813-83: Standart Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials For Medical Devices, 1983.

American Society for Testing and Materials ASTM 756-00: Standart Practice for Direct Assessment of Hemolytic Properties Of Materials, 2000.

American Society for Testing and Materials ASTM D882-02: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2002.

American Society for Testing and Materials ASTM E96-90D: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 2010.

Ancheta, M.; Acerto, L. “Wound healing property of *Carica papaya* stem in albino rats”. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, v.6, p.68-74, 2016.

Ansari, M.T.; Hussain, A.; Nadeem, S.; Majeed, H.; Hassan, S.S.U.; Tariq, I.; Mahmood, Q.; Khan, A.; Murtaza, G. “Preparation and characterization of solid dispersion of artemether by freeze-drier method. *BioMed Research International*, 2015. DOI: 10.1155/2015/109563

Araus, K.A.; Canales, R.I.; del Valle, J.M.; de la Fuente, J.C. “Solubility of β -carotene in ethanol- and triolein-modified CO₂”. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v.43, p.1991-2001, 2011.

Archana, P.R.; Rao, B.N.; Ballal, M.; Rao, B.S.S. “Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity”. *Mutation Research*, v.680, p.70-77, 2009.

Aro, A.A.; Perez, M.O.; Vieira, C.P.; Esquisatto, M.A.M.; Rodrigues, R.A.F.; Gomes, L.; Pimentel, E.R. “Effect of *Calendula officinalis* cream on achilles tendon healing”. *The Anatomical Record*, v.298, p.428-435, 2015.

Aro, A.A.; Simões, G.F.; Esquisatto, M.A.M.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E.; Oliveira, A.L.R.; Gomes, L.; Pimentel, E.R. “*Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon”. *International Journal of the Care of the Injured*, v.44, p.884-892, 2013.

Ávila, A.; Bierbrauer, K.; Pucci, G.; González-López, M.; Strumia, M. “Study of optimization of the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan”. *Journal of Food Engineering*, v.109, p.752-761, 2012.

Ayres, A.O.C.; Teixeira, D.C.; Souza, L.B. “Estudo sobre os hábitos de banho de estudantes da UNICAMP (Brasil) e do Insa-Lyon (França)”. *Revista Ciência do Ambiente On-Line*, v.8, p.60-64, 2012.

Azevedo, V.V.C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D.C.; Lia Fook, M.V.; Costa, A.C.F.M. “Quitina e quitosana, aplicações como biomateriais”. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p.27-34, 2007.

Bal, J.K.; Beuvier, T.; Chebil, M.S.; Vignaud, G.; Grohens, Y.; Sanyal, M.K.; Gibaud, A. "Relaxation of ultrathin polystyrene films hyperswollen in supercritical carbon dioxide". *Macromolecules*, v47, p.8738-8747, 2014.

Banús, M.C.; Bertrán, C.E. "Biomoléculas vegetales: en los alimentos, en la medicina, en todo". *Biomoleculas*, n.8, p.25-30, 2012.

Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.S.; Silva Jr., J.O.C.; Albuquerque, S. "Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities". *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, p.544-548, 2008.

Barrère, F.; Mahmood, T.A.; Groot, K.; Van Blitterswijk, C.A. "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions". *Materials Science and Engineering*, v.59, p.38-71, 2008.

Behrens, M.D.; Tellis, C.J.M.; Chagas, M.S. "Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae)". Monografia; Fundação Oswaldo Cruz – Instituto de Tecnologia de Fármacos. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

Bellini, M.Z.; Pires, A.L.R.; Vasconcelos, M.O.; Moraes, A.M. "Comparaison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions". *Journal of Applied Polymer Science*, v.125, p.421-431, 2012.

Berean, K.; Ou, J.Z.; Nour, M.; Latham, K.; McSweeney, C.; Paull, D.; Halim, A.; Kentish, S.; Doherty, C.M.; Hill, A.J.; Kalantar-zadeh, K. "The effect of crosslinking temperature on the permeability of PDMS membranes: Evidence of extraordinary CO₂ and CH₄ gas permeation". *Separation and Purification Technology*, v.122, p.96-104, 2014.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Gurny, R. "Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.

Bertram, U.; Bodmeier, R. "Effect of polymer molecular weight and of polymer blends on the properties of rapidly gelling nasal inserts". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.38, p.659-669, 2012.

Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.83-99, 2010.

Bierhalz, A.C.K; Moraes, A.M "Tuning the properties of alginate-chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers". *Journal of Applied Polymer Science*, 2016. DOI: 10.1002/app.44216.

Blass, S.C.; Goost, H.; Tolba, R.H.; Stoffel-Wagner, B.; Kabir, K.; Burger, C.; Stehle, P.; Ellinger, S. "Time to wound closure in trauma patient with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: A PRCT". *Clinical Nutrition*, v.31, p.469-475, 2012.

Boateng, J.S.; Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Eccleston, G.M. "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review". *Journal of Pharmaceutical Science*, v.97, p.2892-2923, 2008.

Borges, E.L.; Donoso, T.V.; Ferreira, V.M.F. "Revisão integrativa do uso dos ácidos graxos essenciais no tratamento de lesões cutâneas". *Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro*, v.1, p.121-130, 2011.

Brachaczek, W. "The modelling technology of protective silicone coatings in terms of selected physical properties: Hydrophobicity, scrub resistance and water vapour diffusion". *Progress in Organic Coating*, v.77, p.859-867, 2014.

Braga, M.E.M.; Pato, M.T.V.; Silva, H.S.R.C.; Ferreira, E.I.; Gil, M.H.; Duarte, C.M.M.; Sousa, H.C. "Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives". *The Journal of Supercritical Fluids*, v.44, p.245-257, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf> [Acessado em: 22/09/2016].

Brauker, J.H.; Carr-Brendel, V.E.; Martinson, L.A.; Crudele, J.; Johnston, W.D.; Johnson, R.C. "Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture". *Journal of Biomedical Materials Research*, v.29, p.1517-1524, 1995.

Brook, M.A. “Platinum in silicone breast implants”. *Biomaterials*, v.27, p.3274-3286, 2006.

Bueno, C.Z. “Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2010.

Bueno, C.Z.; Moraes, A.M. “Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.122, p.624-631, 2011.

Bueno, C.Z.; Dias, A.M.A.; Sousa, H.J.C.; Braga, M.E.M.; Moraes, A.M. “Controlo f the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68”. *Materials Science and Engineering C*, v.44, p.117-125, 2014.

Bueno, C.Z. “Desenvolvimento e análise das propriedades de membranas de quitosana e alginato contendo polihexametileno biguanida para o tratamento de lesões de pele”; Tese de Doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2015.

Bueno, C.Z.; Moraes, A.M.; Sousa, H.C.; Braga, M.E.M. “Effect of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan-alginate membranes”. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.112, p.128-135, 2016.

Buzzi, M.; Freitas, F.; Winter, M. “A prospective, descriptive study to assess the clinical benefits of using *Calendula officinalis* hydroglycolic extract for the topical treatment of diabetic foot ulcers”. *Ostomy Wound Management*, v.62, p.8-24, 2016.

Cabello, M.L.R.; Maisanaba, S.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Pichardo, S.; Jos, Â.; Cameán, A.M. “Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2”. *Food and Chemical Toxicology*, v.72, p.122-128, 2014.

Caddeo, C.; Díez-Sales, O.; Pons, R.; Fernández-Busquets, X.; Fadda, A.M.; Manconi, M. “Topical anti-inflammatory potential of quercetin in lipid-based nanosystems: *in vivo* and *in vitro* evaluation”. *Pharmaceutical Research*, v.31, p.959-968, 2014.

Caetano, G.F.; Frade, M.A.C.; Andrade, T.A.M.; Leite, M.N.; Bueno, C.Z.; Moraes, A.M.; Ribeiro-Paes, J.T. “Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.103, p.1013-1022, 2014.

Caraballo, I. “Critical points in the formulation of pharmaceutical swellable controlled release dosage forms—Influence of particle size”. *Particuology*, v.7, p.421-425, 2009.

Carlson, N.E.; Roach, R.B.J. “Platelet-rich plasma: Clinical applications in dentistry”. *The Journal of the American Dental Association*, v.133, p.1383-1386, 2002.

Chen, J.P.; Kuo, C.Y.; Lee, W.L. “Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics”. *Applied Surface Science*. 2012, DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.02.106.

Cheung, H.Y.; Lau, K.T.; Lu, T.P.; Hui, D. “A critical review no polymer-based bio-engineered materials for *scaffold* development”. *Composites Part B: engineering*, v.38, p.291-300, 2007.

Chime, S.A.; Onunkwo, G.C.; Onyishi, I.I. “Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: A review”. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v.4, p.97–103, 2013.

Colpas, T.P. “Terapia celular com culturas de fibroblastos associadas ao uso de membranas constituídas de quitosana complexada com polissacarídeos aniônicos em paciente com úlceras cutâneas”. Dissertação de Mestrado; Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2015.

Comyn, J. *Polymer Permeability*. 1 ed. Londres: Elsevier Applied Science, 1985.

Cooper, A.I. “Recent developments in materials synthesis and processing using supercritical CO₂”. *Advanced Materials*, v.13, 2001.

Corrêa, F.R.S.; Schanuel, F.S.; Moura-Nunes, N.; Monte-Alto-Costa, A.; Daleprane, J.B. “Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.86, p.162-171, 2017. *Revista Bahiana de Odontologia*, v.7, p.751-759, 2016.

Costa, J.B.Z.; Silva, F.; Dultra, C.A.; Souza, L.F.; Santos, M.C.N.E. “O uso de membranas biológicas para regeneração óssea guiada em implantodontia”.

Costa, J.R.; Silva, N.C.; Sarmiento, B.; Pintado, M. “Potential chitosan-coated alginate nanoparticles for ocular delivery of daptomycin”. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.34, p.1255-1262, 2015.

Costache, M.C.; Qu, H.; Ducheyne, P.; Devore, D.I. “Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings”. *Biomaterials*, v.31, p.6336-6343, 2010.

Daemon, E.; Maturano, R.; Monteiro, C.M.O.; Goldner, M.S.; Massoni, T. “Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae”. *Veterinary Parasitology*, v.186, p.542-545, 2012.

Dallan, P.R.M. “Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele”; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, outubro de 2005.

Dallas, P.; Sharma, V.K.; Zboril, R. “Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications and perspective”. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.166, p.119-135, 2011.

Dantas, M.D.M.; Cavalcante, D.R.R.; Araújo, F.E.N.; Barreto, S.R.; Aciole, G.T.S.; Pinheiro, A.L.B.; Ribeiro, M.A.G.; Lima-Verde, I.B.; Melo, C.M.; Cardoso, J.C.; Albuquerque Júnior, R.L.C. “Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.105, p.51-59, 2011.

Darvin, M.E.; Sterry, W.; Lademann, J.; Vergou, T. “The role of carotenoids in human skin”. *Molecules*, v.16, p.10491-10506, 2011.

Darvin, M.E.; Fluhr, J.W.; Meinke, M.C.; Zastrow, L.; Sterry, W.; Lademann, J. “Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals”. *Experimental Dermatology*, v.20, p.125-129, 2011.

Das, U.; Behera, S.S.; Singh, S.; Rizvi, S.I.; Singh, A.K. “Progress in the development and applicability of potential medicinal plant extract-conjugated polymeric construction for wound healing and tissue regeneration”. *Phytotherapy research*, v.30, p.1895-1904, 2016.

Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E. “Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical application”. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.981-1014, 2011.

Davies, O.R.; Lewis, A.L.; Whitaker, M.J.; Tai, H.; Shakesheff, K.M.; Howdle, S.M. “Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, p.373-37, 2008.

Dias, A.M.A.; Braga, M.E.M.; Seabra, I.J.; Ferreira, P.; Gil, M.H.; Sousa, H.C. “Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide”. *International Journal of Pharmaceutics*, v.408, p.9-19, 2011.

Dorai, A.A. “Wound care with traditional, complementary and alternative medicine”. *Indian Journal of Plastic Surgery*, v.45, p.418-424, 2012.

Duarte, A.R.C.; Mano, J.F.; Reis, R.L. “Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering application using supercritical fluid technology”. *European Polymer Journal*, v. 45, p.141-148, 2009.

El-Sherbiny, I.M.; Yacoub, M.H. “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges”. *Global Cardiology Science & Practice – A Qatar Foundation Academic Journal*, v.38, p.316-342, 2013.

Elsabee, M.Z.; Abdou, E.S. “Chitosan based edible films and coating: A review”. *Materials Science and Engineering C*, v.33, p.1819-1841, 2013.

Estarlich, F.M.F.; Eaton, P.J.; Fletcher, R.L.; Lewey, S.A.; Nevell, T.G.; Smith, J.R.; Tsibouklis, J. “The effect of incorporated silicone oils and calcium carbonate on the resistance to settlement and the antifouling performance of a silicone elastomer”. *Journal of Adhesion Science and Technology*, v.25, p.2183-2198, 2011.

Evans, N.D.; Oreffo, R.O.C.; Healy, E.; Thurner, P.J.; Man, Y.H. “Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche”. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v.28, p.397-409, 2013.

Fawcett, A. S.; So, H. Y.; Brook, M. A. "Silicone foams stabilized by surfactants generated *in situ* from allyl-functionalized PEG". *Soft Matter*, v.6, p.1229-1237, 2010.

Franceschi, E.; Cezaro, A.; Ferreira, S.R.S.; Kunita, M.H.; Muniz, E.C.; Rubira, A.F.; Oliveira, J.V. "Co-precipitation of beta-carotene and bio-polymer using supercritical carbon dioxide as antisolvent". *The Open Chemical Engineering Journal*, v.4, p.11-20, 2010.

Gavliakova, S.; Biringerova, Z.; Buday, T.; Brozmanova, M.; Calkovsky, V.; Poliacek, I.; Plevkova, J. "Antitussive effects of nasal thymol challenges in healthy volunteers". *Respiratory Physiology e Neurobiology*, v.187, p.104-107, 2013.

George, M.; Abraham, T.E. "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review". *Journal of Controlled Release*, v.114, p.1-14, 2006.

Girata, A.K. "Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata". Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, abril de 2011.

Glisoni, R.J.; García-Fernández, M.J.; Pino, M.; Gutkind, G.; Moglioni, A.G.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Sosnik, A. "β-Cyclodextrin hydrogels for the ocular release of antibacterial thiosemicarbazones". *Carbohydrate Polymers*, v.93, p.449–4457, 2013.

Goh, C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. "Alginates as a useful natura polymer for microencapsulation and therapeutic applications". *Carbohydrate Polymers*, v.88, p.1-12, 2012.

Gombotz, W.R.; Wee, S.F. "Protein release from alginate matrices". *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.64, p.194-205, 2012.

Gomes, M.; Azevedo, H.; Malafaya, P.; Silva, S.; Oliveira, J.; Silva, G.; Mano, R.S.J.; Reis, R. "Natural polymers in tissue engineering applications". *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, cap.16, 2008.

Gomez L.A.R; Muñoz, R.A.L.; Rincon Jaime, M.G.; Pires, A.L.R.; Moraes, A.M.; Penuela, O.A. "Tratamiento de úlceras de origen venoso con plasma rico en factores de crecimiento y membranas biocompatibles". Em: Congreso Iberoamericano de Biotecnología. n.1, 2016.

Salamanca, Espanha. *Livro de Resumos*. Publicação Online, ISBN 976-84-6DB-B233-6. p.123.

Grassi, M.; Grassi, G. “Mathematical modeling and controlled drug delivery: Matrix systems”. *Current Drug Delivery*, v. 2, p.97-116, 2005.

Green, B. “Understanding infection in wound care”. *Professional Nursing Today*, v.16, n.2, 2012.

Hamman, J.H. “Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems”. *Marine Drugs*, v.8, p.1305-1322, 2010.

Haslam, E. “Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action”. *Journal of Natural Products*, v.59, p.205-215, 1996.

Hassler, C.; Boretius, T.; Stieglitz, T. “Polymer for neural implants”. *Polymer Physics*, v.49, p.18-33, 2011.

Hatahet, T.; Morille, M.; Hommos, A.; Devoisselle, J.M.; Muller, R.H.; Bégu, S. “Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.108, p.41-53, 2016.

He, Q.; Ao, Q.; Wang, A.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. “*In vitro* cytotoxicity and protein drug release properties of chitosan/heparin microspheres”. *Tsinghua Science & Technology*, v.12, p.361-365, 2007.

Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v.13, p.572-584, 2002.

Hernandes, L.; Pereira, L.M.S.; Palazzo, F.; Mello, J.C.P. “Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.46, p.431-437, 2010.

Hernandez-Montelongo, J.; Naveas, N.; Degoutin, S.; Tabary, N.; Chai, F.; Spampinato, V.; Ceccone, B.; Rossi, F.; Torres-Costa, V.; Manso-Silvan, M.; Materl, B. “Porous silicon-cyclodextrin based polymer composites for drug delivery applications”. *Carbohydrate Polymers*, v.110, p.238–252, 2014.

Holzapfel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Noth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D.W. “How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.65, p.581-603, 2013.

Honary, S.; Maleki, M.; Karami, M. “The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone”. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.8, p.53-61, 2009.

Hsu, S.H.; Whu, S.W.; Tsai, C.L.; Wu, Y.H.; Chen, H.W.; Hsieh, K.H. “Chitosan as scaffold materials: Effect of molecular weight and degree of deacetylation”. *Journal of Polymer Research*, v.11, p.141-147, 2004.

Imai, Y.; Nose, Y. “A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials”. *Journal of Biomedical Materials Research*, v 6, p.165–172, 1972.

ISO10993-5: Biological evaluation of medical devices – Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Kumar, P.T.S.; Nair, S.V.; Tamura, H. “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing application”. *Biotechnology Advances*, v.29, p.322-337, 2011.

Jorge, M.P.; Madjarof, C.; Ruiz, A.L.T.G.; Fernandes, A.T.; Rodrigues, R.A.F.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E. “Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract”. *Journal of Ethnopharmacology*, v.118, p.361-366, 2008.

Kaassen, C.D.; Watkins III, J.B. Fundamentos em toxicologia: de Casarett e Doull. Capítulo 19: Respostas tóxicas da pele. 2º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2012, 441p.

Kang, Y. O.; Yoon, I. S.; Lee, S. Y.; Kim, D. D.; Lee, S. J.; Park, W. H.; Hudson, S. M. “Chitosan-coated poly(vinyl alcohol) nanofibers for wound dressings”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.92B, p.568-576, 2010.

Kavoosi, G.; Dadfar, S.M.M.; Purfard, A.M. “Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing”. *Journal of Food Science*, v.78, p.E244-E250, 2013.

Khan, F.; Ahmad, S.R. “Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application”. *Macromolecular Bioscience*, v.13, p.395-421, 2013.

Khor, E.; Lim, L.Y. “Implantable applications of chitin and chitosan”. *Biomaterials*, v.24, p.2339-2349, 2003.

Ki, V.; Rotstein, C. “Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care”. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, v.19, p.173-184, 2008.

Kikic, I.; Vecchiione, F. “Supercritical impregnation of polymers”. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v.7, p.399-405, 2003.

Kiran, E. “Supercritical fluids and polymers – The year in review – 2014”. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.110, p.126-153, 2016.

Kawitter, J.J.; Hulbert, S.F. “Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications”. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.5, p.161-229, 1971.

Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N.A. “Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers”. *International Journal of Pharmaceutics*, v.15, p.25–35, 1983.

Krayukhina, M.A.; Samoilo, N.A.; Yamskov, I.A. “Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications”. *Russian Chemical Reviews*, v.77, n.9, p.799-813, 2008.

Kurt, B.Z.; Gazioglu, I.; Dag, A.; Salmas, R.E.; Kayık, G.; Durdagi, S.; Sonmez, F. “Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling study of novel carbamate-substituted thymol/carvacrol derivatives”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, p.1352-1363, 2017.

Lalor, P.A.; Jones, L.C. “The innate response to biomaterials”. *Biocompatibility*, cap.4.403, 2011.

Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L. "Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS". *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007

Lee, K.Y.; Mooney, D.J. "Alginate: Properties and biomedical applications". *Progress in Polymer Science*, v.37, p.106-126, 2012.

Lee, Y.H.; Chang, J.J.; Yang, M.C.; Chien, C.T.; Lai, W.F. "Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing". *Carbohydrate Polymers*, v.88, p.809-819, 2012.

Leite, A.P.; Oliveira, B.G.R.B.; Soares, M.F.; Barrocas, D.L.R. "Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática". *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v.33, p.198-207, 2012.

Li, X.; Xie, H.; Lin, J.; Xie, W.; Ma, X. "Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes". *Polymer Degradation and Stability*, v.94, p.1-6, 2009.

Liang, R.; Huang, Q.; Ma, J.; Shoemaker, C.F.; Zhong, F. "Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions". *Food Hydrocolloids*, v.33, p.225-233, 2013.

Lila, M.A. "Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.5, p.306-313, 2004.

Lima, C.R.O.; Silva, L.A.F.; Rabelo, R.E.; Vulcani, A.S.; Assis, B.M.; Lopes, W.D.Z.; Mascarenhas, L.J.S.; Oliveira, R.S. "Cremes de barbatimão e quitosana como adjuvantes na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos". *Semina: Ciências Agrárias*, v.37, p.1317-1326, 2016.

Liu, X.M.; Maziarz, E.P.; Price, F.; David, J.H.; Grobe, G.L. "Characterization of silicone rubber extractus using gel-permeation chromatography, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy and gás chromatography/mass spectrometry". *European Journal of Mass Spectrometry*, v.7, p.473-480, 2001.

Lopes, C.M.; Lobo, J.M.S.; Costa, P. “Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos”. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.143-154, 2005.

Luo, Y. Wang, Q. “Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.64, p.353-367, 2014.

Ma, J.; Sahai, Y. “Chitosan biopolymer for fuel cell applications”. *Carbohydrate Polymers*, v.92, p.955-975, 2013.

Ma, J.; Wang, H.; He, B.; Chen, J. “A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts”. *Biomaterials*, v.22, p.331-336, 2001.

Mafioleti, L.; Silva Junior, I.F.; Colodel, E.M.; Flack, A.; Martins, D.T.O. “Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl”. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, p.576-582, 2013.

Majtan, J. “Honey: An immunomodulator in wound healing”. *Wound Repair and Regeneration*, v.22, p.187-192, 2014.

Malafaya, P.B.; Silva, G.A.; Reis, R.L. “Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.207-233, 2007.

Mallepally, R.R.; Bernard, I.; Marin, M.A.; Ward, K.R.; McHugh, M.A. “Superabsorbent alginate aerogels”. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.79, p.202-208, 2013.

Market and Market, 2014. “Stem Cell Therapy Market by Treatment Mode (Autologous & Allogeneic), Therapeutic Applications (CNS, CVS, GIT, Wound Healing, Musculoskeletal, Eye, & Immune System) - Regulatory Landscape, Pipeline Analysis & Global Forecasts to 2020”. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/stem-cell-technologies-and-global-market-48.html> [Acesso em 23/09/2016].

Market and Market, 2015. “Biomaterials Market by Type of Material (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural Biomaterials) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic

Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2020". Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html> [Acesso em 23/09/2016].

Market and Market, 2016. "Wound Care Market by Product (Advanced (Foam, Alginate, NPWT, Active), Surgical, Traditional), Wound type (Chronic (DFU, Pressure Ulcer), Acute (Burn)), End User (Hospital (Inpatient, Outpatient), Long-Term Care, Home Healthcare) – Global Forecast to 2021". Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-care-market-371.html&gws_rd=cr&ei=TOORWO2IDIXEwASb-qWgAw [Acesso em 01/02/2017].

Martin, J. C. *Revista Abinee*. São Paulo, nº 51, p. 28-29, maio de 2009.

Martins, M.D.; Marques, M.M.; Bussadori, S.K.; Martins, M.A.T.; Pavesi, V.C.S.; Mesquita-Ferrari, R.A.; Fernandes, K.P.S. "Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An *in vitro* and *in vivo* study". *Phytotherapy Research*, v.23, p.274-278, 2009.

Masuelli, M.A.; Illanes, C.O. "Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between conventional and single point methods". *International Journal of Biomaterials Science and Engineering*, v.1, p.1-11, 2014.

Maurstad, G.; Morch, Y.A.; Bausch, A.R.; Sokke, B.T. "Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate-chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy". *Carbohydrate Polymers*, v.71, p.672-681, 2008.

Medina, L.S. "Arrabidaea chica Verlot: Formulações de liberação sustentada para aplicação em úlceras de mucosa e pele" Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, 2014.

Medina, L.S.; Gómez, G.A.; Ortega, A.G.; Sousa, M.O.; Queiroz, N.C.A.; Zago, P.M.W.; Jorge, M.P.; Monteiro, K.M.; Carvalho, J.E.; Román, J.S.; Foglio, M.A. "Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity". *International Journal of Nanomedicine*, v.10, p.3897-3909, 2015.

Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C.; Xing, N.; Li, F. "Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application". *Journal of Material Science*, v.21, p.1751-1759, 2010.

Metcalfé, A.D.; Ferguson, M.W.J. "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration". *Journal of The Royal Society Interface*, v.4, p.413-437, 2007.

Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Araújo, E.L. "Taninos: uma abordagem da química à ecologia". *Química Nova*, v.28, p.892-896, 2005.

Murakami, K.; Aoki, H.; Nakamura, S.; Nakamura, S.; Takikawa, M.; Hanzawa, M.; Kishimoto, S.; Hattori, H.; Tanaka, Y.; Kiyosawa, T.; Sato, Y.; Ishihara, M. "Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings". *Biomaterials*, v.31, p.83-90, 2010.

Nicolaus, C.; Junghanns, S.; Hartmann, A.; Murillo, R.; Ganzera, M.; Merfort, I. "In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extract". *Journal of Ethnopharmacology*, v.196, p.94-103, 2017.

Ospina, N.M.; Alvarez, S.P.O.; Sierra, D.M.E.; Vahos, D.F.R.; Ocampo, P.A.Z.; Orozco, C.P.O. "Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications". *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v.26, p.1-9, 2015.

Paixão, D.R.; Flausino, P.A.; Reis, N.G.; Lima, C.C.; Bernardes, M.T.C.P.; Santos, L.; Garcia, J.A.D. "Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos". *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.35, p.413-417, 2014.

Papkov, M.S.; Agashi, K.; Olaye, A.; Shakesheff, K.; Domb, A.J. "Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering". *Advanced Drug Reviews*, v.59, p.187-206, 2007.

Paul, W.; Sharma, C.P. "Chitosan and alginate wound dressings: A short review". *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v.18, n.1, p.18-23, 2004.

Paulo, N.M.; Conceição, M.; Bueno, I.A.; Silva, M.S.B.; Menezes, L.B.; Moraes, A.M.; Rodrigues, A.P. "Chitosan film for treatment of cutaneous wound in a female cat". *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.381-383, 2007.

Pawar, R.S.; Toppo, F.A.; Mandloi, A.S.; Shaikh, S. “Exploring the role of curcumin containing ethanolic extract obtained for *Curcuma longa* (rhizomes) against retardation of wound healing process by aspirin”. *Indian Journal of Pharmacology*, v.47, p.160-166, 2015.

Pawar, S.N.; Edgar, K.J. “Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications”. *Biomaterials*, v.33, p.3279-3305, 2012.

Pires, A.L.R. “Desenvolvimento de curativos flexíveis e neutralizados de quitosana e alginato contendo AlphaSan[®] RC2000”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2013.

Pires, A.L.R.; Moraes, A.M. “Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.132, p.41686-41695, 2015.

Pires, A.L.R.; Bierhalz, A.C.K.; Moraes, A.M. “biomateriais: tipos, aplicações e mercado”. *Química Nova*, v.38, p.957-971, 2015.

Pletschi, M. “Compostos naturais biologicamente ativos”. *Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, ano 1, n.4, p.12-15, 1998.

Priestley, C.M.; Williamson, E.M.; Wafford, K.A.; Sattelle, D.B. “Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*”. *British Journal of Pharmacology*, v.140, p.1363-1372, 2003.

PubChem. Beta carotene. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/betacarotene#section=Top>>. Acesso em 31/10/2016.

PubChem. Carajurin. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44257040#section=Top>>. Acesso em 02/02/2017.

PubChem. Carajuron. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44257041#section=Top>>. Acesso em 02/02/2017.

PubChem. Thymol. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thymol#section=Top>>. Acesso em 31/10/2016.

Purohit, S.K.; Solanki, R.; Mathur, V.; Mathur, M. "Evaluation of wound healing activity of ethanolic extract of *Curcuma longa* Rhizomes in male albino rats". *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, v.3, p.79-91, 2013.

Qian, C.; Decker, E.A.; Xiao, H.; McClements, D.J. "Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility". *Food Chemistry*, v.135, p.1440-1447, 2012.

Quirk, R.A.; France, R.M.; Shakesheff, K.M.; Howdle, S.M. "Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds". *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v.8, p.313-321, 2004.

Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. "Biomaterials science, an introduction to materials in medicine". Segunda Edição. San Diego, Estados Unidos. *Elsevier Academic Press*, p.80-707, 2004.

Raval, A.; Parikh, J.; Engineer C. "Mechanism of controlled release kinetics form medical devices". *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.27, p.211-225, 2010.

Regiel, A.; Irusta, S.; Kyziol, A.; Arruebo, M.; Santamaria, J. "Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*". *Nanotechnology*, 2013. DOI: 10.1088/0957-4484/24/1/015101.

Reid, B.; Elisseeff, J. "Biomaterials in cartilage tissue engineering". *Tissue Engineering – Musculoskeletal, Cranial and Maxillofacial*, p.213-220, 2011.

Riella, K.R.; Marinho, R.R.; Santos, J.S.; Pereira-Filho, R.N.; Cardoso, J.C.; Albuquerque-Junior, R.L.C.; Thomazzi, S.M. "Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents". *Journal of Ethnopharmacology*, v.143, p.656-663, 2012.

Rinaudo, M. "Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials". *Polymer International*, v.57, p.397-430, 2008.

Rodrigues, A. P. "Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões"; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2008.

Rodrigues, A.P.; Sanchez, E.M.S.; Costa, A.C.; Moraes, A.M. “The influence of preparation condition on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.109, p.2703-2710, 2008.

Rodriguez-García, I.; Silva-Espinoza, B.A.; Ortega-Ramirez, L.A.; Leyva, J.M.; Siddiqui, M.W.; Cruz-Valenzuela, M.R.; Gonzalez-Aguilar, G.A.; Ayala-Zavala, J.F. “Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.56, p.1717-1727, 2016.

Rossi, L.A.; Menezes, A.J.; Gonçalves, N.; Ciofi-Silva, C.L.; Farina-Junior, J.A.; Stuchi, R.A.G. “Local treatment with burn injuries”. *Revista Brasileira de Queimaduras*, v.9, p.54-59, 2010.

Rukmani, A.; Sundrarajan, M. “Inclusion of antibacterial agente thymol on β -cyclodextrin-grafted organic cotton”. *Journal of Industrial Textiles*, v.42, p.132-144, 2011.

Sá, J.C.; Almeida-Souza, F.; Mondêgo-Oliveira, R.; Oliveira, I.S.S.; Lamarck, L.; Magalhães, I.F.B.; Ataídes-Lima, A.F.; Ferreira, H.S.; Abreu-Silva, A.L. “Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot”. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.16, p.1-11, 2016.

Sacchetin, P.S.C. “Incorporação de *flavobacterium columnare* inativado em micropartículas de alginato e quitosana para a imunização de tilápia do Nilo (*oreochromis niloticus*) por via oral”; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2009.

Sánchez-Machado, D.I.; López-Cervantes, J.; Sendón, R.; Sanches-Silva, A. “*Aloe vera*: ancient knowledge with new frontiers”. *Trends in Food Science & Technology*, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.12.005

Sankalia, M.G.; Mashru, R.C.; Sankalia, J.M.; Sutariya, V.B. “Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, p.215-232, 2007.

Science Lab – Material Safety Data Sheet of Thymol, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927623>> [Acessado em 23/10/2015]

Segato, M.P. “Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio”; Dissertação de mestrado; Instituto de Química – Universidade de São Paulo; São Carlos, 2007.

Shah, C. B.; Vitaris, R. F.; Fink, E. D.; Orr, S.; Dowd, B.; Tranchemontagne, A.; Ward, K.; Swaniker, H.; Patel, H. A. *Antimicrobial foam compositions, articles and methods*. United States Patent Application Publication US2010/0260824 A1, 14.Outubro.2010.

Shamsabadi, A.A.; Kargari, A.; Babaheidari, M.B. “Preparation, characterization and gas permeation properties of PDMS/PEI composite asymmetric membrane for effective separation of hydrogen from H₂/CH₄ mixed gas”. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.1410-1419, 2014.

Sharma, K.D.; Karki, S.; Thakur, N.S.; Attri, S. “Chemical composition, functional properties and processing of carrot – a review”. *Journal of Food Science Technology*, v.49, p.22-32, 2012.

Shi, J.; Alves, N.M.; Mano, J.F. “Drug Release of pH/Temperature-Responsive Calcium Alginate/Poly(N-isopropylacrylamide) Semi-IPN Beads”. *Macromolecular Bioscience*, v.6, p.358-363, 2006.

Sibaja, B.; Culbertson, E.; Marshall, P.; Boy, R.; Broughton, R.M.; Solano, A.A.; Esquivel, M.; Parker, J.; De La Fuente, L.; Auad, M.L. “Preparation of alginate-chitosan fibers with potential biomedical applications”. *Carbohydrate Polymers*, v.134, p.598-608, 2015.

Siepmann, J.; Siepmann, F. “Mathematical modeling of drug delivery”. *International Journal of Pharmaceutics*, v.364, p.328-343, 2008.

Sigma-Aldrich. Beta carotene. Disponível em: <
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=22040&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2F22040%3Flang%3Dpt>>. Acesso em 15/06/2013.

Sigma-Aldrich. Thymol. Disponível em: <
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=T0501&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sig>

maaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Ft0501%3Flang%3Dpt>. Acesso em 15/06/2013.

Silva, T.H.; Alves, A.; Ferreira, B.M.; Oliveira, J.M.; Reys, L.L.; Ferreira, R.J.F.; Sousa, R.A.; Silva, S.S.; Mano, J.F.; Reis, R.L. “Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest”. *Materials of marine origin*, v.57, p.276-307, 2012.

Singh, B.; Pal, L. “Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties”. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v.9, p.9-21, 2012.

Sivamani, R.K.; Ma, B.R.; Wehrli, L.N.; Maverakis, E. “Phytochemicals and naturally derived substances for wound healing”. *Advances in Wound Care*, v.1, p.213-217, 2012.

Smith, I.O.; Liu, X.H.; Smith, L.A.; Ma, P.X. “Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine”. *Advanced Review*, v.1, p.226-236, 2009.

Song, J.M.; Shin, S.H.; Kim, Y.D.; Lee, J.Y.; Baek, Y.J.; Yoon, S.Y.; Kim, H.S. “Comparative study of chitosan/fibroin–hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis”. *International Journal of Oral Science*, v.6, p.87-93, 2014.

Sousa, I.M.O. “Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de bases semi sólidas, contendo *Arrabidaea chica* Verlot, para uso em cicatrização”. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2013.

Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B. Moraes, A.M. “Polysaccharide-based membranes loaded with erythromycin for application as wound dressings”. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016. DOI: 10.1002/app.43428.

Sovová, H.; Stateva, R.P.; Galushko, A.A. “Solubility of β -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers”. *Journal of Supercritical Fluids*, v.21, p.195-203, 2001.

Srivastava, J.K.; Shankar, E.; Gupta, S. “Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future”. *Molecular Medicine Reports*, v.3, p.895-901, 2010.

Srivastava, N.; Jain, G.K.; Raghubir, R. "Poly antioxidant mixture accelerates healing of experimental wounds in albino rats". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v.4, p.46-50, 2011.

Stechmiller, J.K. "Understanding the role of nutrition and wound healing". *Nutrition in Clinical Practice*, v.25, p.61-68, 2013.

Stechmiller, J.K. "Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing". *Nutrition in Clinical Practice*, v.25, p.61-68, 2010.

Tabernerero, A.; Valle, E.M.M.; Galán, M.A. "Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.60, p.9-25, 2012.

Taffarello, D. "Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (humb. & bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas". *Química Nova*, v.36, p.431-436, 2013.

Takeo, M.; Lee, W.; Ito, M. "Wound healing and skin regeneration". *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, v.5, p.1-12, 2015.

Tanideh, N.; Abdordideh, E.; Yousefabad, S.L.A.; Daneshi, S.; Hosseinabadi, O.K.; Samani, S.M.; Derakhshan, A. "Evaluation of the healing effect of honey and colostrums in treatment of cutaneous wound in rat". *Comparative Clinical Pathology*, v.26, p.71-77, 2017.

Torres, A.; Romero, J.; Macan, A.; Guarda, A.; Galotto, M.J. "Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging". *The Journal of Supercritical Fluids*, v.85, p.41-48, 2014.

Três, M.V.; Francheschi, E.; Borges, G.R.; Dariva, C.; Corazza, F.C.; Oliveira, J.V.; Corazza, M.L. "Effect of temperature on the solubility of β -carotene in organic solvents under ambient pressure". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.737-743, 2007.

Veiga, I. G. "Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele"; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2009.

- Veiga, I. G.; Moraes, A. M. “Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes”. *Journal of Applied Science*, v.124, p.154-160, 2011.
- Vendramin, F.S.; Franco, D.; Franco, T.R. “Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas”. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v.25, p.589-594, 2010.
- Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S.K. “Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoidan for Bone Tissue Engineering”. *Marine Drugs*, v.12, p.300-316, 2014.
- Verma, D.; Desai, M. S.; Kulkarni, N.; Langrana, N. “Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials”. *Materials Science and Engineering C*, v.31, p.1741-1747, 2011.
- Verpoorte, R.; Memelink, J. “Engineering secondary metabolite production in plants”. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.181-187, 2002.
- Wacker Silicones – Silpuran® 2130 A/B, 2013. Disponível em: <<http://www.sheger.com.cn/up/updown/20163952496861.pdf>> [Acessado em: 24/07/2015].
- Wang, L.; Khor, E.; Lim, L. “Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application”. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.90, n.8, 2001.
- Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L.Y. “Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing”. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.63, p.610-618, 2002.
- Wang, T.; Wu, Y.; Zeng, A.J. “Synthesis and Characterization of Amphiphilic Pluronic (F68)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine Copolymers and Their Micelles as a Drug Carrier”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.117, p.604-613, 2010.
- Williams, D. F. “On the nature biomaterials”. *Biomaterials*, v.30, p.5897-5909, 2009.
- Wong, J. Y.; Bronzino, J. D. *Biomaterials*. 2º edição. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. 277 p., v.32.

Wu, J.; Liu, K.; Chen, X.; Ma, W.; Yang, B.; Dai, Y. “Prediction of Covalent Interactions Between Si and B, Fe, Al or Ca in Metallurgical Grade Silicon Using *ab initio* Molecular Dynamic Simulations”. *Silicon*, v.7, p.253-259, 2015.

Xu, H.; Ma, L.; Shi, H.; Gao, C.; Han, C. “Chitosan–hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: *in vitro* and *in vivo* studies”. *Polymers for advanced technologies*, v.18, p.869–875, 2007.

Yabuki, S. “Polyelectrolyte complex membranes for immobilizing biomolecules, and their applications to bio-analysis”. *Analytical Sciences*, v.27, p.695-702, 2011.

Yan, X.; Khor, E.; Lim, L.Y. “Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.58, p.358-365, 2001.

Yan, X.; Khor, E.; Lim, L.Y. “PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates”. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.48, n.7, p.941-946, 2000.

Yannas, I.V.; Lee, E.; Orgill, D.P.; Skrabut, E.M.; Murphy, G.F. “Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin”. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, v.86, p.933-937, 1989.

Yi, J.; Lam, T.I.; Yokoyama, W.; Cheng, L.W.; Zhong, F. “Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cell”. *Food Hydrocolloids*, v.43, p.31-40, 2015.

Yu, S.H.; Mi, F.L.; Wu, Y.B.; Peng, C.K.; Shyu, S.S.; Huang, R.N. “Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release”. *Journal of Applied Polymer Science*, v.98, p.538-549, 2005.

Zago, P.M.W. “Arrabidaea chica Verlot: avaliação *in vitro* de toxicidade, atividades antimicrobiana e citoprotetora do extrato bruto livre padronizado combinado ao ácido zoledrônico, e estudos de microencapsulação”; Tese de doutorado; Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual de Campinas; Piracicaba, 2014.

Zaibunnisa, A.H.; Marhanna, Aini Marhanna, M.N.A.; Ainun Atirah, M. "Characterisation and solubility study of γ -cyclodextrin and β -carotene complex". *International Food Research Journal*, v.18, p.1061-1065, 2011.

Zeng, Q.; Macri, L.K.; Prasad, A.; Clark, R.A.F.; Zeugolis, D.I.; Hanley, C.; Garcia, Y.; Pandit, A. "Skin tissue engineering". P.467-499, 2011.

Zhang, J.; Xia, W.; Liu, P.; Cheng, Q.; Tahirou, T.; Gu, W.; Li, B. "Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications". *Marine Drugs*, v.8, p.1962-1987, 2010.

Zimmermann, R.; Jakubietz, R.; Jakubietz, M.; Strasser, E.; Schlegel, A.; Wiltfang, J.; Eckstein, R. "Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application". *Transfusion*, v.41, p.1217-1224, 2001.