



FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA

**INCORPORAÇÃO DE ALFA-BISABOOL EM MEMBRANAS DE  
POLICAPROLACTONA E DE QUITOSANA COMPLEXADA COM GOMA GUAR**

CAMPINAS

2014





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

**Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos**

FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA

**INCORPORAÇÃO DE ALFA-BISABOOL EM MEMBRANAS DE  
POLICAPROLACTONA E DE QUITOSANA COMPLEXADA COM GOMA GUAR**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA MORAES.

CAMPINAS

2014

iii

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

So89i Souza, Fernanda Carla Bombaldi de, 1989-  
Incorporação de alfa-bisabolol em membranas de policaprolactona e de quitosana complexada com goma guar / Fernanda Carla Bombaldi de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ângela Maria Moraes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Membranas. 2. Quitosana. 3. Goma guar. 4. Poli (caprolactona). 5. Tecnologia de liberação controlada. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Incorporation of alpha-bisabolol into polycaprolactone and chitosan-guar gum membranes

**Palavras-chave em inglês:**

Membranes

Chitosan

Guar gum

Polycaprolactone

Controlled release technology

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Mary Ann Foglio

Theo Guenter Kieckbusch

**Data de defesa:** 28-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Fernanda Carla Bombaldi de Souza e aprovada em 28 de março de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ângela Maria Moraes



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mary Ann Foglio



---

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch



## RESUMO

A quitosana, a goma guar e a policaprolactona são exemplos de polímeros muito usados na obtenção de curativos para a terapia de lesões de pele devido ao fato de serem biocompatíveis e biodegradáveis. A fim de aumentar a atividade biológica destes curativos, a incorporação de compostos bioativos que estimulam o processo de cura das lesões pode ser feita. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a obtenção de curativos biologicamente ativos, por meio da incorporação do alfa-bisabolol, um composto antioxidante e anti-inflamatório de origem natural, a membranas constituídas de quitosana combinada com goma guar (Q-G) e de policaprolactona (PCL). Dois métodos de incorporação foram utilizados: adição direta do composto ativo à mistura polimérica (AD) e impregnação do composto nas membranas por imersão em solução etanólica (IE). As membranas produzidas foram caracterizadas quanto ao seu aspecto visual, cor e opacidade, morfologia, ângulo de contato com água, propriedades mecânicas e espessura em diferentes umidades, capacidade de absorção e perda de massa em etanol e em soluções aquosas, taxa de transmissão de vapor d'água e espectro FTIR. A eficiência de incorporação do alfa-bisabolol às membranas e a atividade antioxidante deste composto foram determinadas, e sua cinética de liberação estudada. Os resultados mostraram que tanto os filmes de Q-G como de PCL apresentaram comportamento mais adequado para a aplicação no tratamento de lesões pouco exsudativas. As propriedades mecânicas dos filmes sofreram variação significativa apenas quando estes foram expostos a condições de umidade elevada. O alfa-bisabolol utilizado nos ensaios apresentou elevado grau de pureza, porém atividade antioxidante relativamente baixa. A inserção do composto na matriz ocasionou mudanças significativas em sua aparência e alterações em sua microestrutura. Para Q-G, baixas eficiências de incorporação foram obtidas, sendo o valor máximo atingido pelo método AD igual a 1,65%, o equivalente a 4,96 mg/g, enquanto que para o método IE atingiu-se cerca de 18%, com uma retenção de aproximadamente 1080 mg/g. Já no caso da PCL, alta eficiência de incorporação foi observada (100%). A liberação mostrou-se relativamente lenta em ambos os casos e a percentagem máxima de alfa-

bisabolol liberado ficou em torno de 6% e 30%, o equivalente a 12 e 300 mg/g para filmes de PCL e de Q-G, respectivamente. O tempo prolongado de liberação permitiria a troca do curativo com intervalos de tempo maiores, tornando o tratamento menos incômodo para o paciente.

**Palavras-chave:** membranas, curativos, lesões de pele, quitosana, goma guar, policaprolactona, alfa-bisabolol.



## ABSTRACT

Chitosan, guar gum and polycaprolactone are polymers widely used to obtain wound dressings due to their biocompatibility and biodegradability. To increase the biological activity of these dressings, bioactive compounds which accelerate wound healing can be incorporated. In this context, this work aimed the development of biologically active dressings, through the incorporation of alpha-bisabolol, a natural antioxidant and anti-inflammatory compound, to membranes made of chitosan associated with guar gum (C-G) and of polycaprolactone (PCL). The incorporation of alpha-bisabolol was performed by two distinct methods: addition directly to the polymeric mixture (AD) and absorption of the active compound from an ethanolic solution (AS). The membranes were characterized regarding to visual appearance, color and opacity, morphology, water contact angle, water vapor transmission rate, swelling capacity in ethanol and in aqueous solutions as well as mass loss in the same media, strain at break, tensile strength and thickness in different humidities conditions and FTIR spectrum. Alpha-bisabolol incorporation efficiency and its antioxidant activity were determined and the release kinetics was studied. Results showed that both films are more suitable for the use in the treatment of lesions with low exudate levels. Mechanical properties suffered significant change only after exposure of the films to high humidity conditions. The alpha-bisabolol used in this study exhibits high purity, but relatively low antioxidant activity. The addition of the compound to the matrix led to significant changes in the appearance and to modifications in the microstructure of the films. The C-G membranes presented low incorporation efficiencies, with the maximum value of 1.65%, equivalent to 4.96 mg/g, for the AD method, and 18%, approximately 1080 mg/g, for the AS method. In the case of PCL, high incorporation efficiency (100%) was observed. The release of alpha-bisabolol from the matrices was relatively slow and the maximum percentage of compound released reached about 6% and 30%, equivalent to 12 and 300 mg/g for PCL and C-G films, respectively. A prolonged release would allow less frequent dressing changes, turning the treatment more comfortable for the patient.

**Keywords:** membranes, wound dressing, skin lesion, chitosan, guar gum, polycaprolactone, alpha-bisabolol.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivos .....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1. Lesões de pele .....	5
2.2. O uso de curativos no tratamento de lesões de pele .....	9
2.3. Polímeros usados na obtenção de curativos .....	13
2.3.1. Quitosana .....	14
2.3.2. Goma guar.....	19
2.3.3. Complexo Quitosana – Goma guar.....	21
2.3.4. Policaprolactona .....	23
2.4. Incorporação de compostos bioativos aos curativos .....	27
2.4.1. Alfa-bisabolol .....	29
2.5. Considerações finais .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1. Materiais.....	33
3.2. Métodos .....	33
3.2.1. Caracterização do alfa-bisabolol.....	33
3.2.1.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas .....	33
3.2.1.2. Avaliação da atividade antioxidante do alfa-bisabolol.....	34
3.2.1.2.1. Método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	34
3.2.1.2.2. Método do radical DPPH <sup>•</sup> .....	35
3.2.2. Preparação das membranas.....	36
3.2.2.1. Membranas de quitosana e goma guar .....	36

3.2.2.2.	Membranas de policaprolactona .....	37
3.2.3.	Incorporação de alfa-bisabolol às membranas.....	38
3.2.3.1.	Incorporação do composto durante a preparação das membranas .....	38
3.2.3.2.	Incorporação do composto por impregnação em solução etanólica .....	39
3.2.4.	Caracterização das membranas .....	39
3.2.4.1.	Aspecto das membranas.....	40
3.2.4.2.	Avaliação da cor e opacidade das membranas .....	40
3.2.4.3.	Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas .....	41
3.2.4.4.	Ângulo de contato das membranas com água .....	41
3.2.4.5.	Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água .....	42
3.2.4.6.	Capacidade de absorção e estabilidade em etanol .....	44
3.2.4.7.	Capacidade de absorção e estabilidade na presença de soluções aquosas .....	45
3.2.4.8.	Avaliação das propriedades mecânicas e da espessura das membranas em diferentes condições de umidade.....	46
3.2.4.9.	Determinação do comportamento por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	47
3.2.4.10.	Avaliação da eficiência de incorporação de alfa-bisabolol adicionado durante a preparação das membranas .....	48
3.2.4.11.	Determinação da eficiência de incorporação de alfa-bisabolol impregnado nas membranas por imersão em solução etanólica.....	50
3.2.5.	Estudo da liberação do alfa-bisabolol das membranas .....	50
3.2.6.	Análise estatística.....	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1.	Caracterização do alfa-bisabolol.....	52

4.1.1.	Análise da composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas .....	52
4.1.2.	Avaliação da atividade antioxidante .....	56
4.2.	Caracterização das membranas .....	63
4.2.1.	Aspecto visual, cor e opacidade das membranas .....	63
4.2.2.	Morfologia da superfície e da seção transversal .....	67
4.2.3.	Ângulo de contato com água .....	68
4.2.4.	Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água .....	70
4.2.5.	Propriedades mecânicas e espessura em diferentes condições de umidade.....	72
4.2.6.	Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas.....	76
4.2.7.	Capacidade de absorção e perda de massa em etanol .....	78
4.2.8.	Incorporação de alfa-bisabolol às membranas.....	79
4.2.8.1.	Eficiência de incorporação do alfa-bisabolol.....	79
4.2.8.2.	Aspecto visual, cor e opacidade das membranas contendo alfa-bisabolol .	85
4.2.8.3.	Morfologia da superfície e seção transversal .....	88
4.2.8.4.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier .....	91
4.3.	Estudo da cinética de liberação do alfa-bisabolol .....	95
5.	CONCLUSÕES.....	101
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
	ANEXO I .....	119
	ANEXO II .....	120
	ANEXO III .....	121
	ANEXO IV.....	122
	ANEXO V .....	123



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas boas oportunidades e pela força dada nos momentos difíceis.

A minha irmã Renata, que está sempre ao meu lado e a quem dedico amor incondicional, agradeço por tudo.

Aos meus pais, Ivonir e Sueli, que, com muito carinho, me apoiaram de todas as maneiras durante todos os dias da minha vida.

À professora Dra. Ângela Maria Moraes, pela atenção, incentivo, amizade, apoio e orientação que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Chrystian, pela amizade, compreensão, e por proporcionar muitos momentos de alegria, mesmo estando distante.

A todos os colegas de laboratório, Cecília Bueno, Luizinha, Selma, Cecília Mourão, Gisele Pavan, Gisele Atsuko, Gabriela, Carla, Naimy, Mayra, Max, Erik e Nemailla, pela amizade, pelos momentos divertidos que compartilhamos dentro e fora do laboratório e pela ajuda prestada nos momentos de dificuldade.

À Atina, Ativos Naturais, pela gentil doação do alfa-bisabolol utilizado neste trabalho.

Ao professor Dr. José Alberto Fracassi da Silva pelo uso das dependências de seu laboratório e pelas contribuições fornecidas como participante na banca de qualificação deste trabalho. Também ao seu aluno, Richard Piffer, pelo auxílio na realização dos ensaios de ângulo de contato com água.

À professora Dra. Mary Ann pelas contribuições fornecidas como participante na banca de qualificação deste trabalho e pelo auxílio na realização dos ensaios de caracterização do alfa-bisabolol por CG-MS.

Ao Professor Theo Guenter Kieckbusch pelo uso das dependências de seu laboratório e à sua aluna Andréa Bierhalz pela amizade e por estar disposta a ajudar sempre que necessário.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

À equipe do LRAC, em especial Adilson Brandão, Lucélia Silva e Celso Camargo, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química que colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.



“Alguns homens vêem as coisas como são e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

*George Bernard Shaw*



## NOMENCLATURA

ABS: absorvância

ABTS<sup>•+</sup>: ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)

AD: adição direta do composto à mistura polimérica

A<sub>e</sub>: área exposta do filme nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

A<sub>i</sub>: massa de fluido absorvida pela amostra

Al: alongamento na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

A<sub>s</sub>: área de secção transversal inicial da amostra nos ensaios de resistência mecânica

ASTM: *American National Standards Institute*

Bis: alfa-bisabolol

CAET: capacidade antioxidante equivalente à do Trolox<sup>®</sup>

CG/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

d<sub>i</sub>: afastamento inicial das garras do equipamento nos ensaios de resistência mecânica

DPPH<sup>•</sup>: 2,2- Difenil-1-picril-hidrazilo

d<sub>r</sub>: afastamento das garras no momento da ruptura nos ensaios de resistência mecânica

EC<sub>50</sub>: quantidade necessária de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de radical em reação

F: fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o CaCl<sub>2</sub> nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

FCS: fluido corpóreo simulado

FDA: *Food and Drug Administration*

$F_m$ : força máxima de rompimento nos ensaios de resistência mecânica

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

G: goma guar

$G_m$ : taxa de ganho de massa do sistema nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

HPLC: *high-performance liquid chromatography*

IE: impregnação em solução etanólica contendo o composto

IR: índice de retenção

SLN: *solid lipid nanoparticle*

LRAC: Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração

$m_{c,0}$ : massa inicial do composto adicionada à membrana

$m_{c,pe}$ : massa de composto perdida por evaporação

$m_{c,pp}$ : massa de composto perdida por retenção na placa de Petri

$m_{c,t}$ : massa do composto incorporada à membrana

MEV: microscopia eletrônica de varredura

$m_f$ : massa do composto remanescente na solução

$m_{final}$ : massa da amostra após a exposição ao fluido e secagem

$m_{inicial}$ : massa da amostra antes da exposição ao fluido

$M_p$ : perda de massa da amostra

$m_{úmida}$ : massa da amostra após a exposição ao fluido

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

PCL: policaprolactona

PEC: complexo polieletrólito, do inglês *Polyelectrolyte Complex*

PVA: permeabilidade ao vapor d'água

Q: quitosana

Q-G: complexo constituído de quitosana e goma guar

SFB: soro fetal bovino

SS: solução salina

$t_r$ : tempo de retenção

TR: tensão na ruptura nos ensaios de resistência mecânica

TTVA: taxa de transmissão de vapor d'água

UR: umidade relativa

UV: ultravioleta

Y: opacidade

$\delta$ : espessura do filme

$\Delta P_{H_2O}$ : diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme nos ensaios de permeabilidade ao vapor d'água

$\epsilon$ : eficiência de incorporação do composto



## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, possui estrutura complexa e constitui sua interface com o meio externo, exercendo funções cruciais para a vida, tais como termorregulação, vigiância imunológica, sensibilidade e barreira mecânica (Tortora e Derrickson, 2012). As lesões de pele podem afetar este órgão em diferentes profundidades, atingindo uma ou mais de suas camadas e comprometendo todas as suas funções (Hess, 2005). Com o objetivo de auxiliar, agilizar e melhorar o processo natural de cura de uma lesão utilizam-se os curativos (Franco e Gonçalves, 2008).

Os curativos são empregados tanto para proteger o local do ferimento contra lesões mecânicas e contaminação por microrganismos, quanto para propiciar um meio adequado ao processo de cura, que inclui a restauração do epitélio e a formação de colágeno (Weller e Sussman, 2006; Mulder *et al.* 2002). Muitas matérias-primas têm sido testadas para a produção destes dispositivos. Devido às suas propriedades funcionais e relativa flexibilidade na sua síntese, os polímeros, tanto de origem natural quanto sintética, são a classe de materiais mais utilizada para a produção de matrizes voltadas para esta aplicação. A biocompatibilidade e a biodegradabilidade estão dentre as principais características desejáveis para estes materiais (Ramalingam e Ramakrishna, 2006). A quitosana e a goma guar, polímeros de origem natural, e a policaprolactona, polímero de origem sintética, são exemplos de materiais amplamente utilizados na área médica.

A quitosana é um polímero de origem natural extraído principalmente do exoesqueleto de crustáceos e possui muitas propriedades intrínsecas que a torna interessante para a aplicação na área da biomedicina. É um polímero biocompatível, biodegradável, bioadesivo e possui muitas propriedades biológicas relevantes, tais como efeitos anti-inflamatório, antibacteriano e hemostático (Croisier e Jérôme, 2013). A goma guar é outro biopolímero natural, obtido da planta *Cyamopsis tetragonolobus*. É usada em várias formulações farmacêuticas, incluindo cápsulas, hidrogéis, filmes e

nano ou micro-partículas e tem sido explorada como potencial matriz para liberação controlada de fármacos (Prabaharan, 2011). A quitosana e a goma guar se associam de modo a formar um complexo físico e essa sinergia entre os dois biopolímeros tem sido estudada e aplicada no desenvolvimento de dispositivos médicos (Haupt *et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2012; Veiga, 2012)

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético obtido a partir da polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona. Sua excelente biocompatibilidade e sua capacidade de ser absorvida pelo organismo tornam a PCL adequada para o desenvolvimento de dispositivos não removíveis de liberação controlada, uma vez que também possui alta permeabilidade a muitos fármacos e compostos bioativos (Woodruff e Hutmacher, 2010).

Os materiais usados como curativos são divididos em dois grupos, conforme sua interação com o ferimento, os inertes e os interativos ou bioativos. Os curativos bioativos são capazes de interagir com o tecido danificado, ajudando a reduzir ou eliminar a dor e os processos inflamatórios que a causam, estimulando e acelerando o processo de cura (Weller e Sussman, 2006; Mulder *et al.* 2002).

Novas tecnologias de produção de curativos biologicamente ativos incluem a incorporação de princípios ativos de plantas ou fármacos sintéticos em sua estrutura e têm se mostrado uma excelente alternativa no tratamento de ferimentos crônicos (Weller e Sussman, 2006). Tais tecnologias dizem respeito aos sistemas de liberação controlada, nos quais o composto ativo incorporado à matriz é liberado de forma controlada para a área desejada. A liberação controlada é importante pois minimiza a perda e a degradação do composto ativo e aumenta a disponibilidade na zona tratada (Boateng *et al.*, 2008).

Tanto compostos bioativos de origem natural, como o alfa-bisabolol, quanto sintética são passíveis de ser incorporados aos curativos. Com a descoberta de agentes bioativos sintéticos, o uso dos produtos de origem natural foi deixado em segundo plano por muitos anos (Cragg e Newman, 2013, Newman e Cragg, 2007; Patra, 2012). Todavia, o desenvolvimento de resistência de várias linhagens



bacterianas a agentes antimicrobianos e antibióticos sintéticos, bem como preocupações a respeito de sua eficácia e segurança reavivaram o interesse pelo uso dos compostos de origem natural como uma alternativa aos sintéticos (Patra, 2012).

O alfa-bisabolol é um álcool sesquiterpênico monocíclico insaturado natural presente em várias espécies de plantas. No Brasil, este composto é majoritariamente extraído da árvore Candeia (*Eremanthus erythropappus*). Apresenta uma grande variedade de propriedades biológicas, dentre as quais destacam-se seus efeitos antimicrobiano, antifúngico, antiespasmódico, analgésico, antioxidante e anti-inflamatório (Kamatou e Viljoen, 2010; Clark *et al.*, 2011; Petronilho *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de novos dispositivos de liberação controlada contendo compostos biologicamente ativos ainda não testados para a aplicação como curativos mostra ser de grande relevância no cenário dos avanços tecnológicos nos campos da medicina e engenharia de tecidos. O alfa-bisabolol é um composto bioativo relativamente pouco explorado, mas possui propriedades biológicas que o tornam promissor para esta aplicação.

## **1.1. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção de curativos biologicamente ativos por meio da incorporação do composto natural alfa-bisabolol a membranas de policaprolactona, polímero de origem sintética, e membranas constituídas de quitosana complexada com goma guar, ambos polímeros de origem natural, e a comparação de suas propriedades. Os objetivos específicos foram:

- i. Desenvolvimento de metodologia para produção das membranas de policaprolactona pelo método de evaporação do solvente;
- ii. Caracterização das propriedades físicas, físico-químicas e mecânicas das membranas produzidas, relevantes do ponto de vista a aplicação pretendida, na terapia de lesões de pele;

- iii. Caracterização do alfa-bisabolol utilizado nos ensaios de incorporação;
- iv. Incorporação do alfa-bisabolol em diferentes proporções às membranas obtidas segundo dois métodos, o de adição do composto à mistura polimérica durante a preparação das membranas e o de impregnação do composto às membranas por imersão em soluções etanólicas;
- v. Determinação do alfa-bisabolol presente nas matrizes poliméricas e avaliação da eficiência de incorporação por meio de análises qualitativas e quantitativas;
- vi. Avaliação da cinética de liberação do alfa-bisabolol das formulações de membrana contendo quantidade significativa do composto incorporado.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Lesões de pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 2 m<sup>2</sup> de extensão e responsável por em torno de 16% do peso do corpo de um adulto. Contém muitas estruturas, tais como pelos, capilares, vasos linfáticos, terminações nervosas, entre outras. É, portanto, um órgão complexo, composto por diversos tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas (Tortora e Derrickson, 2012).

Constitui a interface do corpo humano com o meio externo, exercendo funções cruciais para a vida, como termorregulação, vigilância imunológica, sensibilidade e proteção do indivíduo contra a perda de água e de proteínas para o exterior, e também contra agressões exógenas, sendo estas de natureza química, física ou biológica. Sendo assim, a pele exerce três grandes funções. A principal função é agir como uma barreira, fornecendo proteção contra impactos, variação de temperatura, microrganismos, radiação e agentes químicos. Outra função deste órgão é a regulação, pois controla aspectos fisiológicos como a temperatura, por meio do suor e dos pelos, e também atua como reservatório para a síntese de vitamina D. A pele também é responsável pela sensibilidade do corpo, já que possui uma extensa rede de células nervosas que detectam mudanças no ambiente, com diferentes receptores para cada tipo de sensação: frio, calor, toque e dor (Tortora e Derrickson, 2012; Hess, 2005).

A pele consiste de duas camadas principais, a epiderme e a derme. Abaixo da derme há ainda uma terceira camada chamada tecido subcutâneo adiposo ou hipoderme, sobre a qual se sobrepõem as camadas já citadas, permitindo que a pele se movimente livremente sobre as estruturas mais profundas do corpo (Figura 1). A epiderme é a camada mais fina e superficial da pele e é constituída majoritariamente por queratinócitos. Irrigada por difusão pela derme, não contém vasos sanguíneos. Em contrapartida, tem numerosas terminações nervosas, que a torna extremamente

sensível ao toque. A derme está situada logo abaixo da epiderme e é de 10 a 40 vezes mais espessa. É irrigada por numerosos vasos sanguíneos que possibilitam trazer à epiderme os elementos nutritivos que lhe são necessários. A derme é constituída principalmente de fibroblastos, os quais sintetizam dois tipos de fibras protéicas, o colágeno e a elastina. A elastina é responsável pela característica de flexibilidade da pele, enquanto que o colágeno confere-lhe resistência. A hipoderme é constituída de tecido adiposo, de espessura variável e possui terminações nervosas, vasos sanguíneos, além de elementos celulares. Esta camada sustenta as estruturas e órgãos internos, é responsável pela reserva nutricional da pele, absorve choques e funciona como isolante térmico (Tortora e Derrickson, 2012; Hess, 2005; Mulder *et al.*, 2002).

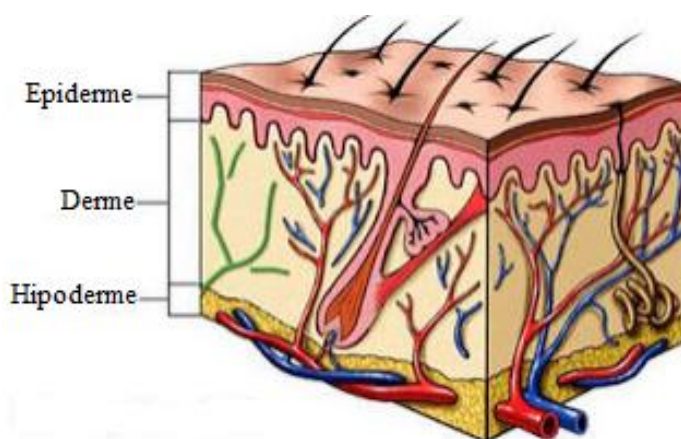


Figura 1: Esquema mostrando as diferentes camadas que constituem a pele (adaptado de Tips for Skin, 2013).

As lesões de pele podem afetar este órgão em diferentes profundidades, comprometendo uma ou mais camadas e desregulando todas as suas funções. Uma lesão de pele é definida como uma descontinuidade na pele, resultante de dano físico ou térmico, ou mesmo de uma condição médica ou fisiológica. O tempo de cura depende do tipo e da extensão da lesão, sendo mais rápido em lesões superficiais e

mais longo em lesões mais profundas (Hess, 2005; Mulder *et al.*, 2002; Boateng *et al.*, 2008).

Lesões de pele podem ser classificadas quanto ao número de camadas da pele que atingem. Uma lesão que afeta apenas a epiderme é chamada de lesão superficial. Quando a lesão afeta tanto a epiderme como a derme, envolvendo vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e folículos capilares, esta é chamada de lesão de espessura parcial. No caso de todas as camadas serem afetadas, inclusive a camada adiposa ou hipoderme, a lesão é classificada como uma lesão de espessura total (Hess, 2005; Boateng *et al.*, 2008).

Há ainda outra classificação que diz respeito ao tempo de cura da lesão. Dessa forma, as lesões são divididas em agudas e crônicas. Nas lesões agudas o tecido danificado acaba por se recuperar por completo e o processo de cura envolve uma série de fases, conhecida como cascata de recuperação. A cascata diz respeito a uma sequência de processos que requer atividades celulares coordenadas, e estes processos são cuidadosamente regulados pelo organismo. O tempo esperado para a completa recuperação de uma lesão aguda é de oito a doze semanas. Dentre as causas das lesões agudas estão os ferimentos mecânicos devidos a fatores externos como abrasão e fricção pelo contato da pele com superfícies duras. Tais ferimentos incluem também os causados pela penetração de objetos como facas, por exemplo, e também por incisões cirúrgicas. São lesões agudas também aquelas causadas por queimaduras, seja por fontes térmicas, agentes químicos corrosivos, eletricidade ou radiação. A temperatura da fonte de calor e o tempo de exposição determinam a gravidade da queimadura. Já as lesões crônicas são aquelas em que o processo normal de recuperação é interrompido em uma das fases da cascata, por isso, com doze semanas ainda não se completou o processo de cura. Essa interrupção na cura pode ocorrer devido a repetidas lesões ao tecido ou mesmo devido a condições fisiológicas do organismo do paciente, como diabetes, infecções persistentes e também a um tratamento inicial do ferimento feito de modo incorreto. Lesões crônicas de pele

incluem úlceras venosas, úlceras por pressão e aquelas agravadas por diabetes (Hess, 2005; Boateng *et al.*, 2008).

A cascata de recuperação da lesão compreende os fenômenos de proliferação e regeneração do tecido. O processo de cura envolve uma série de estágios sequenciais e interdependentes, nos quais uma grande variedade de componentes celulares e matriciais age em conjunto para reestabelecer a integridade do tecido danificado. Esses estágios são descritos como hemostase, inflamação, migração, proliferação e maturação. A hemostase ocorre imediatamente após a ocorrência da lesão e corresponde à formação de uma rede de fibrina que cessa o sangramento na região. Na hemostase já se inicia a liberação de exsudato, que é basicamente o sangue sem suas células vermelhas. A presença do exsudato é de grande importância na cura da lesão, tendo em vista que este proporciona um ambiente úmido, fornece nutrientes ao local e ajuda a prevenir a proliferação de bactérias. A fase inflamatória vem a seguir e tem duração de quatro a seis dias. Esta fase é marcada pela mobilização dos sistemas de defesa do organismo: leucócitos e macrófagos se dirigem ao local do ferimento, combatendo e impedindo a proliferação de bactérias. Em lesões crônicas geralmente a recuperação é interrompida na fase inflamatória. Em seguida vem a etapa de migração de células epiteliais e fibroblastos à área atingida a fim de substituir o tecido danificado. Na etapa de proliferação, forma-se o tecido de granulação enquanto o colágeno é sintetizado pelos fibroblastos, devolvendo à pele resistência e forma. A última fase é a de maturação, que pode durar de 21 dias a meses ou anos. Nesta fase final, a densidade celular e a vascularização da lesão diminuem, enquanto há a maturação das fibras colágenas. Ocorre uma remodelação do tecido cicatricial formado na fase anterior. O alinhamento das fibras é reorganizado a fim de aumentar a resistência do tecido e diminuir a espessura da cicatriz. (Boateng *et al.*, 2008; Hess, 2005)

Com o objetivo de auxiliar, agilizar e melhorar o processo natural de cura de uma lesão utilizam-se os curativos. O curativo mais adequado a ser usado em determinado ferimento depende de uma série de características extrínsecas e

intrínsecas à lesão. Devem ser considerados fatores como o tamanho, profundidade, quantidade de exsudato liberado, presença de infecção, estágio de recuperação em que se encontra a lesão, entre outros. No momento da escolha do curativo, devem ser levados em conta também seu valor e sua disponibilidade, bem como a necessidade de troca frequente do mesmo. Há muitos tipos de curativos no mercado, e nenhum deles sozinho é capaz de tratar qualquer tipo de lesão, ou seja, cada lesão requer um determinado tipo de curativo, com diferentes especificações (Franco e Gonçalves, 2008; Broussard e Powers, 2013).

Existe a necessidade de desenvolvimento de novos curativos especialmente em alguns casos nos quais as exigências em relação a estes dispositivos são maiores, como por exemplo, para pacientes com lesões de pele crônicas, como úlceras venosas e úlceras de pressão e também no caso de vítimas de queimaduras. Todos os anos, pelo menos 1 milhão de pessoas são vítimas de queimaduras no Brasil, segundo o Sistema de Informação em Saúde (SIS, 2013). Em se tratando de pacientes diabéticos, existe uma maior ocorrência de infecções e complicações nas lesões de pele. A diabetes é um fator de risco para pacientes com queimaduras e também tende a agravar lesões crônicas (Andrade *et al.*, 2013). De acordo com este cenário, é possível verificar a importância da pesquisa para o desenvolvimento e aprimoramento de curativos utilizados no tratamento de lesões de pele.

## **2.2. O uso de curativos no tratamento de lesões de pele**

Os curativos têm sido extensivamente usados ao longo dos séculos para o tratamento de lesões de pele. A princípio aplicavam-se os curativos às lesões com o objetivo apenas de protegê-las do ambiente externo. No entanto, com o passar do tempo, o conhecimento a respeito da fisiologia das lesões e de seu processo de cura fez com que curativos mais sofisticados pudessem ser desenvolvidos. Hoje em dia, os curativos podem não só desempenhar o papel de protetores das feridas, mas também

participar ativamente do processo de recuperação das lesões. Os curativos são empregados tanto para proteger o local do ferimento contra lesões mecânicas e contaminação por microrganismos, quanto para propiciar um meio adequado ao processo de cura, que inclui a restauração da epitelização e a formação de colágeno (Ehrenreich e Ruszczak, 2006; Mulder *et al.* 2002).

Para proporcionar o ambiente mais adequado à cura da lesão, o curativo ideal deve apresentar certas características, que incluem (i) ausência de antigenicidade e de toxicidade local ou sistêmica; (ii) compatibilidade com o tecido; (iii) impermeabilidade a microrganismos exógenos e inibição da flora bacteriana na superfície da lesão; (iv) transmissão de vapor d'água similar à pele normal; (v) adaptabilidade às irregularidades da superfície; (vi) elasticidade para permitir a mobilidade do tecido; (vii) resistência a tensões cisalhantes e à ruptura; (viii) manutenção da temperatura e umidade fisiológicas no local da lesão; (ix) capacidade de absorção do exsudato, quando necessário; (x) facilidade de aplicação e remoção (para curativos temporários); (xi) biodegradabilidade (para curativos permanentes); (xii) propriedade de translucidez, para permitir a observação direta do ferimento; (xiii) minimização da ocorrência de infecções; (xiv) minimização dos cuidados com a lesão e do desconforto do paciente; (xv) redução do tempo de cura; (xvi) aceitação do paciente; (xvii) baixo custo; (xviii) exigências mínimas para armazenagem e longo prazo de validade (Mulder *et al.* 2002; Ehrenreich e Ruszczak, 2006; Jayakumar *et al.*, 2011; Broussard e Powers, 2013).

Muitos materiais de origem natural já foram utilizados como curativos como, por exemplo, teias de aranha, cascas e folhas de árvores, mel de abelhas, gordura animal e vários outros. As gazes e bandagens em geral são os curativos clássicos, empregados com o objetivo de proteção da lesão. A partir do século XX, todavia, especialmente a partir da década de 80, avanços na tecnologia de produção de curativos trouxeram ao mercado uma grande variedade de novos curativos. A maior parte dessas novas tecnologias se baseia no princípio de que o ambiente para cicatrização deve ser mantido sempre úmido, pois nesta condição evita-se a infecção por bactérias, uma vez que o ambiente é rico em leucócitos, além de citocinas, fatores de crescimento e



proteínas (Stashak *et al.*, 2004; Broussard e Powers, 2013). Assim, há uma ampla gama de opções de curativos à disposição dos profissionais da saúde, porém, ainda assim, muitos novos tipos vêm sendo constantemente desenvolvidos, a fim de satisfazer a maior quantidade possível dos requisitos necessários a um curativo ideal (Weller e Sussman, 2006; Mulder *et al.* 2002).

Os curativos podem ser classificados quanto à função que exercem na lesão (debridante, antibacteriano, oclusivo, absorvente, aderente), quanto ao tipo de material empregado na sua produção (hidrocolóide, alginato, colágeno, etc.) e também quanto à sua forma física (pomada, filme, espuma, gel) (Boateng *et al.*, 2008). Outra classificação diz respeito à interação do curativo com a lesão. De acordo com esta classificação, os materiais usados como curativos são divididos em dois grupos, os inertes e os interativos ou bioativos. Os curativos bioativos são capazes de interagir com o tecido danificado, ajudando a reduzir ou eliminar a dor e os processos inflamatórios que a causam, e estimulando e acelerando o processo de cura. Novas tecnologias de produção de curativos biologicamente ativos incluem a incorporação de princípios ativos de plantas ou fármacos sintéticos, por exemplo, em sua estrutura e têm se mostrado uma excelente alternativa no tratamento de ferimentos crônicos, úlceras venosas, úlceras por pressão e agravadas por diabetes (Weller e Sussman, 2006). A Tabela 1 mostra alguns tipos de curativos comumente usados.

Os polímeros, tanto de origem natural como sintética, vêm ganhando cada vez mais espaço no campo da medicina e cuidados com a saúde. Inúmeros dispositivos médicos, produtos para diagnósticos e descartáveis, que incluem desde suturas a dispositivos de liberação controlada, têm sido desenvolvidos a partir destes materiais e estão presentes em grande quantidade e variedade no mercado (Dee *et al.*, 2002; Kumbar *et al.*, 2014). Seguindo esta tendência, vêm sendo amplamente aplicados também no desenvolvimento de novos curativos para terapia de lesões e queimaduras de pele, já que muitos deles são biodegradáveis e participam de forma ativa da regeneração do tecido lesionado, características que os tornam bastante atrativos do ponto de vista da biocompatibilidade (Boateng *et al.*, 2008; Mogosanu, 2014).

Tabela 1: Curativos comumente usados, suas características e indicações de uso (adaptado de: Moon e Crabtree, 2003; Weller e Sussman, 2006).

<b>Tipo de Curativo</b>	<b>Características</b>	<b>Indicações</b>
Alginatos	Formam um gel de alginato quando em contato com o exsudato, ambiente de cicatrização úmido	Lesões moderada e altamente exsudativas, queimaduras de espessura parcial e plena
Espumas poliméricas	Permeáveis a fluidos e gases, não-aderentes	Lesões agudas ou crônicas com grande quantidade de exsudato, úlceras venosas, lacerações
Filmes poliméricos	Elásticos e transparentes, permitem inspeção visual da lesão. Permeáveis a gases, mas impermeáveis a bactérias e líquidos	Lesões agudas de espessura parcial ou plena, com pequenas quantidades de exsudato. Queimaduras superficiais, incisões cirúrgicas
Hidrocolóides	Promovem debridamento e absorvem exsudato moderadamente, formando uma camada coloidal viscosa que previne aderência excessiva à lesão	Lesões levemente ou moderadamente exsudativas, que requerem debridamento. Úlceras venosas, de pressão, queimaduras, suturas
Hidrogéis	Contêm grande quantidade de água, o que promove sua biocompatibilidade. Assemelham-se à matriz extracelular tanto em suas propriedades físico-químicas quanto mecânicas	Lesões minimamente exsudativas como pequenas queimaduras e lacerações, além de úlceras crônicas com quantidade de exsudato reduzida
Pós e pastas absorventes	Altamente absorventes	Lesões crônicas de espessura plena, com grandes quantidades de exsudato

### 2.3. Polímeros usados na obtenção de curativos

A conferência dos Institutos Nacionais de Saúde norte-americanos (National Institutes of Health, NIH), definiu um biomaterial como “qualquer substância (que não seja um fármaco) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que podem ser utilizadas em qualquer período de tempo, como um todo ou como uma parte do sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Os biomateriais podem ser obtidos a partir de diferentes matérias-primas, como metais, cerâmicas, vidros e polímeros (Dee *et al.*, 2002).

Devido às suas propriedades funcionais e relativa flexibilidade na sua síntese, os polímeros são a matéria-prima mais empregada para a obtenção de biomateriais utilizados como curativos (Ramalingam e Ramakrishna, 2006). Para que seja utilizado na fabricação de um curativo, um polímero deve atender a alguns requisitos básicos: deve ser inerte, não tóxico, biocompatível, biodegradável e possuir propriedades de superfície favoráveis à proliferação celular. Dentre tais propriedades estão a elevada área de superfície, a alta porosidade e a estabilidade mecânica (Chung e Park, 2007). Tendo em vista estas exigências, os polímeros são usados com sucesso para a aplicação em curativos e podem ser tanto de origem natural, os chamados biopolímeros, quanto de origem sintética.

Os biopolímeros podem ser obtidos de diferentes fontes, sendo elas de origem vegetal, animal ou mesmo de algas, além de vias fermentativas e processos enzimáticos. Normalmente, estes materiais possuem maior biocompatibilidade e menor imunogenicidade quando comparados aos de origem sintética para o uso em aplicações médicas. A maior compatibilidade se deve à presença de compostos denominados ligantes, que fazem parte da matriz polimérica e são capazes de se ligar a receptores nas células. A degradação dos biopolímeros depende de processos enzimáticos e por isso sua taxa pode variar de paciente para paciente (Cheung *et al.*, 2007). Exemplos de biopolímeros usados com frequência na produção de curativos são a quitosana, o alginato, a xantana, a goma guar, o colágeno, entre outros.

Os polímeros sintéticos possuem vantagem sobre os de origem natural porque são mais flexíveis e processáveis conforme as necessidades de sua aplicação. Estes polímeros são facilmente adaptáveis para exercer uma grande variedade de propriedades funcionais, sendo possível manipular, por exemplo, suas propriedades mecânicas (como a viscoelasticidade) e sua degradabilidade. Além disso, é possível modelá-los conforme as necessidades de forma e de tamanho. Para este tipo de polímeros, a degradabilidade está relacionada à hidrólise (de ligações éster, na maioria dos casos), portanto, a taxa de degradação não varia de paciente para paciente, a não ser no caso de inflamações locais que possam causar variações de pH. Outra vantagem dos polímeros sintéticos é que eles são mais baratos e representam uma fonte mais confiável de matérias-primas (Chen *et al.*, 2008; Bhardwaj e Kundu, 2010; Liu *et al.*, 2007). Dentre os polímeros sintéticos mais usados em aplicações médicas podemos citar o ácido poli-lático (PLA), o ácido poli-glicólico (PGA) e seus copolímeros, e também a policaprolactona (PCL), todos aceitos pela U. S. Food and Drug Administration (FDA) para o uso no corpo humano.

Neste trabalho, dois biopolímeros, a quitosana e a goma guar, e um polímero de origem sintética, a policaprolactona, serão o foco do estudo. Estes polímeros já vêm sendo estudados e aplicados na área de terapia de lesões e engenharia de tecidos, conforme descrito nos tópicos a seguir.

### **2.3.1. Quitosana**

A quitosana é um polissacarídeo linear e semicristalino, com massa molar variando entre 10 e 1.000 kDa. Sua estrutura química consiste de um copolímero formado por unidades de N-acetil-D-glicosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ . Não é um polímero comumente encontrado na natureza, mas pode ser facilmente obtido de outro polímero natural, a quitina, por meio da desacetilação. O

grau de desacetilação corresponde à quantidade de grupos amino e é determinado pela razão entre os grupos D-glicosamina e a soma de N-acetil glicosamina e D-glicosamina presentes na cadeia do polissacarídeo. Na quitina, o grau de acetilação é tipicamente igual a 0,9, indicando a presença de alguns grupos amino (de 5 a 15%). As estruturas da quitina e da quitosana são mostradas na Figura 2. O grau de desacetilação mínimo para que a quitina passe a ser considerada quitosana é de 60%, sendo que em algumas publicações encontradas na literatura este valor pode ser considerado de até 75% (Croisier e Jérôme, 2013; Dash *et al.*, 2011; Pillai *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2007).

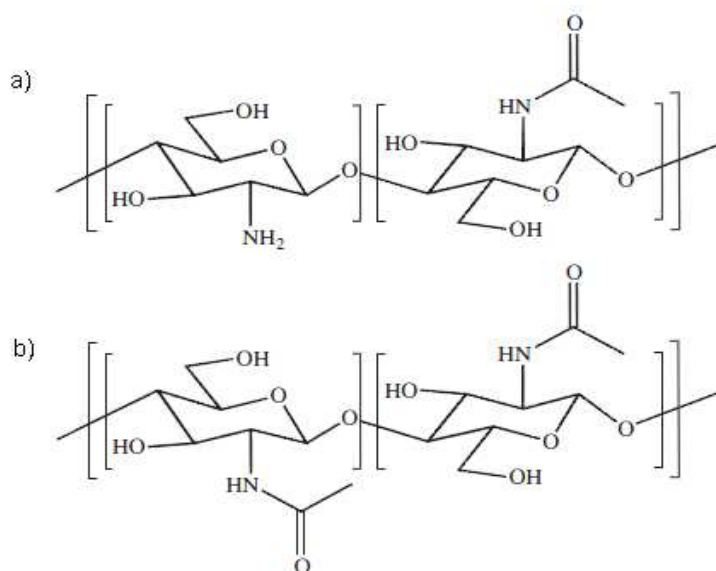


Figura 2: Estruturas químicas da quitosana (a) e da quitina (b) (Croisier e Jérôme, 2013).

Depois da celulose, a quitina é o composto orgânico mais abundante na natureza (Dash *et al.*, 2011). É o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo, a lagosta e o camarão. Pode ser encontrada também em alguns insetos, moluscos, e na parede celular de alguns fungos. Aquela proveniente dos fungos é vantajosa, pois possui massa molar dentro de uma faixa mais estreita, e do ponto de vista alergênico, é preferível em relação à proveniente de crustáceos para a

aplicação médica (Croisier e Jérôme, 2013). No entanto, a maior parte da quitosana comercializada é obtida a partir dos resíduos da indústria de processamento de crustáceos, nomeadamente a indústria alimentícia, já que esta é a fonte economicamente mais viável. O processamento inicial da quitina, que tem como objetivo separá-la dos outros componentes da carapaça, se dá em três etapas, sendo estas a desmineralização, a desproteínização e a descoloração. Na desmineralização, solução diluída de HCl é utilizada a fim de remover o carbonato de cálcio do material. Na etapa de desproteínização, as carapaças são tratadas com NaOH em elevadas temperaturas a fim de dissolver as proteínas presentes. A descoloração pode ser feita com  $\text{KMnO}_4$ , ácido oxálico, clorofórmio ou acetona, por exemplo. A quitina obtida, um biopolímero contendo grupos acetil ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) é então desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana (Figura 3). As condições da desacetilação determinam a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana produzida e estes são os parâmetros que mais influenciam as características deste polissacarídeo. Todavia, essas características podem ser posteriormente alteradas, por exemplo, o grau de desacetilação pode ser diminuído por uma reação de reacetilação e a massa molar pode também ser diminuída por despolimerização ácida. (Dash *et al.*, 2011; Spin-Neto *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2004; Goycoolea *et al.*, 2000).

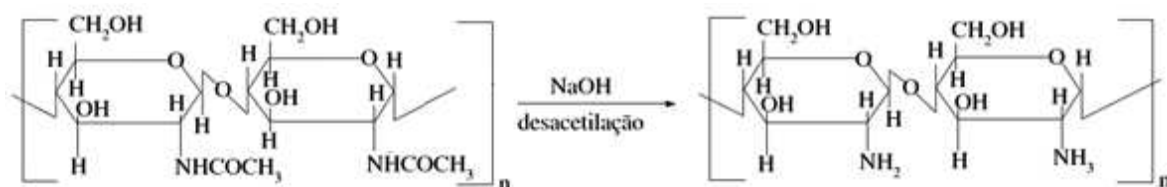


Figura 3: Desacetilação da quitina, dando origem à quitosana (Spin-Neto *et al.*, 2008).

A presença de grupos amino na estrutura da quitosana a diferencia da quitina e lhe confere propriedades peculiares. A quitina é altamente hidrofóbica e insolúvel em

água e na maioria dos solventes orgânicos e a quitosana, por sua vez, é solúvel em ácidos diluídos como o ácido acético, o ácido fórmico, etc. Isso acontece porque os grupos amino dos resíduos de D-glicosamina podem ser protonados, tornando a quitosana solúvel em meios ácidos diluídos cujo pH está abaixo de 6. Quanto maior a quantidade de grupos protonados, maior a quantidade de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e, conseqüentemente, maior sua solvatação em água. O pH é capaz de alterar significativamente as cargas da quitosana e suas propriedades. Em baixo pH, como já descrito, ocorre a protonação dos grupos amino e o aumento da solubilidade da quitosana. Já em pH maior que 6,5, esses grupos são desprotonados, o polímero perde sua carga e se torna insolúvel. A transição do estado solúvel para insolúvel ocorre em pH próximo de 6,5 (aproximadamente o pKa da quitosana), dependendo do grau de desacetilação e da massa molar da quitosana (Figura 4) (Croisier e Jérôme, 2013; Dash *et al.*, 2011; Spin-Neto *et al.*, 2008).

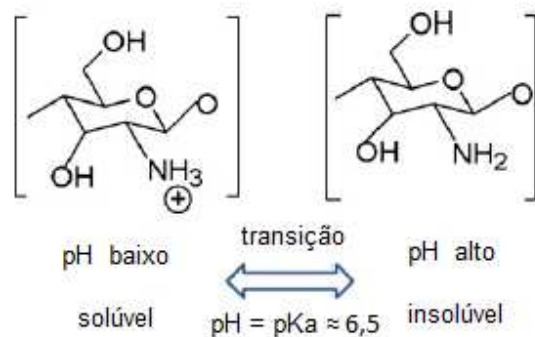


Figura 4: Comportamento da quitosana em função do pH: em pH menor que 6 os grupos amino da quitosana estão protonados, conferindo-lhe caráter policatiónico. Em pH maior que 6,5, estes grupos estão desprotonados, tornando a quitosana insolúvel (adaptado de Dash *et al.*, 2011).

Devido à presença dos grupos amino protonados, a quitosana é um polieletrólito do tipo policatión, sendo, portanto, capaz de formar complexos com uma grande variedade de compostos aniônicos, de origem tanto natural como sintética, como íons, proteínas, lipídeos, DNA, metais (pelo intermédio de agentes quelantes) e

alguns polímeros negativamente carregados. A quitosana é na verdade o único polissacarídeo de ocorrência natural com característica policatiônica. Esta capacidade de formar complexos polieletrólitos (PECs) faz com que a quitosana seja aplicada em diversas áreas, dentre as quais podem ser citados o tratamento de água, a clarificação de bebidas e também a produção de filmes multicamadas para emprego na área da medicina (Croisier e Jérôme, 2013).

De fato, a quitosana possui muitas propriedades intrínsecas que a tornam interessante para a aplicação na área da medicina, a maioria delas relacionada a esta capacidade de formação de PECs. É um polímero biocompatível, permitindo seu uso em várias aplicações médicas, que incluem implantes e injeções. É biodegradável, sendo que sua degradação se dá no organismo por meio de enzimas, em especial a lisozima, levando à formação de oligossacarídeos não tóxicos que são incorporados às rotas metabólicas e excretados normalmente pelo corpo. Devido às suas cargas positivas em pH fisiológico, a quitosana é também bioadesiva. Além disso, possui propriedades que auxiliam na recuperação de lesões, como os efeitos antibacteriano, antifúngico, analgésico, hemostático e anti-inflamatório (Croisier e Jérôme, 2013; Berger et al., 2004; Dash *et al.*, 2011). A dissolução da quitosana origina géis que podem ser assim utilizados ou modificados e funcionam como componentes em hidrogéis para a utilização como biomateriais (Spin-Neto *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2004). A quitosana pode formar também hidrogéis fisicamente associados, que envolvem interações de natureza não-covalente, do tipo eletrostática, hidrofóbica ou ligações de hidrogênio. Assim, hidrogéis podem ser formados pela complexação física da quitosana com outros polímeros solúveis em água de caráter não-iônico, como por exemplo o poli(vinil álcool) (Croisier e Jérôme, 2013).

Muitos trabalhos já foram publicados com o uso da quitosana no desenvolvimento de dispositivos médicos, desde implantes ósseos e pele artificial a dispositivos de liberação controlada e curativos. Muitos dispositivos à base de quitosana estão disponíveis comercialmente, seja na forma de filmes, géis, cápsulas, microcápsulas, esponjas, soluções ou *scaffolds* (estruturas tridimensionais altamente



porosas capazes de suportar a formação de tecidos) (Jayakumar *et al.*, 2011; Spin-Neto *et al.*, 2008; Croisier e Jérôme, 2013). A quitosana tem mostrado possuir boa biocompatibilidade e efeitos positivos no processo de recuperação de lesões. Como consequência de sua biodegradação, a quitosana libera resíduos de N-acetil-b-D-glicosamina, e este composto atua na inicialização da proliferação de fibroblastos, auxilia na deposição ordenada de colágeno e estimula o aumento dos níveis de ácido hialurônico no local da lesão, o que acelera o processo de cura e cicatrização (McCarty, 1996; Jayakumar *et al.*, 2011). A quitosana é aprovada pelo FDA para o uso em curativos, no entanto, sua compatibilidade com fluidos fisiológicos depende do seu método de preparação, sendo que ela pode conter resíduos de proteínas que podem causar reações alérgicas. A biocompatibilidade aumenta com o aumento do grau de desacetilação e com o aumento do grau de ionização da quitosana (Jayakumar *et al.*, 2011; Spin-Neto *et al.*, 2008; Croisier e Jérôme, 2013).

### **2.3.2. Goma guar**

A goma guar é um polissacarídeo solúvel de carga neutra, extraído do endosperma da semente da planta *Cyamopsis tetragonolobus*. Possui massa molar entre 50 e 8000 kDa. Sua estrutura molecular constitui-se de uma cadeia linear principal formada por resíduos de D-manopirranose ligados, com uma cadeia lateral de D-galactopirranose. Os resíduos de D-manopirranose são ligados entre si por ligações beta 1-4 e os resíduos de D-galactopirranose são ligados à cadeia principal por ligações alfa 1-6, na proporção de 2:1 (Figura 5) (Coviello *et al.*, 2007; Prabakaran, 2011).

A goma guar possui diferentes propriedades físico-químicas que fazem dela um material usado nas mais diversas áreas. Por apresentar-se não tóxica e eficiente como agente espessante e estabilizante, é amplamente utilizada em indústrias como a alimentícia, farmacêutica e biomédica, de cosméticos, de papel, têxtil, petrolífera, entre

outras. Este biopolímero apresenta também propriedades de superfície, interfacial e atividade emulsificante (Rao *et al.*, 2010; Mudgil *et al.*; 2012).

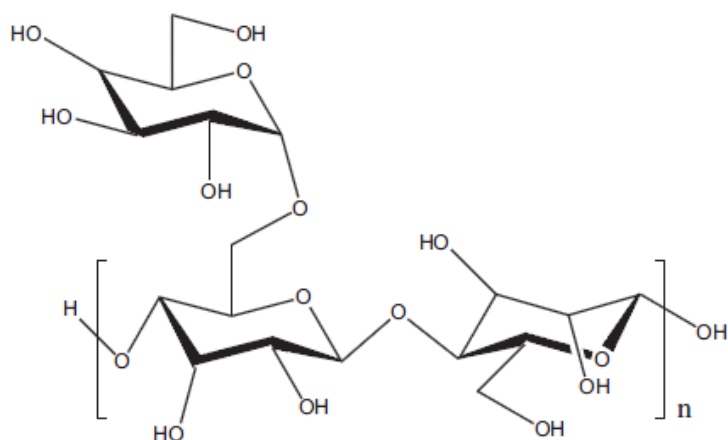


Figura 5: Unidade estrutural da goma guar (Prabaharan, 2011).

A Tabela 2 apresenta algumas aplicações da goma guar nos vários setores da indústria. Em formulações farmacêuticas, a goma guar é usada principalmente como agente ligante, espessante e estabilizante. Várias dessas formulações, incluindo cápsulas, hidrogéis, filmes e nano ou micro-partículas, têm sido exploradas como potenciais matrizes para liberação controlada de fármacos no cólon, por via transdérmica, como carreadores de proteínas e anti-hipertensivos (Prabaharan, 2011).

A goma guar é solúvel em água fria, hidratando-se rapidamente e produzindo uma solução pseudoplástica. É uma goma de alta massa molar e forma soluções bastante estáveis, já que a presença dos resíduos de galactopiranosose ligados à cadeia principal dificulta a aproximação de moléculas de polissacarídeo, evitando que ocorra agregação. Essa propriedade de formar solução de alta viscosidade, considerada gelificante, retarda a liberação de fármacos a partir da matriz de goma guar. Na forma de hidrogel, a goma guar não se mostra apropriada para a liberação de fármacos altamente solúveis em água, pois estes são liberados muito rapidamente. No entanto,

em se tratando de fármacos pouco solúveis em água, esse biopolímero apresenta taxa de liberação adequada de fármacos no cólon (Prabaharan, 2011; Coviello *et al.*, 2007).

Tabela 2: Aplicações da goma guar em vários setores da indústria (Adaptado de Kuravadi *et al.*, 2013).

<b>Setor da Indústria</b>	<b>Função</b>
Explosivos	Plastificante
Têxtil	Espessante
Papel	Floculante
Mineradora	Dispersante
Tabaco	Adesivo
Construção civil	Material à prova d'água
Alimentícia	Espessante, ligante,estabilizante, gelificante
Farmacêutica e cosmética	Estabilizante, ligante, dispositivo de liberação controlada de fármacos

### **2.3.3. Complexo Quitosana – Goma guar**

A sinergia entre os biopolímeros quitosana e goma guar tem sido estudada e aplicada no desenvolvimento de dispositivos médicos e também na área de embalagens ligada ao setor alimentício. A combinação da goma guar com a quitosana pode ser interessante porque acarreta em melhora significativa da resistência mecânica, propriedade importante para estas aplicações, em relação à observada para os filmes de quitosana isolada. De fato, Salgado *et al.* (2012) e Dallan (2005) obtiveram filmes de quitosana com tensão na ruptura de 3,10 MPa e 7,16 MPa, respectivamente. Já Veiga (2012), obteve filmes de quitosana e goma guar com tensão na ruptura de 23,84 MPa.

A formação do complexo entre estes dois biopolímeros se dá provavelmente devido a interações entre os grupos hidroxila presentes na estrutura da goma guar e os grupos amino (Veiga, 2012) e hidroxila da quitosana. Esta interação, no entanto, não forma um complexo do tipo polieletrólito, já que o grupo hidroxila na goma guar não se ioniza. Nesse caso, pode-se dizer que ocorre a formação de um hidrogel fisicamente associado entre os dois biopolímeros, possivelmente por ligações de hidrogênio.

Haupt *et al.* (2006) produziram filmes de quitosana e goma guar e estudaram sua ação como matriz de liberação controlada do fármaco celecoxib (vide estrutura química no Anexo I), usado na terapia do câncer colorretal, observando redução na proliferação das células cancerígenas.

Randhawa *et al.* (2012) desenvolveram tabletes de quitosana e um derivado da goma guar, a carboximetil-goma guar, para a liberação controlada de tamoxifeno (vide estrutura química no Anexo I) no cólon, observando que o fármaco foi liberado com sucesso e a uma taxa satisfatória no local desejado.

Rao *et al.* (2010) prepararam filmes de quitosana e goma guar com a finalidade de aplicá-los como embalagens na indústria alimentícia. A proporção entre os dois biopolímeros foi variada e propriedades como transparência, taxa de transmissão de vapor, permeabilidade ao oxigênio, bem como propriedades mecânicas e antibacterianas foram analisadas. Como resultado, os autores obtiveram filmes apropriados à aplicação desejada e concluíram que estes filmes reduzem os problemas ambientais associados às embalagens sintéticas.

Veiga (2012) produziu membranas de quitosana e goma guar a fim de obter dispositivos para a liberação controlada de anti-inflamatórios. A associação de quitosana com a goma guar resultou em membranas estáveis. Os resultados obtidos indicaram que membranas com capacidade de absorção de soluções de até 2 g de H<sub>2</sub>O por grama de membrana, com perda de massa máxima de até 8% (em fluido corpóreo simulado) e permeabilidade ao vapor d'água em torno de 1,2 kg m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> foram obtidas. A eficiência de incorporação dos anti-inflamatórios às membranas de quitosana e goma guar foi baixa, o que a autora atribuiu à densa estrutura polimérica destas membranas.

### 2.3.4. Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático e linear cuja massa molar pode variar de 3 a 90 kDa. É um polímero hidrofóbico e semi-cristalino, sendo que sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento de sua massa molar. A síntese da PCL pode ser feita pela polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona, com a abertura do anel em uma reação de polimerização que envolve a presença de calor e de um catalisador cujo caráter pode ser tanto aniônico como catiônico (Figura 6) (Woodruff e Hutmacher, 2010; Peña et al., 2006; Luong-Van et al., 2006).

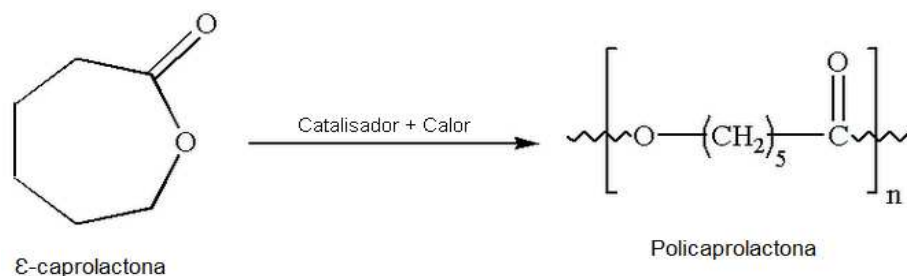


Figura 6: Representação da reação de polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona para formar a policaprolactona.

Como todos os biopolímeros da classe dos sintéticos, a PCL pode ter sua síntese manipulada de modo a tornar-se um polímero adequado às necessidades do uso desejado. Sua massa molar, taxa de degradação, propriedades mecânicas e estruturais, tais como o tamanho dos poros, podem ser ajustadas e controladas. Grupos funcionais também podem ser adicionados, de modo a tornar a matriz mais hidrofílica, adesiva, ou biocompatível, por exemplo (Peña et al., 2006).

A PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano a temperatura ambiente, logo, estes são os solventes mais utilizados em suas formulações farmacêuticas. Possui

solubilidade baixa em acetona, 2-butanona, etil acetato dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em água, álcool, éter de petróleo e éter dietílico.

Por ter um tempo de degradação considerado relativamente alto (2-4 anos), a PCL, que foi muito estudada nas décadas de 70 e 80, acabou por deixar o cenário das pesquisas no campo da medicina, mais especificamente na engenharia de tecidos e desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada. No entanto, a partir dos anos 2000 o interesse por este biopolímero foi retomado, e muitos trabalhos vêm sendo publicados com o uso da PCL. Isso aconteceu porque a PCL possui propriedades reológicas e viscoelásticas superiores a outros polímeros da mesma categoria, o que a torna mais fácil de manipular para obter uma ampla gama de *scaffolds* utilizados em terapia de lesões. Tais produtos podem ser obtidos por diversas tecnologias e são relativamente mais baratos quando comparados com aqueles obtidos a partir de outros poliésteres alifáticos. Além disso, muitos dispositivos de liberação controlada produzidos com a utilização deste polímero já possuíam a aprovação do FDA, facilitando a introdução de mais produtos originados desta matéria-prima no mercado (Woodruff e Hutmacher, 2010).

A taxa de degradação da PCL pode ser manipulada pela sua copolimerização com lactonas ou glicolídeos e lactídeos. A degradação deste biopolímero se dá em duas etapas, sendo que, na primeira ocorre a hidrólise não enzimática dos grupos éster e, na segunda, fagossomos e macrófagos promovem sua degradação intracelularmente. Isso indica que a PCL pode ser completamente absorvida pelo organismo do paciente, uma vez que sua massa molar já tenha sido reduzida a pelo menos 3 kDa (Woodruff e Hutmacher, 2010). Peña *et al.* (2006) estudaram o comportamento de filmes de PCL, obtidos tanto por *casting* em solução de clorofórmio como por modelagem por pressão, em solução tampão de fosfato (PBS) e no meio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM), observando que neste último meio, após 18 meses houve alteração na estrutura química do filme, mas as camadas mantiveram sua consistência e, além disso, que uma taxa de degradação mais elevada foi apresentada pelas membranas obtidas pelo *casting* em solução de clorofórmio.

Devido à sua excelente biocompatibilidade e sua habilidade de ser absorvida pelo organismo, mesmo que em longo prazo, a PCL se mostra adequada para o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada, uma vez que também possui alta permeabilidade a muitos fármacos e compostos bioativos. A taxa de liberação do fármaco a partir da matriz de PCL depende do tipo de formulação, método de preparo, concentração do biopolímero, tamanho do dispositivo e porcentagem de fármaco incorporado (Woodruff e Hutmacher, 2010; Luong-Van et al., 2006).

Ng *et al.* (2007) produziram filmes ultrafinos de PCL a fim de avaliar sua biocompatibilidade *in vivo* e viabilidade no uso como curativos. Os filmes resultantes não induziram reações inflamatórias quando usados *in vivo* como curativos e auxiliaram o processo normal de recuperação de lesões de pele de espessura parcial e total.

Luong-Van *et al.* (2006) incorporaram heparina (vide estrutura química no Anexo I) a matrizes de PCL obtidas pela técnica de *electrospinning* e observaram que estas são adequadas para o funcionamento como dispositivos de liberação controlada da heparina em lesões vasculares. A heparina possui caráter hidrofílico e estrutura polimérica, tendo aquela utilizada no estudo massa molar igual a 13 kDa. Os autores observaram que aproximadamente 50% da heparina incorporada à matriz de PCL foi liberada em um período de 14 dias. Tendo em vista que a heparina não possui afinidade pela matriz de PCL, que é hidrofóbica, pode-se dizer que a liberação do composto a partir do dispositivo ocorre em quantidade considerável, no entanto, esta quantidade não é maior porque, devido ao grande tamanho da molécula de heparina, a sua difusão pela matriz é dificultada. No caso do alfa-bisabolol, composto em estudo no presente trabalho, espera-se que a liberação ocorra de forma diferente, uma vez que este composto, como será visto mais adiante, possui massa molar pequena e, além disso, caráter hidrofóbico. O tamanho pequeno da molécula facilitaria a difusão do composto pelo filme, no entanto, o caráter de hidrofobicidade compatível com a matriz promoveria maior retenção.

Khor *et al.* (2002) desenvolveram filmes de PCL e testaram-nos como *scaffolds* para o cultivo e proliferação de células de queratinócitos humanos. Os resultados

indicaram que os filmes suportam a aderência e proliferação de tais células e têm potencial para serem aplicados como matrizes na engenharia de tecidos.

Salgado *et al.* (2012) produziram membranas de quitosana-PCL em diferentes proporções, na presença e na ausência do surfatante Pluronic F68<sup>®</sup> (vide estrutura química no Anexo I), adicionado à mistura na tentativa de melhor dispersar os polímeros e também de aumentar a porosidade do material. As membranas foram avaliadas quanto às suas propriedades físicas, físico-químicas, mecânicas e biológicas. A análise da morfologia dos filmes obtidos mostrou que partículas esféricas de PCL ficaram heterogeneamente distribuídas na matriz de quitosana. Além disso, os resultados mostraram que as membranas produzidas apresentaram baixa citotoxicidade e, as que continham Pluronic F68<sup>®</sup>, maior proliferação celular. A biodegradabilidade e biocompatibilidade dos filmes foram consideradas satisfatórias e, portanto, as membranas apresentaram aplicação potencial na terapia de lesões.

Tornello *et al.* (2012) produziram membranas porosas e não porosas de PCL, obtidas pelas técnicas de *electrospinning* e evaporação do solvente, respectivamente, e incorporaram o agente antimicótico hidrofóbico embelina (vide estrutura química no Anexo I). As eficiências de incorporação obtidas foram de 83% e 98% no caso das membranas porosas e não porosas, respectivamente. Os autores observaram que a biodisponibilidade do agente bioativo incorporado era maior para as membranas porosas, sendo que, neste caso, 90% da embelina retida foi liberada em 12 horas, enquanto que a mesma quantidade foi liberada em 72 horas pelas membranas não porosas. Espera-se que, no presente trabalho, a eficiência de incorporação do alfa-bisabolol seja também próxima a 100%, levando em conta que este composto possui massa molar e hidrofobicidade semelhantes às da embelina. Espera-se ainda que a liberação do alfa-bisabolol a partir das matrizes de PCL ocorra também de forma lenta, tendo em vista que as matrizes serão produzidas pelo método de evaporação do solvente e terão, portanto, estrutura densa, o que dificulta o processo de difusão do composto pela matriz.



## 2.4. Incorporação de compostos bioativos aos curativos

A incorporação de compostos bioativos aos curativos pode ser feita de modo a torná-los mais eficazes no tratamento das lesões. Conforme já mencionado na Seção 2.2, os curativos bioativos são capazes de acelerar e auxiliar a cicatrização de uma lesão, e nesta classe de curativos, estão incluídos aqueles aos quais compostos biologicamente ativos são incorporados, sendo assim também chamados de dispositivos de liberação controlada. A liberação controlada é importante, pois minimiza a perda e a degradação do composto ativo e aumenta a disponibilidade na zona tratada (Boateng *et al.*, 2008). A cinética de liberação adequada corresponde à liberação gradual do composto incorporado, o que reduziria a necessidade de administrações frequentes (Veiga, 2012).

Muitos compostos podem ser incorporados aos curativos com este objetivo, dentre eles agentes anti-inflamatórios, antibióticos, antioxidantes, antimicrobianos, antisépticos, fatores de crescimento, suplementos, etc. Tais compostos são capazes de prevenir inflamações e infecções bacterianas, acelerar a recuperação do tecido lesionado e estimular uma recuperação saudável da lesão, além de manter a assepsia do local do ferimento (Dias *et al.*, 2011).

Tanto compostos bioativos de origem natural como sintética são passíveis de ser incorporados aos curativos. As plantas produzem uma grande diversidade de fitoquímicos, que vêm sendo usados há séculos pelos seres humanos no tratamento de diversos tipos de enfermidades. No entanto, com a descoberta de agentes bioativos sintéticos, o uso dos produtos de origem natural foi deixado em segundo plano por muitos anos (Cragg e Newman, 2013, Newman e Cragg, 2007; Patra, 2012). Todavia, o desenvolvimento de resistência de várias linhagens bacterianas a agentes antimicrobianos e antibióticos sintéticos, bem como preocupações a respeito de sua eficácia e segurança reavivaram o interesse pelo uso dos compostos de origem natural como uma alternativa aos sintéticos (Patra, 2012). De fato, a tendência da substituição do uso de compostos sintéticos por produtos naturais no tratamento de doenças,

inclusive lesões de pele, vem sendo bastante observada em trabalhos recentes (Suwantong *et al.*, 2008; Kontogiannopoulos *et al.*, 2011; Suganya *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013; Muthukumar *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Muthukumar *et al.*, 2014; Kwak *et al.*, 2014).

A incorporação de compostos bioativos às matrizes usadas como curativos pode ser feita durante a preparação dessas matrizes, por adição à mistura resultante das soluções dos constituintes da matriz, por impregnação após a preparação da matriz utilizando solventes orgânicos ou aquosos e também por impregnação usando fluidos supercríticos (Veiga, 2012). Os dois primeiros métodos, apesar de simples, possuem algumas desvantagens, como os baixos rendimentos de incorporação, a dispersão heterogênea do composto na matriz e o uso de solventes orgânicos, que devem ser cuidadosamente removidos da matriz produzida, já que podem ser tóxicos e afetar a qualidade do produto final (Dias *et al.*, 2011). Por evitar este problema, o etanol é um solvente orgânico comumente utilizado, pois não apresenta toxicidade quando em contato com a pele. Neste âmbito, matrizes obtidas a partir de biopolímeros hidrofílicos são vantajosas porque, durante seu processamento, solventes de baixa toxicidade são requeridos (Boateng *et al.*, 2008). Por outro lado, a vantagem dos polímeros hidrofóbicos é que eles retêm com maior facilidade compostos que possuem também caráter hidrofóbico.

Apesar da incorporação por adição direta ser um método mais simples e que facilita a distribuição mais homogênea do fármaco pela membrana, o método de impregnação pode ser preferível, já que após o preparo do filme, é possível se incorporar uma gama de diferentes compostos. Além disso, pelo método de impregnação evita-se que se submeta o composto incorporado a condições degradantes usadas durante o processamento da membrana, como na etapa de evaporação do solvente por exemplo. Mesmo sendo necessária uma etapa de evaporação do solvente também no caso da impregnação, a temperatura necessária para isso é mais branda, já que se trata de solventes relativamente voláteis, como o caso em que se utiliza o etanol.

Neste trabalho o objetivo é fazer a incorporação a matrizes poliméricas do alfa-bisabolol, um princípio ativo natural encontrado no óleo essencial de diversas espécies de plantas. Este composto terá sua descrição feita a seguir.

#### **2.4.1. Alfa-bisabolol**

O alfa-bisabolol é um álcool sesquiterpênico monocíclico insaturado natural, isolado pela primeira vez na década de 50 a partir das flores da camomila (*Matricaria chamomilla*). Também chamado de 4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol, possui a fórmula química  $C_{15}H_{26}O$  e massa molar de 222,37 Da. É um líquido levemente amarelado, com aroma adocicado e possui densidade relativamente baixa, em torno de 0,93 g/mL (dependendo da fonte de obtenção), e ponto de ebulição de 314,5 °C a 1 atm. Praticamente insolúvel em água, mas solúvel em etanol, é uma substância de caráter lipofílico, com bastante propensão a se oxidar, sendo os produtos da oxidação os óxidos de bisabolol A e B (Kamatou e Viljoen, 2010).

O alfa-bisabolol existe na forma de quatro diastereoisômeros. A forma mais comum é o alfa-(-)-bisabolol, ou levomenol, sendo este isômero o principal responsável pela atividade biológica do alfa-bisabolol. O isômero alfa-(+)-bisabolol é raro na natureza e o equivalente sintético é geralmente uma mistura de alfa-(±)-bisabolol de no mínimo 42,5% de pureza (Kamatou e Viljoen, 2010; Schilcher *et al.*, 2005 (a), Clark *et al.*, 2011). A estrutura química dos quatro tipos de bisabolol é mostrada na Figura 7. O alfa-(-)-bisabolol pode ser identificado por análise espectrofotométrica em um comprimento de onda de 208 nm (Schilcher *et al.*, 2005 (b)).

O alfa-(-)-bisabolol está presente em várias plantas e pode ser obtido por meio da hidrodestilação. Algumas espécies de plantas que constituem fonte deste composto são *Matricaria chamomilla*, *Matricaria recutita*, *Salvia runcinata*, *Salvia stenophylla*, *Vanillosmopsis pohlii*, *Vanillosmopsis arborea*, *Myoporum grassifolium* e *Eremanthus erythropappus*. O conteúdo de alfa-bisabolol nessas plantas é de 50% a 90% (Kamatou

e Viljoen, 2010). No Brasil, o alfa(-)-bisabolol é majoritariamente obtido após a destilação a vapor do óleo extraído do tronco da árvore Candeia (*Eremanthus erythropappus*) e tem grau de pureza mínimo de 95% (Clark *et al.*, 2011).

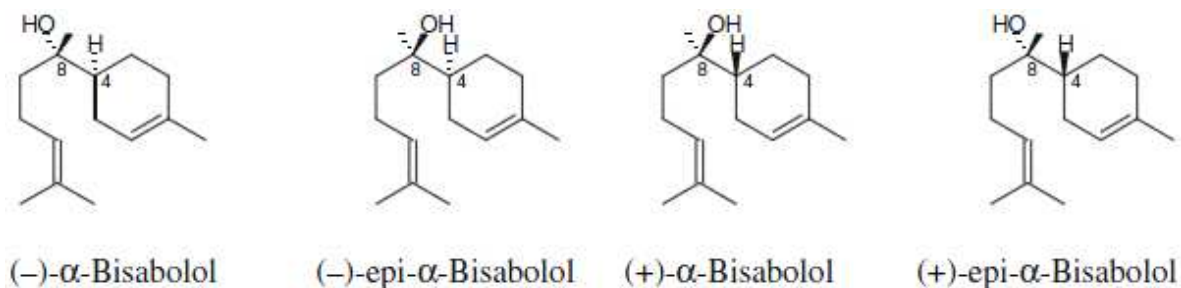


Figura 7: Estrutura química dos quatro diastereoisômeros do alfa-bisabolol. O alfa(-)-bisabolol é a forma mais comum (Kamatou e Viljoen, 2010).

O alfa-bisabolol apresenta uma grande variedade de propriedades biológicas e devido à sua baixa toxicidade recebeu do FDA o certificado GRAS (“*generally recognized as safe*”), sendo por isso um composto bioativo usado em muitas formulações comerciais (Kamatou e Viljoen, 2010). Dentre estas propriedades, destacam-se os efeitos antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, antimutagênico, antiespasmódico, antimalárico, antialergênico, analgésico, antioxidante e anti-inflamatório. Além disso, possui a capacidade de aumentar a permeação de compostos através da pele (Kamatou e Viljoen, 2010; Clark *et al.*, 2011; Petronilho *et al.*, 2012).

De fato, o alfa-bisabolol é uns dos principais responsáveis, pela atividade anti-inflamatória do extrato de camomila (Kamatou e Viljoen, 2010). A atividade antioxidante, por sua vez, se deve à capacidade do alfa-bisabolol de combater radicais livres e restaurar o equilíbrio redox. A atividade antibacteriana ocorre por um mecanismo de ruptura da membrana celular bacteriana, o que aumenta a susceptibilidade das células bacterianas a agentes antibióticos (Petronilho *et al.*, 2012). Brehm-Stecher e Johnson (2003) investigaram a habilidade de quatro sesquiterpenos, dentre eles o alfa-bisabolol,

de aumentar a suscetibilidade da bactéria *Staphylococcus aureus* a alguns antibióticos convencionais (ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina), verificando que baixas concentrações (0,5 a 2 mM) de alfa-bisabolol, nerolidol e apritona aumentaram a suscetibilidade da bactéria aos antibióticos testados.

O alfa-bisabolol é utilizado principalmente em formulações dermatológicas e cosméticas, como loções corporais, filtros solares, loções pós-barba e pós-depilatórias, sabonetes, condicionadores de cabelo, produtos para higiene bucal como cremes dentais e enxaguatórios, produtos para pele acnéica, etc. A dosagem comumente utilizada para estas formulações é de 0,1 a 10% (1 a 10 mg/g de veículo). É usado também em alguns produtos de limpeza como detergentes e em repelentes. Devido às suas muitas propriedades biológicas, vem sendo aplicado no setor farmacêutico (Kamatou e Viljoen, 2010; Clark *et al.*, 2011), no entanto, há poucos relatos na literatura do uso do bisabolol como princípio ativo incorporado a dispositivos de liberação controlada.

São Pedro *et al.* (2009) menciona a incorporação a microesferas de quitosana e lipossomas do óleo essencial de uma planta da espécie *Zanthoxylum tingoassuiba*, rico em alfa-bisabolol. A determinação do bisabolol nos sistemas particulados foi feita por meio de HPLC (do inglês, *high-performance liquid chromatography*), mostrando que a associação entre ele e as microesferas de quitosana e lipossomas foi bem sucedida.

## **2.5. Considerações finais**

Considerando os temas abordados na revisão da literatura, verifica-se que a incorporação de compostos bioativos a matrizes poliméricas para uso como dispositivos de liberação controlada é uma tendência consolidada e muitos trabalhos vêm sendo realizados nesta área. A aplicação destes dispositivos na terapia de lesões pode fornecer materiais de alta eficiência, capazes auxiliar no tratamento e acelerar a cicatrização de lesões de pele.

Neste âmbito, o desenvolvimento de novos dispositivos de liberação controlada contendo compostos químicos biologicamente ativos ainda não testados para a aplicação como curativos mostra ser de grande relevância no cenário dos avanços tecnológicos nos campos da biomedicina e engenharia de tecidos. O alfa-bisabolol é um composto bioativo pouco testado para o uso em curativos, mas possui propriedades biológicas que o torna promissor para esta aplicação. Tendo isso em vista, neste trabalho avaliou-se o uso de materiais tanto de origem sintética (policaprolactona) como de origem natural (quitosana e goma guar) para a incorporação do alfa-bisabolol e estudou-se o desempenho dos dispositivos obtidos visando a aplicação no tratamento de lesões de pele.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana (Q) de carapaça de camarão com grau de desacetilação mínimo de 75% (produto com código C3646, lote nº 061M0046V), goma guar (G, produto com código G4129, lote nº 087K0128) e policaprolactona (PCL) de massas molares médias de 80 kDa (produto com código 440744, lote nº MKBJ4388V) e 60 kDa (produto com código 704105, lote nº MKBB6820), fornecidos pela Sigma-Aldrich Co.; ácido acético glacial, etanol, clorofórmio e cloreto de metileno da Synth, diclorometano e hidróxido de sódio da Merck & Co. Inc. e metanol da J. T. Baker. O alfa-bisabolol de origem natural (óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*), Albi<sup>®</sup>, com teor mínimo de pureza de 95%, bem como o padrão sintético, foram gentilmente doados pela empresa Atina, (Atina – Ativos Naturais, localizada em Pouso Alegre, MG). A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore.

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Caracterização do alfa-bisabolol**

###### *3.2.1.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*

A análise do alfa-bisabolol por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada com o objetivo de se avaliar a composição da amostra

em estudo. Uma amostra de alfa-bisabolol de origem sintética foi também analisada, para fins de comparação com aquela utilizada neste trabalho, cuja origem é natural.

O equipamento utilizado neste ensaio foi um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massas (GC HP6890 - MSD HP5975), com coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), disponíveis no Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp. Um volume de 1,0 µL de amostra foi introduzido no injetor do cromatógrafo, cuja temperatura era de 220 °C. O detector de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons (70eV), a uma temperatura de 250 °C, e hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min. A programação de temperatura foi de 60 °C a 240 °C, a uma taxa de 3 °C/min, em ambas as análises. Os índices de retenção foram calculados a partir do tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C9-C20).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos fragmentogramas e dos índices de retenção obtidos com aqueles fornecidos para o alfa-bisabolol na literatura (Adams, 2007).

### *3.2.1.2. Avaliação da atividade antioxidante do alfa-bisabolol*

#### *3.2.1.2.1. Método do radical ABTS<sup>•+</sup>*

A análise da atividade antioxidante dos extratos ativos, avaliada através da atividade redutora frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> (radical cátion do ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)), foi feita com base na metodologia descrita por Kuskoski *et al.* (2004). Este método baseia-se na degradação do radical ABTS<sup>•+</sup>, de cor azul e extremamente estável, convertendo-o em um produto incolor (vide esquema da reação no Anexo II). O grau de descoloração reflete a quantidade de ABTS<sup>•+</sup> que foi degradado pelo antioxidante e pode ser determinado espectrofotometricamente.



O radical ABTS<sup>•+</sup> foi obtido pela reação de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM, concentração final) incubados a temperatura ambiente e no escuro por 16 horas. Uma vez formado o radical, diluiu-se a solução com etanol até obter um valor de absorvância de aproximadamente 0,7 (±0,1) a 734 nm. A um volume de 2 mL do radical ABTS<sup>•+</sup> adequadamente diluído adicionou-se 20 µL de amostra, dissolvida em etanol, e a solução formada foi então sonicada por 30 segundos. Utilizando-se como branco para medição o etanol, a diminuição da absorvância foi determinada à temperatura ambiente até que a reação atingisse o estado estacionário, ou que a diferença entre as medidas de absorvância fosse menor que 10% (em torno de 10 minutos). A atividade das amostras foi determinada através de uma curva de calibração do antioxidante sintético de referência, ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- carboxílico (Trolox<sup>®</sup>, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, vide estrutura química no Anexo I), analisado nas mesmas condições antes expostas para as amostras.

A porcentagem de redução da absorvância a 734 nm, obtida de acordo com a Equação 1, foi representada de forma comparativa à concentração de Trolox<sup>®</sup>. Nesta equação os parâmetros ABS<sub>i</sub> e ABS<sub>f</sub> são a absorvância inicial do radical e a medida após 10 minutos da adição do composto bioativo, respectivamente. Os resultados obtidos a partir das análises feitas em, no mínimo, triplicata foram expressos como atividade antioxidante dos extratos equivalente à do Trolox<sup>®</sup> (CAET) (sigla para capacidade antioxidante equivalente à do Trolox<sup>®</sup>).

$$\text{Redução (\%)} = \left(1 - \frac{ABS_f}{ABS_i}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 3.2.1.2.2. Método do radical DPPH

Esta metodologia, desenvolvida por Brand-Willians *et al.* (1995) e modificada por Kim *et al.* (2002), baseia-se na redução da absorvância do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-

Difenil-1-picril-hidrazilo) a 515 nm pela ação de compostos antioxidantes. O radical DPPH<sup>•</sup>, de coloração púrpura, quando reduzido forma o composto difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com a conseqüente diminuição da absorbância (vide esquema da reação no Anexo II). Uma alíquota de 50 µL de amostra foi adicionada a 1,45 mL de uma solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> a  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. As amostras foram sonicadas por 30 segundos, realizando-se então a medida das absorbâncias à temperatura ambiente, tendo como branco o metanol, até que a reação atingisse o estado estacionário ou que a diferença entre as medidas de absorbância fosse menor que 10% (em torno de 30 minutos).

A atividade antioxidante das amostras foi também determinada através da capacidade equivalente à do Trolox<sup>®</sup>, analisado nas mesmas condições antes expostas para as amostras. Os resultados obtidos são expressos como atividade antioxidante dos extratos equivalente à do Trolox<sup>®</sup> (CAET). Todas as análises das amostras foram feitas em triplicata.

### **3.2.2. Preparação das membranas**

#### **3.2.2.1. Membranas de quitosana e goma guar**

As membranas de quitosana e guar (Q-G) foram preparadas de acordo com os procedimentos propostos por Haupt *et al.* (2006) e Veiga (2012). Soluções de quitosana (solução aquosa de ácido acético a 2% v/v) e de goma guar (solução aquosa) em concentração de 0,5% (m/v) foram utilizadas. O volume empregado de cada solução foi de 90 mL, sendo a solução de quitosana adicionada por meio de uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson) à solução de goma guar em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm, a uma vazão de 300 mL/h. A temperatura foi mantida, durante todo o processo, em 25°C utilizando-se um banho termostático (214 M2, Quimis). Durante o gotejamento, o sistema foi mantido

sob agitação constante de 1000 rpm através de agitador mecânico (251 D, Quimis) com hélice do tipo naval com raio de 2,5 cm. Ao término da adição da solução de quitosana à de goma guar, a mistura polimérica foi desaerada em bomba de vácuo (Q-355B2, Quimis) por 120 minutos, transferida para placa de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro e fez-se a evaporação do solvente por 24 horas a 37°C em estufa com circulação de ar (410D, Nova Ética). A membrana foi então lavada por 1 minuto com 100 mL de NaOH 1M 1:1 v/v (água:etanol) para a neutralização do ácido acético e posteriormente com água (duas vezes em 200 mL por 30 minutos cada vez). A secagem final foi feita por 24 horas à temperatura ambiente. O esquema experimental é mostrado na Figura 8.

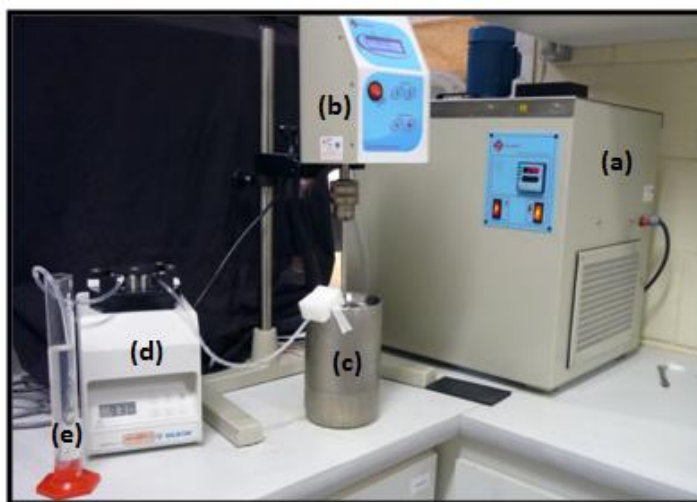


Figura 8: Sistema utilizado para a preparação das membranas. (a) Banho termostático; (b) sistema de agitação; (c) reator contendo a solução de goma guar; (d) bomba peristáltica; (e) solução de quitosana a ser alimentada (adaptado de Veiga, 2012).

### 3.2.2.2. Membranas de policaprolactona

Visto que há variados procedimentos de obtenção de filmes de PCL descritos na literatura (Tornello *et al.*, 2012; Lin e Lu, 2002; Luong-Van *et al.*, 2006; Ng *et al.*,

2007; Peña *et al.*, 2006), ensaios preliminares foram inicialmente realizados a fim de se estabelecer o protocolo de preparação das membranas mais apropriado para o estudo proposto. O solvente utilizado para a solubilização da PCL, a concentração do polímero e sua massa molar, bem como o volume de solução utilizado foram variados, e as membranas resultantes das diversas formulações tiveram sua aparência e integridade avaliadas. Os solventes testados foram clorofórmio, cloreto de metileno, diclorometano, além da mistura de diclorometano e metanol na razão de 1:1 v/v. A concentração do polímero foi variada na faixa de 0,5 a 10% (m/v) e as massas molares de 60 e 80 kDa foram testadas.

Após preparada a solução polimérica pela dissolução dos pellets de PCL no solvente utilizado, sob agitação magnética, esta era desaerada por 10 minutos em sonicador e então vertida em placa de Petri de diâmetro de 9 cm. As placas foram deixadas, à temperatura ambiente, em plataforma giratória no interior de uma capela por 24 horas para que ocorresse a completa evaporação do solvente.

### **3.2.3. Incorporação de alfa-bisabolol às membranas**

#### *3.2.3.1. Incorporação do composto durante a preparação das membranas*

A incorporação do alfa-bisabolol às membranas de Q-G foi feita imediatamente após o término da mistura das soluções poliméricas. A quantidade de alfa-bisabolol adicionada a estas membranas foi equivalente a 20% e 30% em massa em relação à massa total de polímeros presentes na mistura.

Para as membranas de PCL, a incorporação foi realizada para a formulação considerada mais adequada, obtida de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.2.2. O composto foi adicionado no momento do preparo da solução e neste caso foi feita a adição do composto apenas na proporção de 20% (m/m). Estas proporções

foram escolhidas a fim de evitar que a massa do composto adicionado interferisse na formação das matrizes poliméricas.

#### *3.2.3.2. Incorporação do composto por impregnação em solução etanólica*

Este método foi utilizado apenas para a incorporação do alfa-bisabolol a membranas de Q-G, não tendo sido aplicado para a incorporação nos filmes de PCL.

Amostras de 1 cm x 1 cm previamente armazenadas em dessecador a 22% de umidade foram utilizadas. A armazenagem em dessecador nessa condição de umidade foi feita a fim de garantir que as amostras tivessem uma quantidade pequena de água residual em sua estrutura, assegurando assim a existência de espaço disponível para a entrada das moléculas do composto a ser incorporado em condições não hidrofílicas. As amostras foram pesadas para determinação de sua massa inicial e incubadas por 1 hora em shaker a 25 °C e 100 rpm em 4 mL de solução etanólica contendo ou não (branco) o composto a ser incorporado. Foi estabelecido o uso de soluções de alfa-bisabolol nas concentrações de 0,075; 1,2, 3,0, e 7,5 mg/mL. Após passado o tempo de incubação, as amostras foram secas a 25 °C por 30 minutos e pesadas para determinação de sua massa final. A solução etanólica remanescente foi colocada em uma cubeta de quartzo e levada ao espectrofotômetro para se fazer a quantificação do composto nela dissolvido pela leitura de sua absorvância a 208 nm, descontando-se o valor equivalente de uma amostra de membrana de Q-G exposta somente ao etanol. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

#### **3.2.4. Caracterização das membranas**

A caracterização das membranas foi realizada de acordo com métodos descritos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2011), Veiga e Moraes (2011), Veiga (2012) e Pires (2013).

### 3.2.4.1. Aspecto das membranas

As membranas foram inspecionadas a olho nu em condição de umidade relativa de cerca de 50%. Seu aspecto foi registrado através de fotografias digitais (câmera modelo A410, Canon).

### 3.2.4.2. Avaliação da cor e opacidade das membranas

A cor das membranas foi avaliada com um colorímetro Colorquest II, Hunterlab, utilizando-se os padrões CIELab. O equipamento possui lâmpada de xenônio. Neste sistema, conforme apresentado na Figura 9, são determinados os parâmetros de luminosidade  $L^*$ , variando de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , do verde (-) ao vermelho (+); e  $b^*$ , do azul (-) ao amarelo. Utilizando-se os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , pode-se calcular o ângulo *Hue*, que dá a medida da tonalidade, pela Equação 2; e o *Croma*, referente à intensidade de cor, pela Equação 3. Calculado o ângulo *Hue*, determina-se a cor da amostra através do gráfico mostrado na Figura 9.

$$Hue = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

$$Croma = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (\text{Equação 3})$$

A opacidade é a medida da obstrução da passagem da luz através das membranas e foi avaliada com o mesmo equipamento, seguindo o método Hunterlab (Sobral, 1999). Por este método, a opacidade ( $Y$ ) da amostra é calculada como a relação entre a opacidade do filme colocado sobre o padrão preto ( $Y_p$ ) e a opacidade do filme colocado sobre o padrão branco ( $Y_b$ ) conforme a Equação 4.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

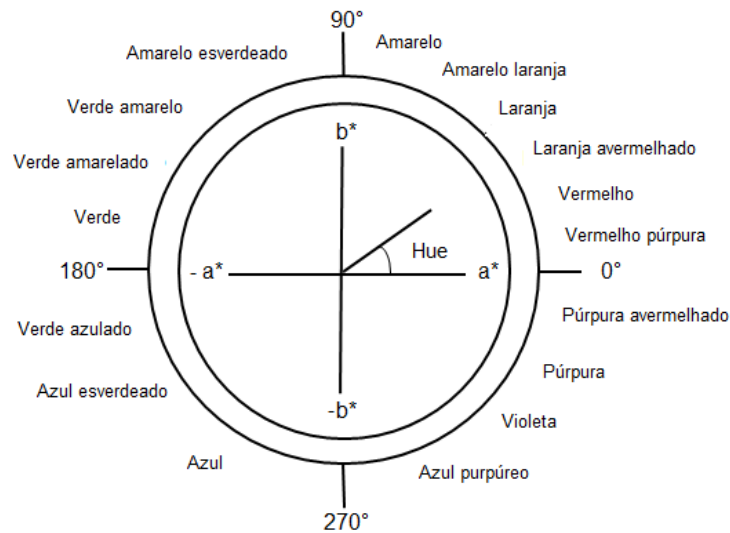


Figura 9: Seqüência *Hue* e orientação do ângulo *Hue* no diagrama CIELab com a seqüência das nuances de cores (Voss, 1992).

#### 3.2.4.3. Morfologia da superfície e da seção transversal das membranas

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio (LEO 440, Leica). Para isso, amostras de 2 cm x 1 cm previamente armazenadas em dessecador foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (Sputter coater Polaron SC 7620, Microtech) através da deposição de uma fina camada de ouro (de espessura 92 Å) em suas superfícies. Para a avaliação da seção transversal, as amostras foram criofraturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

#### 3.2.4.4. Ângulo de contato das membranas com água

As medidas de ângulo de contato das membranas foram feitas com o uso do equipamento DSA100 (Krüss GmbH, Alemanha) depositando-se uma gota de 10 µL de

água sobre a superfície das amostras de membranas de dimensões 6 cm x 1 cm. No momento em que a gota atingia a superfície da amostra, fazia-se o registro fotográfico, medindo-se então o ângulo neste instante. Dez medições do ângulo foram realizadas para cada amostra. As medidas foram feitas nas amostras dos polímeros quitosana, goma guar e policaprolactona isolados, bem como no complexo quitosana-goma guar.

Para obtenção das amostras de filmes dos polímeros quitosana e goma guar isolados, 100 mL de soluções de concentração 1% (m/v) de goma guar em água deionizada, e de quitosana em ácido acético 2% (v/v), foram preparadas e vertidas separadamente em placas de poliestireno. A solução de quitosana passou por secagem em estufa a 60 °C por 24 horas e o filme formado foi lavado uma vez em 200 mL de solução de NaOH 1M por 30 minutos e duas vezes em 200 mL de água deionizada por 30 minutos. A solução de goma guar passou por secagem em estufa a 37 °C por 24 horas e um filme foi formado, no entanto, não permaneceu íntegro após a etapa de lavagem com água deionizada. Logo, optou-se por verter a solução de goma guar diretamente sobre lâminas de vidro, a fim de promover a formação da rede polimérica após a secagem sobre esta lâmina. Dessa forma, a matriz não se desfez totalmente na solução de lavagem, sendo possível a obtenção de uma camada fina de filme polimérico sobre a superfície lisa das lâminas, que permitiu, então, a posterior medida do ângulo de contato.

#### *3.2.4.5. Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água*

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995), utilizando-se uma célula de acrílico com um volume interno de 30 mL e que dispõe de uma tampa com abertura central de 15,21 cm<sup>2</sup> na qual se fixa a amostra. Cloreto de cálcio granulado foi utilizado para preencher o fundo da célula até próximo à borda. Esta célula foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado, cujo fundo continha



uma solução saturada de NaCl para manter o ambiente a 75% UR. Na Figura 10 é mostrado o aparato experimental utilizado na obtenção dos valores de permeabilidade ao vapor d'água.

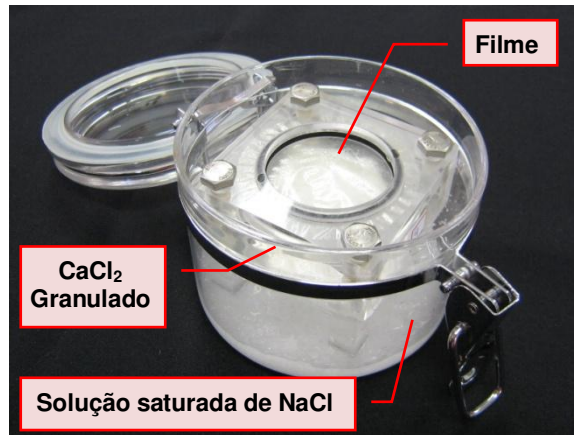


Figura 10: Aparato experimental utilizado no ensaio de determinação da permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água dos filmes poliméricos.

A variação de massa da célula com o tempo corresponde à taxa de água que permeia pelo filme e que foi usada na equação para calcular a PVA (Equação 5). Calculou-se também a taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA), utilizando-se para tal a Equação 6:

$$PVA = \frac{G_m \cdot \delta}{A_e \cdot \Delta P_{H_2O}} \cdot F \quad (\text{Equação 5})$$

$$TTVA = \frac{PVA \cdot \Delta P_{H_2O}}{\delta} \quad (\text{Equação 6})$$

onde: PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água [(g.mm/m<sup>2</sup>.dia.kPa)]; TTVA é a taxa de transmissão de vapor d'água [g/m<sup>2</sup>.dia];  $\delta$  é a espessura do filme [mm];  $G_m$  é a taxa de ganho de massa do sistema [g/dia];  $A_e$  é a área exposta do

filme [ $m^2$ ];  $\Delta P_{H_2O}$  é a diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme [kPa] e F é um fator de correção que considera a resistência à difusão da camada estagnada de ar entre o  $CaCl_2$  e o filme (McHugh *et al.*, 1993).

#### 3.2.4.6. Capacidade de absorção e estabilidade em etanol

Para que as amostras possam passar pelo processo de incorporação dos agentes bioativos por impregnação a partir de soluções etanólicas, deve-se analisar sua capacidade de absorver este solvente e de se manter estáveis estruturalmente, sem perda apreciável de massa.

Amostras de membranas de dimensões 6 cm x 1 cm e massa inicial conhecida ( $m_{inicial}$ ), foram armazenadas em dessecador por 24 horas. As amostras, em triplicata, foram então expostas a 10 mL de etanol por 1 hora ou 24 horas a 25 °C. O excesso de etanol foi removido com papel filtro e as amostras foram pesadas ( $m_{úmida}$ ). A absorção de etanol foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$A_i = \frac{m_{úmida} - m_{inicial}}{m_{inicial}} \quad (\text{Equação 7})$$

onde:  $A_i$  é a massa de etanol absorvida pela amostra, em  $g_{etanol}/g_{membrana}$ ,  $m_{inicial}$  é a massa da amostra antes da exposição ao etanol [g] e  $m_{úmida}$  é a massa da amostra após a exposição ao etanol [g].

Para a determinação da perda de massa das membranas em etanol, como uma forma de avaliação da sua estabilidade neste solvente, amostras de 6 cm x 1 cm, em triplicata, foram previamente armazenadas em dessecador por 24 horas e então pesadas ( $m_{inicial}$ ) e posteriormente expostas a 10 mL de etanol por 1 hora ou 24 horas a 25°C. Após o período de exposição, cada amostra foi imersa em 20 mL de água deionizada por 5 minutos por cinco vezes, para remover as moléculas de

polissacarídeos e os íons apenas fracamente ligados à matriz. Posteriormente os corpos de prova foram secos por 24 horas a 37°C, mantidos em dessecador com sílica gel por 24 horas e novamente pesados ( $m_{final}$ ). A perda de massa foi determinada por meio da Equação 8:

$$M_p = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde:  $M_p$  é a perda de massa da amostra, dada em porcentagem;  $m_{inicial}$  é a massa da amostra antes da exposição ao etanol [g] e  $m_{final}$  é a massa da amostra após a exposição ao etanol [g].

#### 3.2.4.7. Capacidade de absorção e estabilidade na presença de soluções aquosas

A capacidade de absorção de soluções aquosas foi determinada por meio do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água deionizada, fluido corpóreo simulado (FCS, pH 7,4), soro fetal bovino (pH 7,2), solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/v) (pH 5,5) e tampão fosfato salino (PBS, sigla em inglês para *phosphate buffered saline*). O fluido corpóreo simulado, com composição descrita na Tabela 3, é empregado com o objetivo de avaliar o comportamento das membranas em uma solução com pH, composição em sais e osmolalidade próximas à do corpo humano, enquanto o soro fetal bovino (SFB) é importante porque simula um ambiente mais complexo e mais próximo ao sangue animal, já que contém proteínas, fatores de crescimento, lipídios e açúcares, entre outros compostos. A solução de NaCl, por sua vez, é importante por ser usualmente utilizada para a limpeza e hidratação das lesões.

Amostras de 6 cm x 1 cm, com massas iniciais previamente determinadas ( $m_{inicial}$ ), foram imersas em 10 mL das referidas soluções por 24 horas a 37 °C. Passado este tempo, pressionou-se levemente um papel de filtro sobre cada amostra para

remover o excesso de solvente. Em seguida, as amostras foram novamente pesadas em balança analítica para a determinação das massas úmidas finais ( $m_{\text{úmida}}$ ). A capacidade de absorção ( $A_i$ ) de cada solução foi calculada através da Equação 7.

Tabela 3: Composição do FCS (Kokubo *et al.*, 1990)

Íons	Concentração (mM)
Na <sup>+</sup>	142,0
K <sup>+</sup>	5,0
Ca <sup>2+</sup>	2,5
Mg <sup>2+</sup>	1,5
Cl <sup>-</sup>	148,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5

As soluções aquosas utilizadas para a análise da estabilidade através da determinação de perda de massa foram o fluido corpóreo simulado, o soro fetal bovino, a solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/v) e o tampão fosfato salino. O procedimento é análogo ao descrito no item 3.2.4.6 para o etanol. No entanto, neste caso, como se desejava avaliar a integridade estrutural das membranas a longo prazo em condições fisiológicas e não a resistência do material ao solvente de incorporação do agente bioativo, as amostras foram expostas às soluções aquosas por um período de 7 dias.

#### 3.2.4.8. Avaliação das propriedades mecânicas e da espessura das membranas em diferentes condições de umidade

As propriedades mecânicas referentes à tensão e ao alongamento na ruptura das membranas foram analisadas segundo uma adaptação da norma D-882 ASTM (2002). O equipamento (*TA.XT2, Stable Micro System*) foi montado com uma separação

inicial das garras pneumáticas igual a 5 cm e operado com velocidade de afastamento de 1 cm/s, utilizando-se uma célula de carga de 5,098 kgf. Oito amostras de membranas de dimensões 8 cm x 2,5 cm com espessuras pré-determinadas em micrômetro Digimess (média aritmética de cinco medidas em pontos aleatórios), foram submetidas ao procedimento em cinco condições de umidade relativa (UR), sendo estas 22%, 33%, 52%, 75% e 89% e também na condição úmida (após imersas por 15 segundos em água), a uma temperatura de *c.a.* 25 °C. As condições de umidade determinadas para os ensaios foram atingidas armazenando-se as amostras por no mínimo 48 horas em dessecadores que continham sais capazes de manter a umidade em cada nível específico desejado (Anexo III).

A tensão na ruptura (TR), dada em MPa e o alongamento na ruptura (Al), medido em porcentagem, foram calculados pelas Equações 9 e 10, respectivamente:

$$TR = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Equação 9})$$

$$Al = \frac{d_r}{d_i} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

onde:  $F_m$  [N] é a força máxima de rompimento,  $A_s$  [mm<sup>2</sup>] é a área de secção transversal inicial da amostra,  $d_i$  [mm] é o afastamento inicial das garras do equipamento (5 cm) e  $d_r$  [mm] é o afastamento das garras no momento da ruptura.

#### *3.2.4.9. Determinação do comportamento por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier*

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis interações entre os polímeros e o composto adicionado. Estas análises foram feitas para os polímeros

isolados e as membranas produzidas, bem como para o composto ativo alfa-bisabolol. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Scientific (Modelo Nicolet 6700) operando no modo ATR (acessório SMART OMNI-SAMPLER) no intervalo de 675 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras acumuladas, para leitura de amostras na forma de filmes; e com o uso de pastilha de KBr, no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras acumuladas, para a leitura de amostras na forma de pó ou pellet.

#### *3.2.4.10. Avaliação da eficiência de incorporação de alfa-bisabolol adicionado durante a preparação das membranas*

No caso de membranas de Q-G contendo alfa-bisabolol, os filmes coletados na íntegra diretamente da placa de Petri foram inicialmente pesados para determinação de sua massa inicial ( $m_i$ ). Então, amostras de 2 cm x 1,5 cm, em triplicata, foram recortadas das membranas e também pesados ( $m_a$ ). Estas amostras foram incubadas em um volume de 5 mL (V) de etanol por amostra por 1 hora a 25 °C para a extração do composto incorporado e, ao final deste tempo, a quantificação do alfa-bisabolol presente na solução etanólica remanescente foi feita por análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 208 nm. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras que não continham o alfa-bisabolol incorporado à sua estrutura (branco), a fim de se quantificar compostos extratíveis com etanol que não fossem o composto em estudo. A absorvância da solução etanólica foi convertida à concentração (C) correspondente por meio de uma curva de calibração previamente construída, mostrada no Anexo IV. Com os valores de C e V calculou-se a massa do composto que estava presente na solução ao final do período de incubação ( $m_c$ ), sendo esta massa equivalente à massa de composto incorporado em cada amostra de 2 cm x 1,5 cm, considerando que todo o composto retido na amostra foi liberado na solução de etanol ao longo do período de incubação. Para determinação da massa total de alfa-bisabolol ( $m_{c,t}$ ) retida por membrana de 15 cm de diâmetro com massa  $m_i$ , usou-se a Equação 11.

$$m_{c,t} = \frac{m_i \times m_c}{m_a} \quad (\text{Equação 11})$$

A eficiência (%) foi finalmente calculada pela Equação 12.

$$\varepsilon = \frac{m_{c,t}}{m_{c,0}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

onde:  $m_{c,t}$  é a massa do composto incorporada à membrana e  $m_{c,0}$  é a massa inicial de alfa-bisabolol adicionada à formulação.

Nas membranas de PCL, a eficiência de incorporação foi calculada de acordo com a Equação 12, sendo a massa de composto incorporada à membrana,  $m_{c,t}$ , calculada conforme a Equação 13.

$$m_{c,t} = m_{c,0} - m_{c,pe} - m_{c,pp} \quad (\text{Equação 13})$$

onde:  $m_{c,0}$  é a massa inicial de alfa-bisabolol adicionada à formulação,  $m_{c,pe}$  é a massa de alfa-bisabolol perdida por evaporação e  $m_{c,pp}$  é a massa de alfa-bisabolol perdida por retenção na placa de Petri.

Para a obtenção de  $m_{c,pe}$ , uma massa conhecida de alfa-bisabolol, determinada por pesagem em balança analítica, foi colocada em capela sob as mesmas condições nas quais eram preparados os filmes. Ao final de 24 horas, a amostra do composto foi novamente pesada a fim de se verificar se havia perda de massa por evaporação. Já para a determinação de  $m_{c,pp}$ , as placas de Petri nas quais os filmes foram preparados foram lavadas com etanol e então determinou-se, por espectrofotometria, a concentração de alfa-bisabolol presente nesta solução de lavagem, que foi finalmente convertida para massa de bisabolol.

#### 3.2.4.11. *Determinação da eficiência de incorporação de alfa-bisabolol impregnado nas membranas por imersão em solução etanólica*

Esta metodologia foi aplicada apenas às membranas constituídas de quitosana e goma guar. Conforme descrito no item 3.2.3.2, amostras de 1 cm x 1 cm foram incubadas em 4 mL (V) de solução etanólica contendo alfa-bisabolol com concentração inicial conhecida ( $C_i$ ). Após completado o tempo de incubação de 1 hora, a quantificação do composto presente na solução etanólica remanescente foi feita por análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 208 nm. O mesmo procedimento foi realizado para amostras incubadas apenas em etanol (branco), a fim de se quantificar compostos extratíveis com etanol que não fossem o composto em estudo. A absorbância da solução remanescente foi convertida à concentração ( $C_f$ ) utilizando-se a curva de calibração mostrada no Anexo IV, anteriormente mencionada. Com os valores de V,  $C_i$  e  $C_f$  calculou-se a massa do composto presente inicialmente na solução ( $m_{c,0}$ ) e a massa remanescente na solução ( $m_f$ ). A massa do composto incorporado à membrana pôde ser calculada pela Equação 14.

$$m_{c,t} = m_{c,0} - m_f \quad (\text{Equação 14})$$

A eficiência de incorporação foi calculada foi obtida por meio da Equação 12.

#### 3.2.5. ***Estudo da liberação do alfa-bisabolol das membranas***

Para avaliar a cinética de liberação do alfa-bisabolol incorporado, tanto nas membranas de Q-G como nas de PCL, foram utilizadas amostras dos filmes de 1 cm x 1 cm, em triplicata. No caso das membranas de PCL, os corpos de prova foram pesados e posicionados em suportes (feitos a partir de telas de nylon) na parte superior



de cubetas de quartzo contendo 3,0 mL de tampão PBS sob agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C. O meio de liberação foi trocado quando saturado pelo composto liberado. Já para as membranas de Q-G, ensaios preliminares realizados para otimizar a metodologia de liberação mostraram que o volume de 10 mL de PBS como meio de liberação seria mais adequado, bem como sua troca em determinados períodos de tempo, pois assim a concentração seria mantida no limite de detecção, evitando-se assim a necessidade de diluição para a leitura da absorbância em espectrofotômetro. A diluição do meio não seria possível pois afetaria a continuidade do experimento. A utilização de pontos destrutivos, isto é, o uso de amostras diferentes para cada intervalo de tempo, permitiria a diluição do meio de liberação para se fazer a quantificação do composto liberado. No entanto, optou-se por não utilizar esta abordagem uma vez que esta poderia acarretar em desvios padrões muito elevados pelo fato da distribuição do composto incorporado na membrana não ser totalmente homogênea. Logo, para a realização do ensaio para as membranas de Q-G, amostras previamente pesadas foram colocadas em frascos contendo 10 mL de PBS mantidos sob agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C.

As cubetas e frascos utilizados foram vedados com parafilme e o ambiente foi saturado com água a fim de se minimizar a perda da solução de liberação por evaporação. Periodicamente, o meio de liberação foi analisado quanto à concentração do composto por espectrofotometria a 208 nm. A curva de calibração do alfa-bisabolol em PBS utilizada neste ensaio é mostrada no Anexo V.

### **3.2.6. Análise estatística**

Os resultados numéricos obtidos referentes às propriedades das membranas foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão, sendo analisados através da abordagem de diferenças significativas entre médias de cada amostra (teste de Tukey,  $p$  menor que 0,05) através do software Statistica 7.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do alfa-bisabolol

#### 4.1.1. Análise da composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Na Figura 11 é apresentado o cromatograma da amostra de alfa-bisabolol de origem natural.

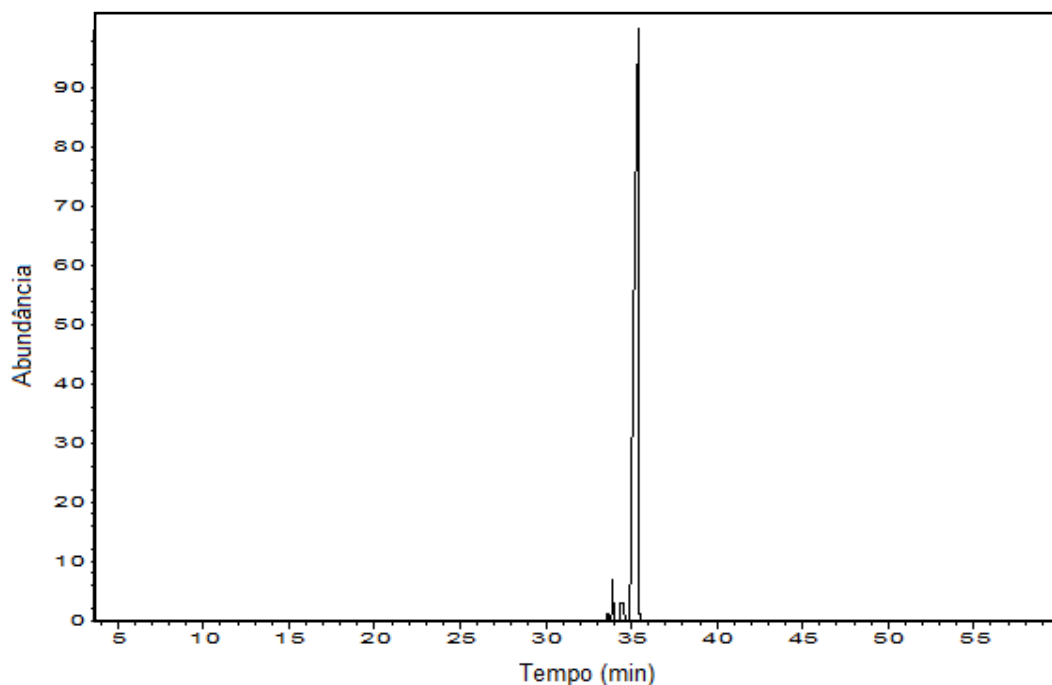


Figura 11: Perfil cromatográfico normalizado observado para o composto alfa-bisabolol de origem natural obtido em equipamento CG/MS (HP6890/ HP5975). Condições de análise: coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m); programação de temperatura de 60  $^{\circ}$ C a 240  $^{\circ}$ C, a uma taxa de 3  $^{\circ}$ C/min; temperaturas do injetor e detector ajustadas em 220  $^{\circ}$ C e 250  $^{\circ}$ C, respectivamente; gás de arraste (hélio) com vazão de 1,0 mL/min.

O alfa-bisabolol foi identificado como o componente majoritário desta amostra, com 96% de pureza. O tempo de retenção ( $t_r$ ) obtido para este componente foi de 35,404 minutos, e o índice de retenção (IR) calculado foi de 1690. Estes valores estão condizentes com os apresentados na literatura para o alfa-bisabolol, que são  $t_r$  igual a 36,170 minutos e IR igual a 1685 (Adams, 2007).

Na Figura 12 tem-se o cromatograma da amostra de alfa-bisabolol sintético. Neste caso, observou-se uma duplicidade dos picos localizados próximos ao tempo de retenção de 35 minutos, como pode ser melhor visualizado no cromatograma ampliado apresentado na Figura 13.

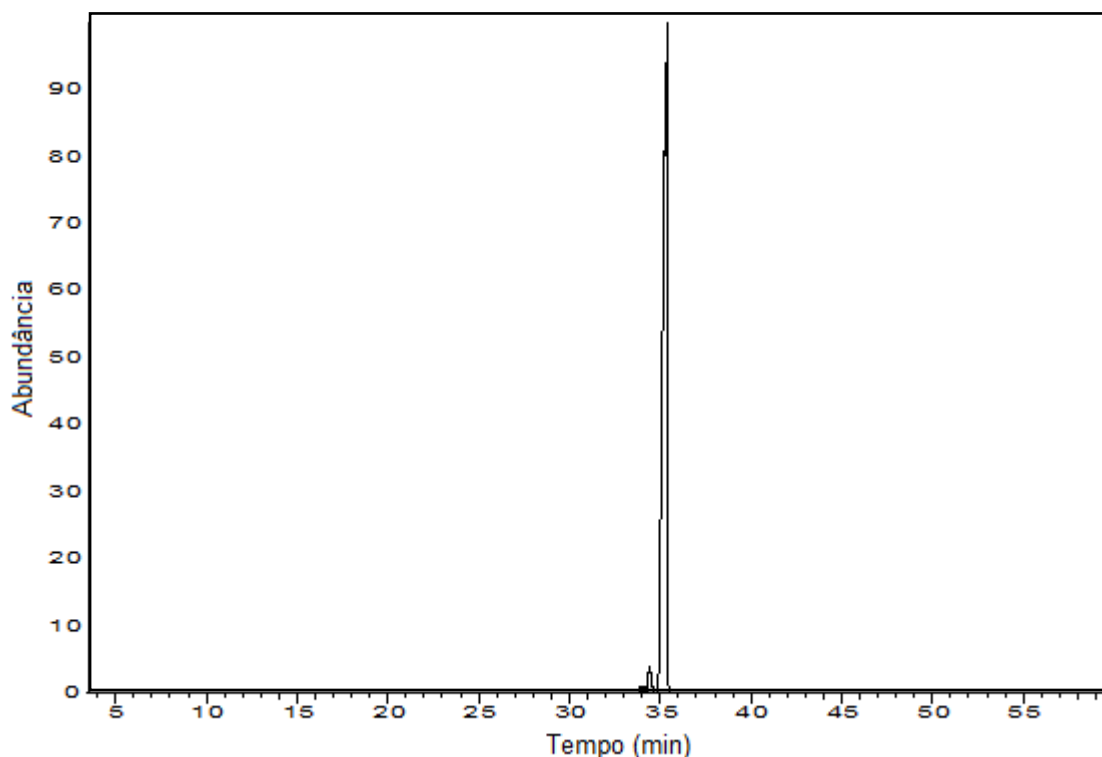


Figura 12: Perfil cromatográfico normalizado observado para o composto alfa-bisabolol sintético obtido em equipamento CG/MS (HP6890/ HP5975). Condições de análise: coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m); programação de temperatura de 60  $^{\circ}$ C a 240  $^{\circ}$ C, a uma taxa de 3  $^{\circ}$ C/min; temperaturas do injetor e detector ajustadas em 220  $^{\circ}$ C e 250  $^{\circ}$ C, respectivamente; gás de arraste (hélio) com vazão de 1,0 mL/min.

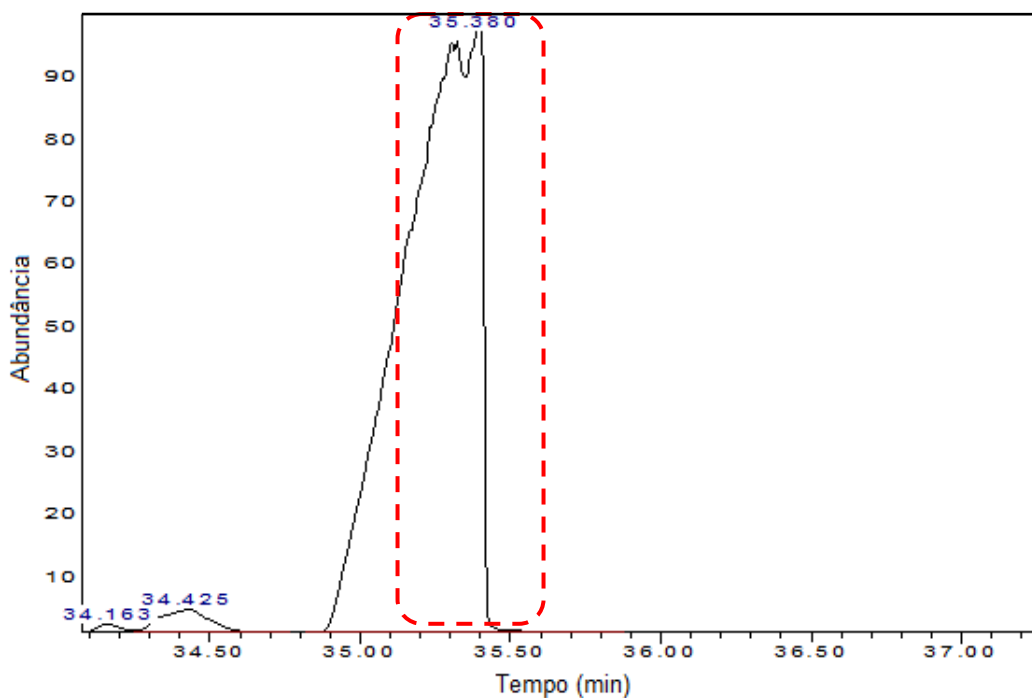


Figura 13: Ampliação do cromatograma da amostra de alfa-bisabolol sintético. Em destaque a duplicidade dos picos. Condições de análise: coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m); programação de temperatura de 60  $^{\circ}$ C a 240  $^{\circ}$ C, a uma taxa de 3  $^{\circ}$ C/min; temperaturas do injetor e detector ajustadas em 220  $^{\circ}$ C e 250  $^{\circ}$ C, respectivamente; gás de arraste (hélio) com vazão de 1,0 mL/min.

A duplicidade dos picos indica a presença de diastereoisômeros, no caso provavelmente as formas alfa(-)-bisabolol e alfa(+)-bisabolol. O fato de que os picos apresentaram intensidades praticamente iguais sugere que ambos estão presentes na mesma proporção. A análise revelou que esta mistura compreende 97% da composição da amostra. O tempo de retenção para o componente alfa-bisabolol nesta amostra foi de 35,380 minutos e o valor do índice de retenção calculado foi de 1691, dados também condizentes com os apresentados na literatura.

A Figura 14 mostra o fragmentograma da amostra de alfa-bisabolol sintético para o tempo de retenção de 35,380 minutos. Este fragmentograma foi comparado ao fragmentograma de referência do alfa-bisabolol, apresentado na Figura 15, observando-

se uma correspondência entre os picos. No entanto, segundo Foglio (1996), a identificação de um composto sesquiterpênico, como o alfa-bisabolol, somente por seu fragmentograma não é suficiente para sua caracterização, pois os padrões de fragmentação de vários sesquiterpenos são similares, sem diferenças significativas nas suas abundâncias relativas. Faz-se necessária então a comparação também do índice de retenção calculado com aquele apresentado na literatura. Logo, dada a correspondência dos picos e a equivalência dos índices de retenção anteriormente citado, foi possível concluir que o componente em questão corresponde, de fato, ao alfa-bisabolol.

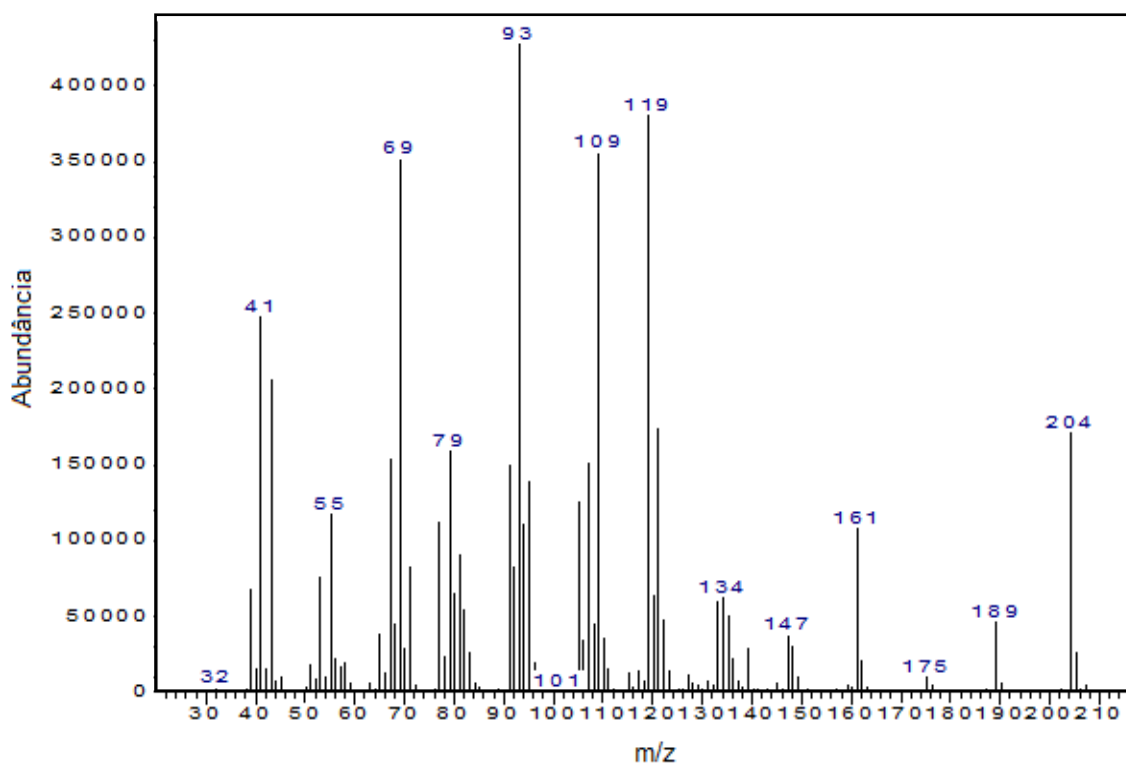


Figura 14: Fragmentograma da amostra de alfa-bisabolol sintético no tempo retenção ( $t_r$ )=35,380 minutos. O eixo m/z representa a razão massa/carga dos íons que são separados pela interação do campo elétrico aplicado sobre a amostra e posteriormente detectados pelo detector de massas.

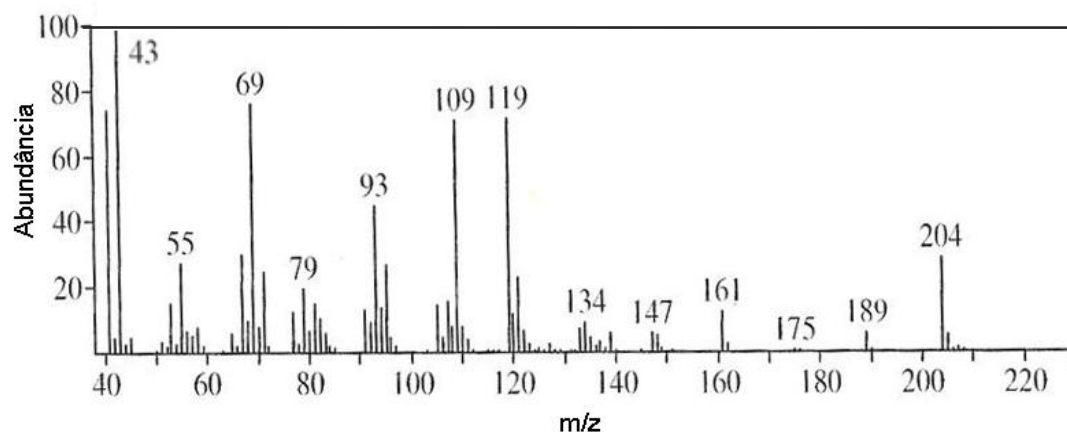


Figura 15: Fragmentograma de referência do alfa-bisabolol. O eixo  $m/z$  representa a razão massa/carga dos íons que são separados pela interação do campo elétrico aplicado sobre a amostra e posteriormente detectados pelo detector de massas. Fonte: Adams, 2007.

#### 4.1.2. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante é importante porque compostos que possuem esta propriedade podem atuar também como agentes anti-inflamatórios, uma vez que uma das respostas inflamatórias é a formação de radicais livres no local da lesão. Tais radicais, quando em excesso, podem danificar células e tecidos por meio de degradação oxidativa dos componentes celulares essenciais, com a formação de substâncias tóxicas (Miguel, 2010).

O uso de mais de uma metodologia para a avaliação da capacidade antioxidante é necessário, já que cada uma delas pode apresentar vantagens e desvantagens quanto a alguns de seus aspectos, e assim uma metodologia pode compensar as limitações da outra. O  $ABTS^{\bullet+}$ , por exemplo, apresenta baixa seletividade do radical na reação com compostos doadores de hidrogênio, mas pela metodologia do  $ABTS^{\bullet+}$  pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O  $DPPH^{\bullet}$ , por outro lado, só pode ser dissolvido em solventes orgânicos

(Daroncho, 2012), mas é capaz de detectar atividades antioxidantes muito baixas (Miguel, 2010).

Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante do alfa-bisabolol, tanto de origem natural como sintética, são mostrados a seguir. As curvas de calibração para o Trolox<sup>®</sup> com o radical ABTS<sup>•+</sup> e com o DPPH<sup>•</sup> mostraram adequada linearidade dos dados na faixa estudada (Figuras 16 e 17). Para uma mesma concentração de Trolox<sup>®</sup>, obteve-se uma menor porcentagem de redução da absorbância para o método do ABTS<sup>•+</sup>. Isso pode ser atribuído à sua baixa seletividade aos doadores de hidrogênio.

As curvas de calibração da reação do alfa-bisabolol natural e do alfa-bisabolol sintético com o radical ABTS<sup>•+</sup> são mostradas nas Figuras 18 e 19, enquanto as curvas típicas de calibração da reação do alfa-bisabolol natural e do alfa-bisabolol sintético com o radical DPPH<sup>•</sup> são mostradas nas Figuras 20 e 21. Os valores correspondentes calculados para a capacidade antioxidante equivalente à do Trolox<sup>®</sup> (CAET) são mostrados na Tabela 4.

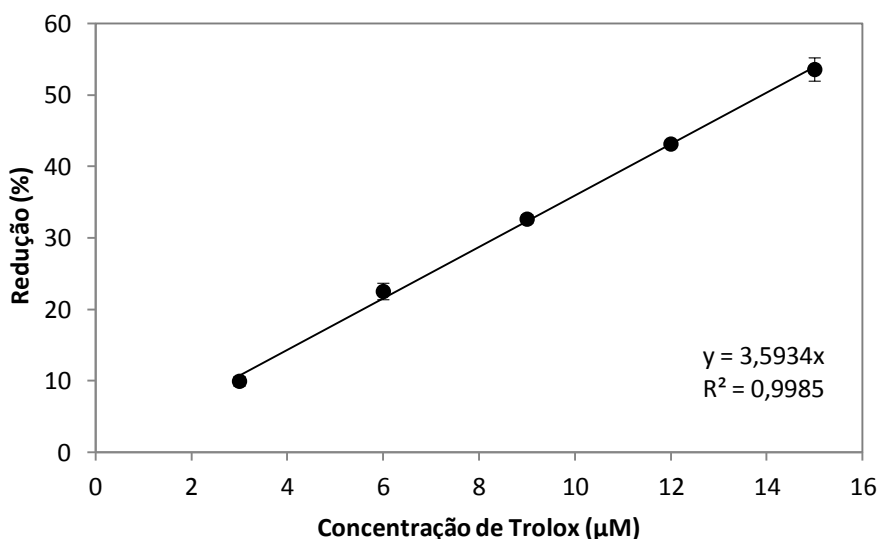


Figura 16: Curva de calibração obtida para o padrão Trolox<sup>®</sup> pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical ABTS<sup>•+</sup>.

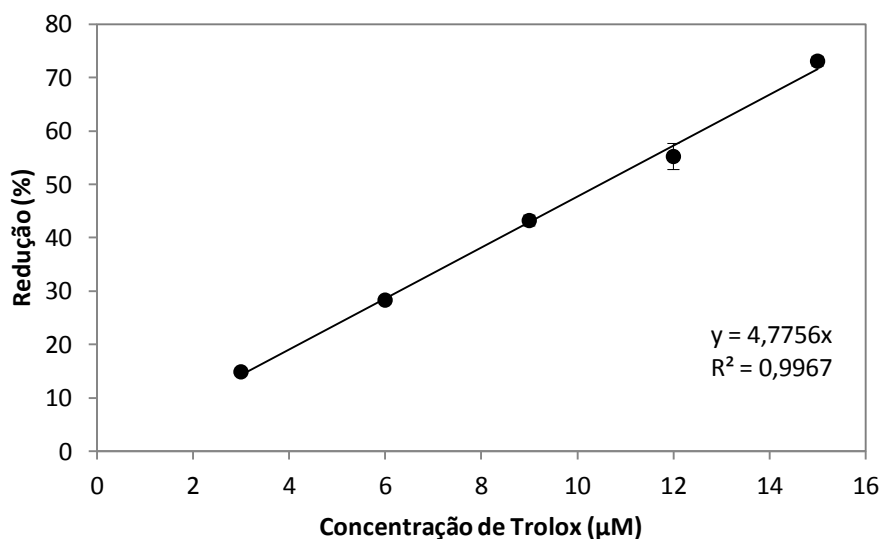


Figura 17: Curva de calibração obtida para o padrão Trolox<sup>®</sup> pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical DPPH<sup>•</sup>.

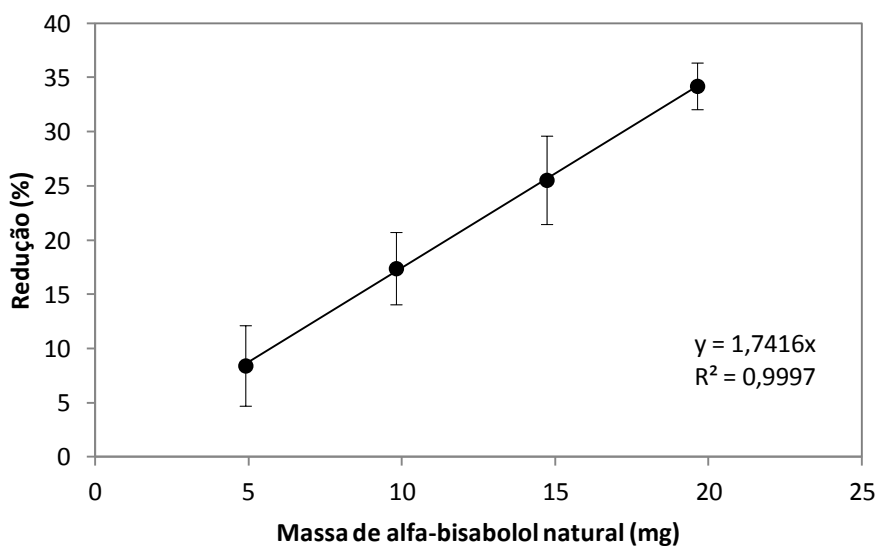


Figura 18: Curva de calibração obtida para o alfa-bisabolol de origem natural pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical ABTS<sup>•+</sup>.



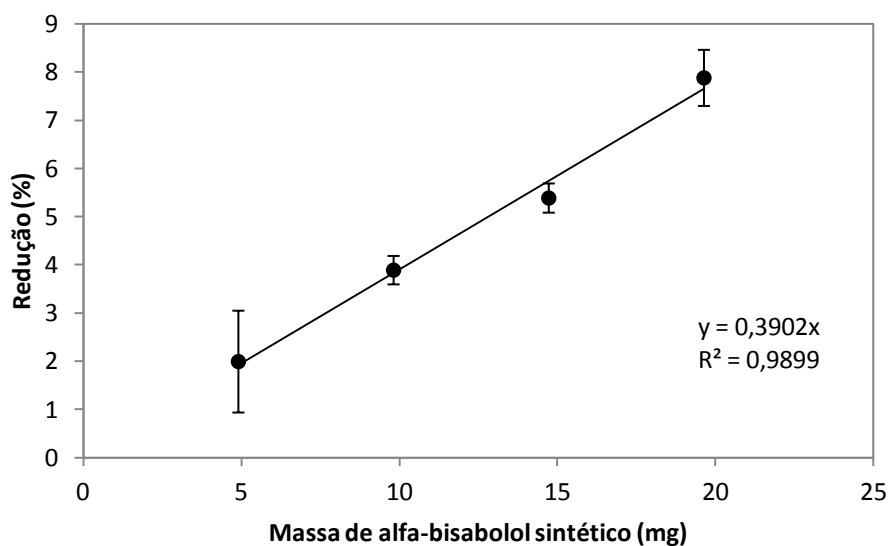


Figura 19: Curva de calibração obtida para o alfa-bisabolol de origem sintética pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical  $ABTS^{\bullet+}$ .

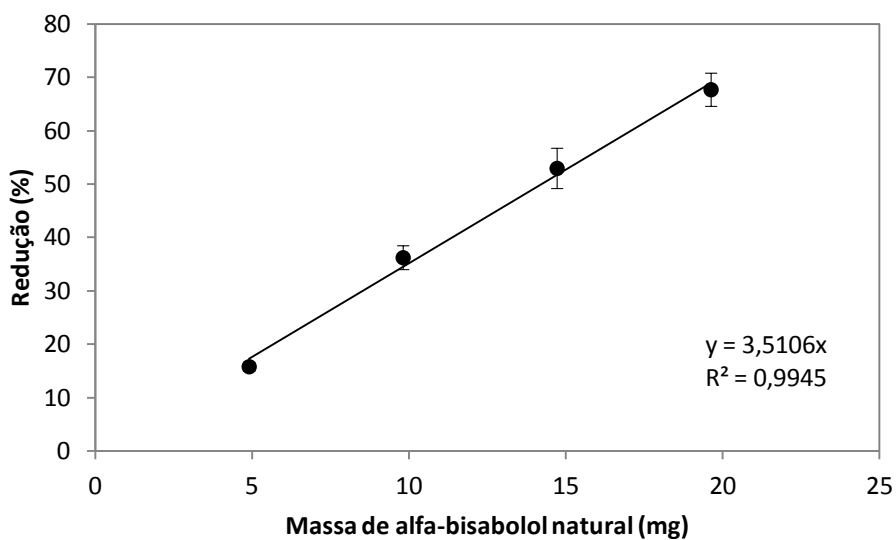


Figura 20: Curva de calibração obtida para o alfa-bisabolol de origem natural pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical  $DPPH^{\bullet}$ .

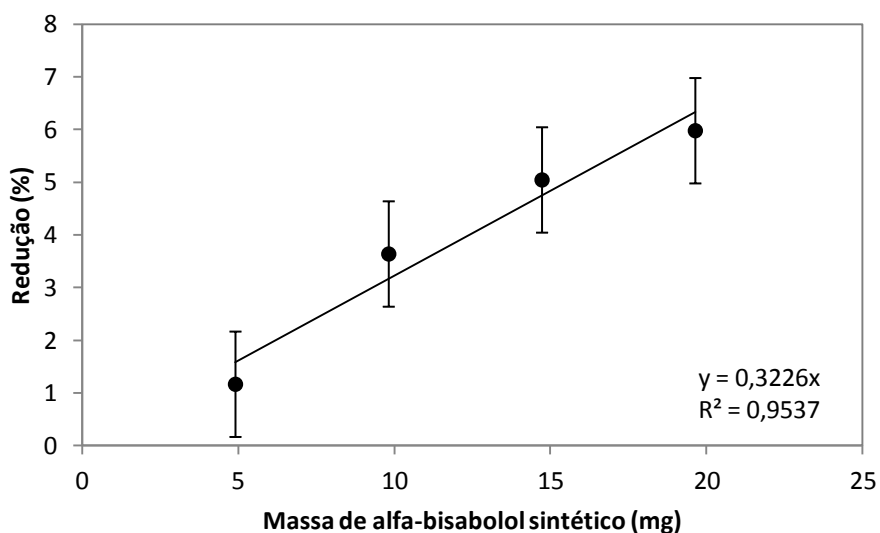


Figura 21: Curva de calibração obtida para o alfa-bisabolol de origem sintética pela metodologia empregada para a determinação da atividade antioxidante através da redução do radical DPPH<sup>•</sup>.

Tabela 4: Valores da capacidade antioxidante equivalente à do Trolox<sup>®</sup> (CAET) para o alfa-bisabolol de origem natural e de origem sintética segundo as duas metodologias utilizadas.

Método	CAET (mM/g <sub>alfa-bisabolol</sub> )	
	Alfa-bisabolol natural	Alfa-bisabolol sintético
ABTS <sup>•+</sup>	0,484 ± 0,007	0,109 ± 0,005
DPPH <sup>•</sup>	0,729 ± 0,044	0,071 ± 0,007

A quantidade necessária de antioxidante para reduzir em 50% a concentração inicial do radical na reação é representada pelo coeficiente EC<sub>50</sub>. A fim de determinar o EC<sub>50</sub> do alfa-bisabolol de origem natural e de origem sintética pelo método do DPPH<sup>•</sup>, foram determinadas as porcentagens do radical remanescente nas reações para várias concentrações desse composto (Figuras 22 e 23). Para isso, foi necessária a obtenção prévia da curva de calibração da absorbância do radical DPPH<sup>•</sup> em função de sua concentração.

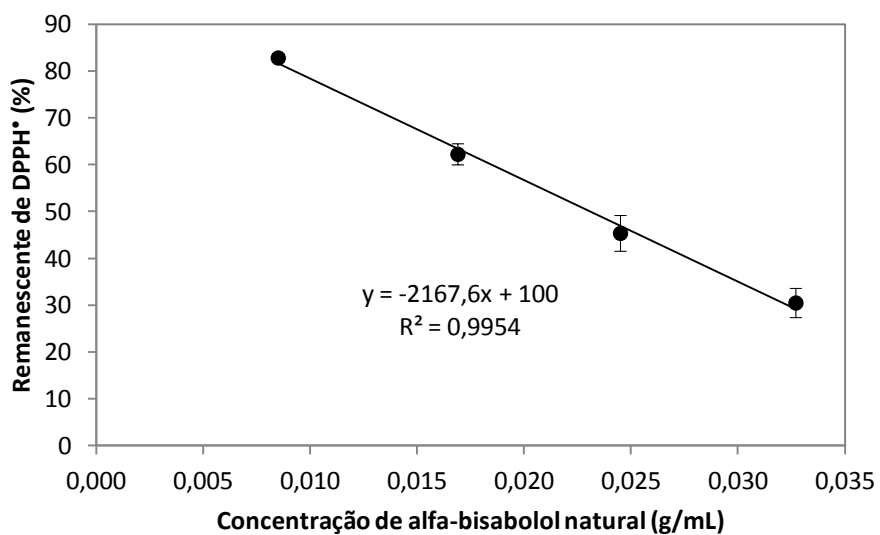


Figura 22: Curva de calibração obtida para a quantidade remanescente do radical DPPH• e a concentração de alfa-bisabolol natural na reação.

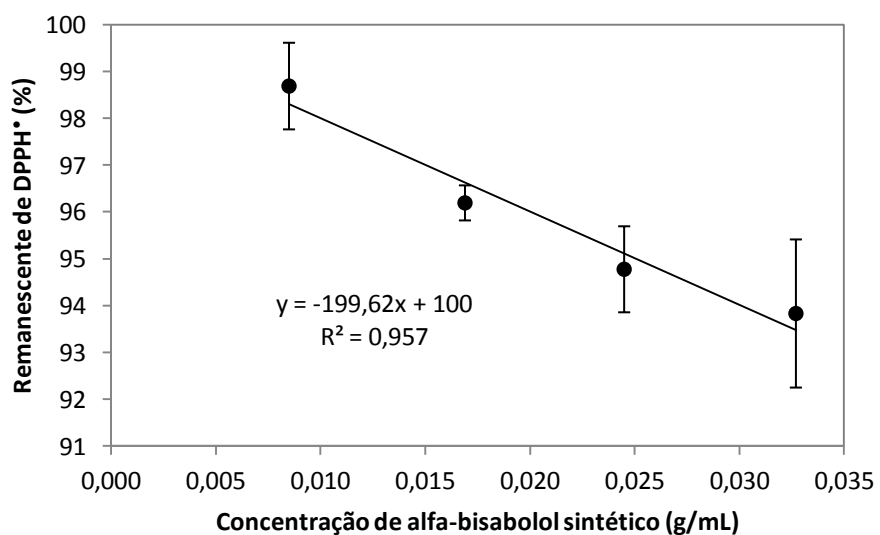


Figura 23: Curva de calibração obtida para a quantidade remanescente do radical DPPH• e a concentração de alfa-bisabolol sintético na reação.

Dessa forma, o valor obtido para o coeficiente de eficiência  $EC_{50}$  para o alfa-

bisabolol de origem natural foi de 0,023 g/mL enquanto que para o alfa-bisabolol de origem sintética este valor foi de 0,251 g/mL. Estes resultados são expressos em massa de alfa-bisabolol por volume de solução de alfa-bisabolol e DPPH<sup>•</sup>.

Observa-se que, por ambas as metodologias utilizadas, os valores calculados de CAET foram maiores para o alfa-bisabolol de origem natural, ou seja, cada grama do alfa-bisabolol natural utilizado corresponde ao uso de uma quantidade equivalente maior de Trolox<sup>®</sup>, indicando assim uma capacidade antioxidante superior para o composto natural. Quanto ao valor de EC<sub>50</sub>, o valor obtido foi menor para o alfa-bisabolol de origem natural, indicando também maior atividade antioxidante para este composto em relação ao composto de origem sintética, uma vez que é necessária uma menor quantidade para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup>.

Pode-se atribuir estes resultados ao fato de que o alfa-bisabolol natural é composto majoritariamente pelo isômero alfa-(-)-bisabolol, com pureza de 96%, como mostrado anteriormente, sendo este isômero relatado na literatura como o principal responsável pelas atividades biológicas do composto, incluindo sua atividade antioxidante. Já o alfa-bisabolol de origem sintética é constituído de uma mistura de alfa-(±)-bisabolol e também de impurezas. Sendo assim, era esperado que este composto apresentasse menor nível de atividade antioxidante.

Embora a atividade antioxidante do alfa-bisabolol natural tenha se mostrado maior que a do sintético, pode-se dizer que ainda é considerada baixa, levando em conta que valores de EC<sub>50</sub> apresentados na literatura para compostos antioxidantes comuns são bem inferiores. O ácido gálico é um exemplo destes compostos, sendo um flavonóide presente em um grande número de vegetais e utilizado na indústria de alimentos como agente antioxidante. Para fins de comparação, cita-se aqui o trabalho de Tavares (2011), que obteve os valores de EC<sub>50</sub> para o ácido gálico e para o extrato de eucalipto obtido por hidrodestilação, também pelo método do DPPH<sup>•</sup>, de 65 mg/L e 27.100 mg/L, respectivamente. Nota-se que o valor EC<sub>50</sub> calculado para alfa-bisabolol natural, 23.000 mg/L, é da mesma ordem de grandeza que o do extrato de eucalipto.

Justo *et al.* (2008) obtiveram extratos de alecrim e gengibre por extração com

CO<sub>2</sub> supercrítico e avaliaram a capacidade antioxidante equivalente à do Trolox<sup>®</sup> para ambos os extratos. Quando utilizado o método do ABTS<sup>\*\*</sup>, a CAET foi igual a 200 e 350 mM/g para o extrato de alecrim e o de gengibre, respectivamente, enquanto que para o método do DPPH<sup>\*</sup>, estes valores foram de 80 mM/g para o extrato de alecrim e 145 mM/g para o extrato de gengibre. Já Egydio (2009) utilizou o método do DPPH<sup>\*</sup> para avaliar a atividade antioxidante de licopeno extraído com CO<sub>2</sub> supercrítico, obtendo CAET na faixa de 4 a 12 mM/g, dependendo da temperatura e pressão de extração, sendo que quanto menor a temperatura utilizada na extração e quanto maior a pressão para uma mesma temperatura, maior a capacidade antioxidante dos extratos. Nota-se que, nestes trabalhos, a atividade antioxidante dos extratos estudados se apresentou consideravelmente maior que a do alfa-bisabolol, tanto natural como sintético, obtida no presente trabalho, cujos valores ficaram na faixa de 0,070 a 0,730 mM/g.

Não foram localizados dados na literatura a respeito da CAET ou do EC<sub>50</sub> do alfa-bisabolol. Há uma dificuldade para se encontrar dados aos quais se possa comparar os resultados obtidos neste estudo devido à grande variabilidade dos métodos e padrões de referência utilizados nos diversos trabalhos da literatura.

A baixa atividade antioxidante obtida para o alfa-bisabolol natural se deve, provavelmente, ao seu modo de obtenção a partir da extração do tronco da árvore Candeia por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor. Neste processo, a separação de constituintes mais voláteis imiscíveis em água é feita a uma temperatura elevada, o que pode ocasionar a perda de sua atividade biológica.

## **4.2. Caracterização das membranas**

### ***4.2.1. Aspecto visual, cor e opacidade das membranas***

Na Figura 24 é mostrado o aspecto visual registrado por câmera fotográfica das membranas de quitosana e goma-guar e de policaprolactona isentas de alfa-bisabolol.

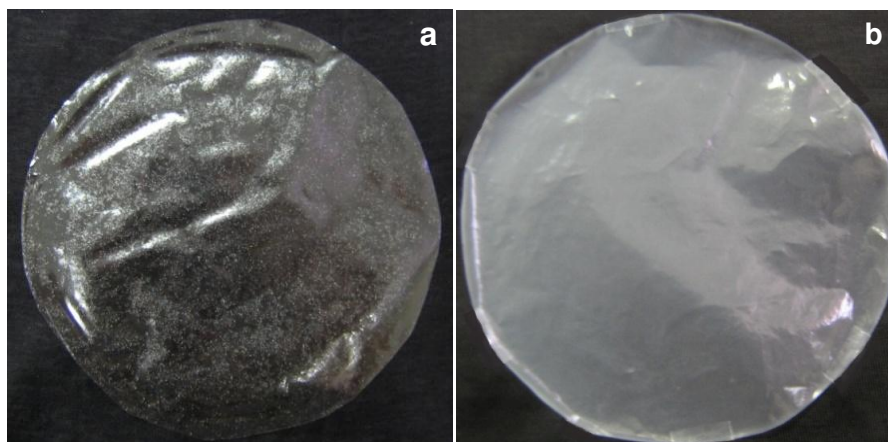


Figura 24: Aspecto visual das membranas de (a) quitosana e goma guar e (b) policaprolactona.

As membranas de Q-G foram produzidas de acordo com o procedimento utilizado por Veiga (2012) e têm aspecto semelhante ao observado nas membranas obtidas pela autora. No entanto, aparentam ter uma superfície menos rugosa que a relatada por Veiga (2012), o que pode ser decorrente de uma desaeração ou mesmo secagem mais eficientes.

Quanto às membranas de PCL, vários procedimentos foram testados para sua obtenção, conforme mencionado no capítulo anterior. Na Tabela 5 são sumarizados os resultados alcançados pelo uso destes procedimentos quanto ao aspecto dos filmes obtidos.

Para a PCL de menor massa molar, obteve-se filmes íntegros somente quando utilizado o solvente clorofórmio, no entanto, estes filmes mostravam-se finos e frágeis com o manuseio, além de apresentarem manchas, com regiões de maior opacidade. As manchas observadas se devem, provavelmente, ao acúmulo de material nessa região, decorrente da dificuldade de homogeneização da solução após seu depósito na placa de Petri. Tendo em vista este resultado, para a PCL de maior massa molar optou-se por testar apenas o solvente clorofórmio.

Tabela 5: Aspecto de membranas de PCL preparadas em placas de vidro de 9 cm de diâmetro de acordo com diferentes procedimentos experimentais adaptados de Tornello *et al.* (2012), Lin e Lu (2002), Luong-Van *et al.* (2006), Ng *et al.* (2007) e Peña *et al.* (2006).

<b>Massa molar da PCL (kDa)</b>	<b>Tipo de solvente utilizado</b>	<b>Concentração da solução de PCL (% m/v)</b>	<b>Volume de solução por placa (mL)</b>	<b>Aspecto do material obtido</b>
60	Cloro de metileno	0,5	15	Filme sem integridade estrutural, opaco
		10,0	30	
		10,0	60	
	Diclorometano	0,5	15	
		10,0	30	
		10,0	60	
	Diclorometano/ Metanol (1:1)	0,5	15	
		10,0	30	
		10,0	60	
	Clorofórmio	0,5	15	Filme íntegro, translúcido, mas com regiões opacas, fino e frágil com o manuseio
		0,5	30	Filme sem integridade estrutural, levemente opaco
		1,0	15	Filme sem integridade estrutural, opaco
		1,0	30	
		3,0	15	
3,0		30		
5,0		15		
5,0		30		
10,0	30			
80	Clorofórmio	0,5	15	Filme íntegro, translúcido, mas com regiões opacas
		0,5	20	Filme íntegro, opaco
		0,5	30	Filme sem integridade estrutural, opaco
		1,0	15	Filme íntegro, translúcido, mas com regiões opacas
		1,0	20	Filme sem integridade estrutural, opaco
		1,0	30	
		2,0	20	Filme íntegro, levemente opaco
		2,0	30	
		3,0	20	
		3,0	30	

Os procedimentos que forneceram os melhores resultados em termos de aparência e integridade das membranas produzidas foram aqueles em que se utilizou a PCL de massa molar 80 kDa, em concentrações de 2% e 3% e com o uso de 20 mL e 30 mL do solvente clorofórmio. No entanto, foi escolhida a formulação de PCL 2% em 20 mL de clorofórmio devido à menor quantidade de material utilizada em sua obtenção. Pela Figura 24, observa-se que as membranas produzidas aparentemente possuem uma superfície lisa, e seu aspecto é semelhante àquele das membranas obtidas por Khatiwala *et al.* (2008), que também utilizaram clorofórmio como solvente.

Na Tabela 6 se encontram-se os valores dos parâmetros relativos à cor e opacidade dos filmes obtidos neste trabalho. Conforme é possível observar também a olho nu, a membrana de PCL apresenta maior opacidade que a de Q-G. Os valores de *Hue*, que fornecem a cor das amostras de acordo com a escala de cores anteriormente apresentada, revelam que os filmes de Q-G são amarelo-esverdeados, enquanto os de PCL se mostram mais verde-amarelados. No entanto, os valores obtidos para o parâmetro *Croma* indicam que a intensidade dessas cores é muito baixa. Os resultados obtidos neste trabalho para a cor e opacidade dos filmes de Q-G diferem daqueles apresentados no trabalho de Rao *et al.* (2010), que obtiveram membranas de quitosana e goma guar com menor opacidade ( $15,91 \pm 0,52\%$ ) e de cor verde-amarelada de maior intensidade (*Hue*= -57,76 e *Croma* = 6,79). Essa diferença de aspecto pode ser resultante do diferente método de preparo das membranas utilizado pelos autores, que não incluía a etapa de neutralização. No presente trabalho, foi justamente nesta etapa que se observou uma alteração da cor das membranas de Q-G para um tom visivelmente amarelado. Já a diferença de opacidade pode estar relacionada ao fato de que as membranas obtidas pelos autores apresentavam menor espessura (35  $\mu\text{m}$ ) que a apresentada neste trabalho (cerca de 90  $\mu\text{m}$ ), conforme será mostrado mais adiante (item 4.2.5). Uma maior espessura do filme implica em uma dificuldade da luz em atravessá-lo, já que a quantidade de material ali presente é maior.

No caso dos filmes de PCL, não foram encontrados relatos na literatura a respeito dos parâmetros de cor e opacidade.



Tabela 6: Parâmetros relativos à cor e opacidade das amostras de quitosana e goma-guar e de policaprolactona.

<b>Amostra</b>	<b>Opacidade (%)</b>	<b>Hue</b>	<b>Croma</b>
Q-G	24,83 ± 0,49 <sup>a</sup>	-83,12 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,01 <sup>a</sup>
PCL	75,00 ± 2,17 <sup>b</sup>	-71,98 ± 0,54 <sup>b</sup>	1,90 ± 0,02 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **4.2.2. Morfologia da superfície e da seção transversal**

As micrografias obtidas para as amostras de Q-G e PCL são mostradas nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Analisando as imagens obtidas para a formulação de Q-G, pode-se observar que os filmes obtidos possuem em sua superfície algumas irregularidades, porém não são considerados necessariamente como rugosos. Já as membranas de PCL apresentam pequenas saliências na forma de bolhas na superfície, o que também pode ser observado nos filmes de PCL obtidos com o solvente clorofórmio mostrados no trabalho de Tang *et al.* (2004). Tais saliências podem ter sido resultantes da rápida evaporação do solvente na superfície do filme, que possivelmente ocasionou a formação de uma película capaz de reter o solvente em evaporação proveniente da solução polimérica viscosa, tornando sua difusão para fora da matriz mais lenta. Dessa maneira, o solvente se acumula na camada subjacente à película formando a bolha, até o ponto em que começa a se difundir para o ambiente. As micrografias da seção transversal revelam a formação de múltiplas lamelas na formulação de PCL, o que não ocorre nos filmes de Q-G, que apresentam estrutura densa e contínua. Veiga (2012) também observou tal perfil nas amostras de Q-G que obteve em seu trabalho. Não foi possível observar a formação de poros em nenhuma das amostras analisadas nas escalas de tamanho empregadas.

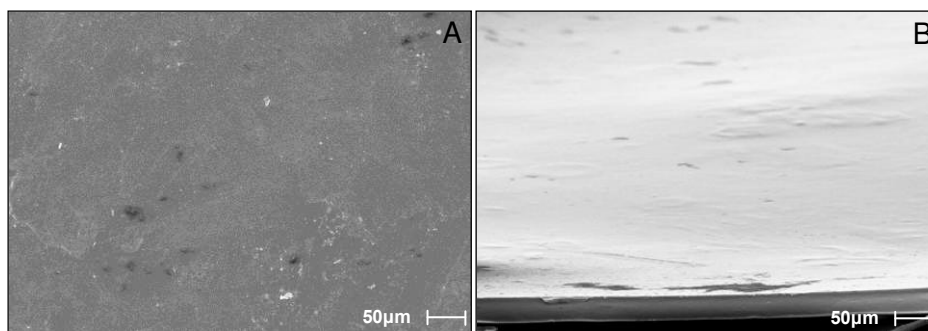


Figura 25: Superfície (A) e seção transversal (B) da membrana de quitosana e goma guar.

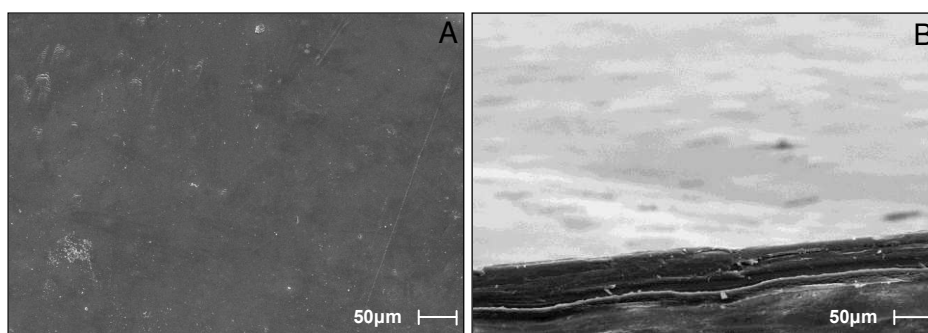


Figura 26: Superfície (A) e seção transversal (B) da membrana de policaprolactona.

#### **4.2.3. Ângulo de contato com água**

A medida do ângulo de contato das membranas é uma forma de avaliar seu caráter de hidrofiliicidade. Esta medida é importante no âmbito da obtenção de curativos pois permite avaliar o comportamento dos dispositivos, no que se refere à sua molhabilidade, em um contato superficial com um fluido que, na situação de uso, por exemplo, seria o exsudato liberado pela lesão.

Destaca-se que, ao se fazer as medidas de ângulo de contato, é importante que a superfície da amostra se apresente o mais lisa possível, já que uma superfície ondulada pode comprometer a qualidade das medidas. Além disso, deve-se fazer a

medida do ângulo assim que gotícula de água depositada atinge a superfície da amostra, para evitar que a medida seja feita após parte da água já ter sido absorvida. Portanto, deve-se fazer o registro fotográfico do momento em que o equipamento deposita a gota e realizar o cálculo do ângulo com base nesta imagem.

Na Tabela 7 são apresentados os valores obtidos para os filmes de quitosana, goma guar, quitosana-goma guar e policaprolactona, e na Figura 27 são mostrados os aspectos das gotas depositadas sobre a superfície dos filmes.

O ângulo de contato obtido neste trabalho para a quitosana foi próximo daquele reportado no trabalho de Fernandes (2009), que afirmou que a hidroflicidade deste filme se deve à presença de grupos amino protonados em sua estrutura. Logo, quando estes grupos interagem com outras espécies, ou seja, quando não estão mais disponíveis para interagir com a água, pode-se supor que a molhabilidade da superfície desses filmes tenderia a diminuir. Nota-se na Tabela 7, no entanto, que praticamente não há alteração do ângulo de contato do filme de quitosana-goma guar em relação àqueles obtidos para os filmes dos polímeros isolados. Isto indica que possivelmente ocorre a interpenetração das cadeias da quitosana e da goma guar para a formação da rede, e o complexo resultante mantém as características de molhabilidade da superfície dos polímeros de partida.

Tabela 7: Ângulo de contato com água apresentado pelas membranas de quitosana, goma guar, quitosana-goma guar e policaprolactona.

<b>Amostra</b>	<b>Ângulo de contato (graus)</b>
Quitosana	$71,7 \pm 3,2^a$
Goma guar	$70,8 \pm 4,9^a$
Quitosana - Goma guar	$70,8 \pm 5,1^a$
PCL	$68,3 \pm 4,6^a$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

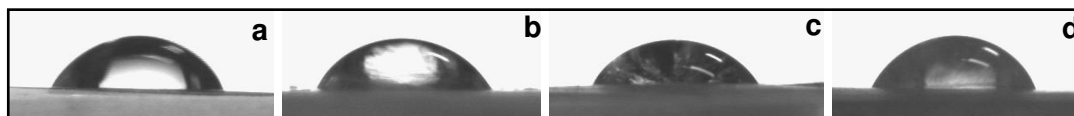


Figura 27: Aspecto típico das gotas depositadas sobre a superfície dos filmes de (a) quitosana, (b) goma guar, (c) quitosana-goma guar e (d) policaprolactona.

Não houve diferença significativa entre os valores obtidos para as quatro formulações avaliadas. Pode-se dizer que, por apresentarem ângulo de contato próximo de 70 graus, todas as formulações possuem uma superfície pouco hidrofílica. No entanto, sendo a PCL um polímero hidrofóbico, esperava-se que os filmes obtidos a partir desse composto apresentassem uma superfície com característica menos hidrofílica que a dos filmes de quitosana-goma guar. O comportamento observado pode ser então resultante da cadeia levemente ramificada da goma guar que, em um primeiro momento, dificultaria a entrada de água das moléculas na matriz, conferindo ao filme uma superfície comparável à do filme de PCL. Yeh *et al.* (2011) obtiveram um valor de ângulo de contato com água para PCL de massa molar de 80 kDa similar ao obtido neste trabalho, igual a  $71,1 \pm 0,8$  graus.

#### **4.2.4. Permeabilidade e taxa de transmissão de vapor d'água**

A medida da permeabilidade ao vapor d'água de um filme utilizado no recobrimento de lesões de pele é importante pois é preciso garantir que ele propicie um ambiente favorável ao processo de cura do ferimento, no sentido de manter uma umidade adequada no local. Logo, um curativo deve remover o excesso de exsudato proveniente da lesão e permitir a troca gasosa, favorecendo a obtenção de um microambiente úmido, livre de infecções. Nesta situação tem-se a presença de proteínas e citocinas que favorecem o debridamento autolítico, a angiogênese, a formação do tecido de granulação e a migração de queratinócitos (Boateng *et al.*, 2008;

Broussard e Powers, 2013). É importante que os filmes sejam adequados ao tipo de lesão a que são aplicados, sendo que ferimentos muito exsudativos requerem o uso de filmes com elevada permeabilidade ao vapor d'água, ao passo que ferimentos com baixa quantidade de exsudato podem ser tratados com dispositivos que apresentem menor permeabilidade. Dessa forma, evita-se o acúmulo excessivo de exsudato na lesão, que pode ocasionar infecções e acarretar em atraso do processo de cura (Weller e Sussman, 2006; Ovington, 2007; Abdelrahman e Newton, 2011).

A permeação de vapor d'água através de um filme polimérico ocorre inicialmente pela absorção do exsudato proveniente do ferimento, que é então incorporado à matriz, ocupando todos os espaços disponíveis. Em seguida as moléculas de água passam a se difundir através da estrutura, até que finalmente parte delas é perdida para o ambiente por evaporação (Boateng *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2011).

Os resultados de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) obtidos para os filmes de Q-G e PCL são mostrados na Tabela 8.

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre os valores de PVA e TTVA obtidos para ambas as formulações. Rao *et al.* (2010) obtiveram valores superiores para a taxa de transmissão de vapor d'água de membranas de Q-G, sendo eles em torno de 4000 g/m<sup>2</sup>.dia, porém estes foram obtidos a 37 °C, diferentemente da temperatura utilizada neste trabalho, de 32 °C, considerada mais próxima à temperatura da pele. Já Veiga (2012) obteve para essa mesma formulação um valor superior, de 1217 g/m<sup>2</sup>.dia, também a 32 °C, mas utilizando um dispositivo de medida diferente do aqui empregado. Htay *et al.* (2004) apresentaram em seu trabalho membranas de PCL com TTVA de 732 g/m<sup>2</sup>.dia (a 32 °C), valor muito próximo daquele obtido neste trabalho. O alto valor de desvio padrão, observado especialmente para a TTVA dos filmes de PCL, pode estar relacionado à variabilidade de espessura das amostras utilizadas nos ensaios, uma vez que esta propriedade afeta consideravelmente os cálculos relativos a esta análise.

De acordo com Lamke *et al.* (1977), as taxas de transmissão de vapor d'água apresentadas pela pele normal e a pele lesada, com queimaduras de 1º, 2º e 3º graus, são de respectivamente 204, 278, 4274 e 3436 g/m<sup>2</sup>.dia. Dessa forma, é possível afirmar que as membranas obtidas neste trabalho possuem relativamente baixa TTVA e, por apresentarem também baixa absorção de soluções aquosas, conforme discutido mais adiante, seriam adequadas apenas para aplicação em lesões pouco exsudativas ou ferimentos com cicatrização relativamente avançada.

Tabela 8: Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) obtidos para as membranas de quitosana-goma guar (Q-G) e de policaprolactona (PCL).

<b>Formulação</b>	<b>PVA (g.mm/m<sup>2</sup>.dia.kPa)</b>	<b>TTVA (g/m<sup>2</sup>.dia)</b>
Q-G	20,80 ± 4,11 <sup>a</sup>	587,59 ± 7,94 <sup>a</sup>
PCL	17,51 ± 3,18 <sup>a</sup>	679,64 ± 72,77 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

#### **4.2.5. Propriedades mecânicas e espessura em diferentes condições de umidade**

A análise das propriedades mecânicas das membranas é importante porque elas devem possuir as características adequadas ao uso como curativos. Isto significa que devem ser alongáveis o suficiente para se acomodar no local do ferimento e ajustar-se ao movimento da pele na região de aplicação, inclusive em regiões que exigem mais desta propriedade, como as articulações (cotovelos e joelhos). Além disso, devem ser duráveis e resistentes para enfrentar as situações de armazenamento e também do próprio uso (Boateng *et al.*, 2008). Essas situações envolvem ambientes de umidade variada, nos quais as propriedades mecânicas destes materiais podem também sofrer variação.

Uma situação comum de uso é o ambiente hospitalar. Neste, segundo

resolução da Anvisa (2003), a umidade relativa deve ser mantida entre 40 e 60%. No entanto, ao longo de sua vida útil, as membranas podem ser expostas a umidades relativas compreendidas além desta faixa, seja no seu processamento, armazenamento, ou no uso. Logo, existe a necessidade de se avaliar as propriedades mecânicas das membranas em uma ampla faixa de umidades. Levando em conta que, principalmente nos estágios iniciais de recuperação, as lesões costumam liberar grandes quantidades de exsudato, é interessante também fazer a análise destas propriedades com as membranas úmidas, isto é, após imergí-las em água por alguns segundos, simulando assim sua resposta mecânica a esta condição.

Os resultados dos testes de resistência mecânica e de espessura das membranas de Q-G em diferentes condições de umidade relativa são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Dados de espessura e propriedades mecânicas das membranas de quitosana e goma guar em diferentes umidades relativas.

<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Tensão na ruptura (MPa)</b>	<b>Alongamento na ruptura (%)</b>
22	$92 \pm 11^a$	$27,72 \pm 4,50^a$	$3,82 \pm 0,66^a$
33	$84 \pm 12^{a,b}$	$28,55 \pm 5,11^a$	$3,33 \pm 0,81^a$
52	$93 \pm 7^a$	$24,03 \pm 3,46^a$	$3,12 \pm 0,53^a$
75	$74 \pm 13^{b,c,d}$	$22,99 \pm 5,44^a$	$3,31 \pm 1,50^a$
89	$57 \pm 15^c$	$14,63 \pm 5,38^b$	$10,44 \pm 4,93^b$
Úmida	$90 \pm 9^{a,d}$	$1,93 \pm 0,41^c$	$43,61 \pm 6,66^c$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Não se observou o aumento esperado da espessura das membranas de Q-G com a elevação da umidade. Isso ocorreu possivelmente devido a dois fatores: o primeiro é a baixa uniformidade de espessura das membranas em decorrência de distribuição não homogênea da mistura polimérica sobre a superfície das placas de Petri usadas para moldar os filmes, acarretando na formação de membranas de

espessura muito variável, o que certamente interfere nos testes de comparação estatística. Além disso, no momento de se fazer a medida da espessura das amostras mais úmidas há uma grande dificuldade, tendo em vista que elas são facilmente comprimidas pelo aparelho de medição, “deslocando” a água que estaria contida naquela região que está sendo medida e fornecendo valores de espessura menores que os reais.

Ma *et al.* (2001) afirmaram que os dispositivos usados como substitutos de pele devem possuir espessura muito menor que a da derme, sendo esta de aproximadamente 500 a 3000  $\mu\text{m}$ . As espessuras das membranas de Q-G são, de fato, muito menores que 500  $\mu\text{m}$  em toda a faixa de umidades relativas estudada, e, portanto, se adequam a este critério.

Os valores de tensão na ruptura (TR) e alongamento na ruptura são próximos dos valores obtidos por Veiga (2012) a uma umidade relativa de c.a. 40% para a membrana de Q-G. Em seu trabalho, a autora obteve os valores de 23,84 MPa e 3,33% para a tensão na ruptura e alongamento na ruptura, respectivamente, e afirmou que a estrutura densa da membrana de Q-G pode ter influência sobre estes valores.

Por apresentar pequenas ramificações na cadeia, as membranas de Q-G podem ter sua resistência mecânica reduzida em relação a materiais compostos por polímeros de cadeia linear, já que a presença destas ramificações causa um impedimento estérico que dificulta a aproximação das cadeias poliméricas, acarretando no enfraquecimento das forças moleculares que as mantêm unidas. Essas ramificações participam também do aprisionamento de água na estrutura do material observado em maiores umidades.

Observa-se que tanto os valores de TR como os de alongamento na ruptura não apresentaram diferença significativa entre si em umidades de 22 a 75% para a formulação Q-G. Já a alteração da umidade de 75% para 89% resultou em queda na TR e aumento no alongamento apreciáveis, indicando que neste patamar de umidade a quantidade de moléculas de água que penetra na estrutura da membrana já é capaz de influenciar a organização de sua matriz polimérica. No caso de as membranas estarem



completamente úmidas, verificou-se uma grande redução da TR e aumento no alongamento, sugerindo que as moléculas de água penetraram completamente na estrutura das membranas, atuando como um plastificante e desordenando as cadeias poliméricas. Comportamento similar foi observado por Rodrigues (2008) para membranas constituídas de quitosana e alginato.

Os valores de tensão na ruptura da pele humana variam entre 5 e 30 MPa, dependendo da região do corpo e da idade do indivíduo (Edwards e Marks, 1995). Com exceção do material úmido, que apresenta TR de aproximadamente 2 MPa, todos os valores medidos para as membranas de Q-G estão compreendidos dentro desta faixa, indicando compatibilidade mecânica destas com a pele. Em contrapartida, o filme úmido é mais alongável, o que seria mais adequado para a adaptação à pele.

Quanto às membranas de policaprolactona, optou-se por fazer as análises de espessura e propriedades mecânicas apenas na umidade de 52%, tendo em vista que a absorção de água por estas membranas é praticamente nula e, portanto, não teria efeito significativo sobre estas propriedades. A espessura obtida para as membranas de PCL foi de  $44 \pm 3 \mu\text{m}$ , valor este menor que o obtido para membranas de Q-G na mesma condição de umidade relativa e também considerado adequado para a aplicação desejada.

No ensaio de propriedades mecânicas não foi possível calcular os valores de tensão e alongamento na ruptura para os filmes de PCL, pois o afastamento máximo atingido pelas garras do equipamento não foi suficiente para romper estes filmes. O teste de resistência mecânica dos filmes de PCL foi realizado no mesmo equipamento e sob as mesmas condições experimentais a que foram submetidos os filmes de Q-G para fins de comparação. A amostra do filme de PCL se mostrou bastante alongável e, por não sofrer ruptura durante a análise, não permitiu a obtenção de dados para se fazer a análise comparativa entre as duas formulações. O filme de PCL submetido ao ensaio mecânico é mostrado na Figura 28. Gaudio *et al.* (2011) obtiveram os valores de  $5 \pm 1 \text{ MPa}$  para a tensão na ruptura e  $310 \pm 90 \%$  para o alongamento na ruptura para filmes de PCL, utilizando uma célula de carga de 10,2 kgf. Este alto valor de

alongamento seria vantajoso considerando a adaptabilidade do filme aos movimentos da região do corpo do paciente à qual seria aplicado. Já a tensão na ruptura estaria no limite inferior do considerado adequado para o uso do filme como curativo.



Figura 28: Filme de policaprolactona submetido ao teste de resistência mecânica.

#### **4.2.6. Capacidade de absorção e perda de massa em soluções aquosas**

A medida da capacidade máxima de absorção e perda de massa das membranas em diferentes soluções aquosas é realizada com o intuito de se verificar o comportamento dos filmes obtidos, tanto em relação ao seu desempenho na remoção de fluidos quanto à sua estabilidade nos mesmos, em condições que podem simular o ambiente fisiológico ou em situações às quais os filmes são expostos quando há necessidade de limpeza do ferimento.

Na Tabela 10 encontram-se os valores obtidos para a absorção e perda de massa das membranas de Q-G e PCL em diferentes soluções aquosas. É possível observar que as membranas de quitosana-goma guar apresentaram baixa absorção, em torno de 2,5 g/g, para todas as soluções às quais foram expostas. O mesmo comportamento foi obtido no trabalho de Veiga (2012), que atribuiu este resultado à estrutura densa dessas membranas, que dificultaria a penetração das soluções na matriz. Além disso, a autora mencionou que a etapa de neutralização durante o processamento dos filmes ocasiona a redução da carga interna da matriz, o que diminui a força motriz para entrada de água em sua estrutura para se atingir o equilíbrio osmótico. Analisando-se os dados para a perda de massa, nota-se que no meio SFB houve completa desintegração da membrana, o que se deve à presença de proteínas

neste meio, inclusive enzimas, que provavelmente ocasionam o enfraquecimento e, neste caso, o rompimento de ligações de hidrogênio ou interações de natureza hidrofóbica existentes entre os polímeros que constituem a matriz (Veiga, 2012). Nos demais fluidos estudados, a perda de massa apresentada pelas membranas de Q-G foi baixa.

Tabela 10: Capacidade de absorção (24 h a 37 °C) e perda de massa (7 dias a 37 °C) para as membranas de quitosana-goma guar (Q-G) e de policaprolactona (PCL) em soluções aquosas.

Solução	Capacidade de absorção (g/g)		Perda de massa (%)	
	Q-G	PCL	Q-G	PCL
<b>Água</b>	2,91 ± 0,54 <sup>A,a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>B,a</sup>	5,94 ± 0,84 <sup>A,a,c</sup>	1,28 ± 0,52 <sup>B,a</sup>
<b>SS</b>	2,49 ± 0,19 <sup>A,a</sup>	0,07 ± 0,04 <sup>B,a</sup>	6,75 ± 0,76 <sup>A,a</sup>	1,38 ± 0,44 <sup>B,a</sup>
<b>PBS</b>	2,28 ± 0,10 <sup>A,a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>B,a</sup>	2,36 ± 1,26 <sup>A,b</sup>	1,79 ± 0,12 <sup>A,a,b</sup>
<b>FCS</b>	2,31 ± 0,14 <sup>A,a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>B,a</sup>	4,43 ± 0,23 <sup>A,b,c</sup>	2,69 ± 0,57 <sup>B,b</sup>
<b>SFB</b>	2,54 ± 0,62 <sup>A,a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>B,a</sup>	100* <sup>A,d</sup>	2,15 ± 0,30 <sup>B,a,b</sup>

\*Completa desintegração da membrana.

SS: Solução salina NaCl 0,9%; PBS: Tampão fosfato salino; FCS: Fluido corpóreo simulado; SFB: soro fetal bovino. Letras maiúsculas referem-se à comparação de membranas de formulações diferentes para a mesma solução e letras minúsculas à comparação de membranas de mesma formulação em diferentes soluções. Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Como era esperado, já que a policaprolactona é um polímero de caráter hidrofóbico, a capacidade de absorção de soluções aquosas das membranas de PCL foi muito pequena, e ainda mais baixa que a apresentada para as membranas de Q-G. Consequentemente, a perda de massa obtida também foi muito pequena.

Comparando-se os valores obtidos neste trabalho com aqueles obtidos nos trabalhos de Veiga (2012) e Pires (2013) para filmes de quitosana-xantana e quitosana-alginato, respectivamente, pode-se afirmar que de fato as formulações estudadas no presente trabalho apresentam baixa capacidade de absorção de soluções aquosas, bem como as correspondentes perdas de massa. Desse modo, pode-se afirmar que, do

ponto de vista dessas propriedades, as membranas aqui estudadas seriam adequadas apenas para aplicação em lesões pouco exsudativas.

#### 4.2.7. Capacidade de absorção e perda de massa em etanol

O etanol é um solvente orgânico de baixa toxicidade e por isso é usado para se fazer a incorporação de compostos de caráter hidrofóbico por impregnação a úmido a dispositivos de liberação controlada, dado que estes compostos geralmente são solúveis neste solvente, como é o caso do alfa-bisabolol.

Tendo isso em vista, é importante avaliar o comportamento das membranas em etanol, uma vez que elas sofrem exposição a este solvente durante o processo de incorporação dos compostos ativos à sua estrutura. A análise da perda de massa deve ser feita para se poder verificar a estabilidade das membranas no solvente. Já a capacidade de absorção deve ser determinada, pois espera-se que quantidade apreciável de etanol seja absorvida pela membrana para que ela se expanda suficientemente e retenha a maior quantidade possível do composto nele dissolvido. Os resultados da análise de absorção e perda de massa em etanol são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados dos testes de absorção e perda de massa em etanol para as membranas de quitosana e goma guar (Q-G) e de policaprolactona (PCL), para 1 hora e 24 horas de exposição ao solvente.

Tempo (h)	Amostra	Absorção ( $g_{\text{etanol}}/g_{\text{membrana}}$ )	Perda de massa (%)
1	Q-G	$0,35 \pm 0,09^{a,A}$	$5,26 \pm 0,20^{a,A}$
	PCL	$0,07 \pm 0,02^{b,B}$	$2,46 \pm 0,27^{b,C}$
24	Q-G	$0,27 \pm 0,12^{a,A}$	$8,36 \pm 0,30^{a,B}$
	PCL	$0,10 \pm 0,02^{a,B}$	$2,54 \pm 0,14^{b,C}$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas referem-se à comparação de membranas de diferentes formulações expostas ao solvente durante o mesmo tempo e letras maiúsculas referem-se à comparação de membranas de mesma formulação expostas por um período de tempo diferente.

Comparando-se a absorção de etanol obtida para as membranas de Q-G com sua absorção de água, pode-se dizer que os valores obtidos são considerados baixos. Nota-se na Tabela 11 que a capacidade de absorção de etanol das membranas de PCL é ainda menor, e devido a este resultado, optou-se por não realizar o teste de incorporação nessas membranas pelo método de impregnação em solução etanólica.

Observando-se os resultados de absorção de etanol das membranas de Q-G para tempos de exposição de 1 hora e de 24 horas, verifica-se que não houve diferença significativa entre os valores obtidos, logo, a permanência da membrana em solução por um tempo prolongado não aumenta a quantidade de etanol absorvida. Sendo assim, os testes de incorporação do composto ativo, nos quais a maior absorção possível de etanol é visada, podem ser feitos com exposição das amostras a soluções etanólicas por 1 hora apenas, pois a exposição por tempo maior não acarretará em aumento da absorção da solução de impregnação. A perda de massa, por sua vez, foi maior para um tempo de exposição de 24 horas para as membranas de Q-G, o que indica, novamente, que o curto período de exposição é o mais apropriado. Pode-se afirmar que os valores obtidos são pequenos e não afetam significativamente a estabilidade dos filmes em etanol.

#### ***4.2.8. Incorporação de alfa-bisabolol às membranas***

##### *4.2.8.1. Eficiência de incorporação do alfa-bisabolol*

A incorporação do alfa-bisabolol por adição direta à mistura polimérica durante a preparação das membranas de Q-G foi feita nas proporções de 20% e 30% do composto em relação à massa total de polímeros presentes na mistura, o que correspondeu à adição de 180 e 270 mg de alfa-bisabolol, respectivamente, à formulação contendo 0,9 g de polissacarídeos. Já no caso das membranas de PCL, a proporção de alfa-bisabolol adicionada foi de 20% (m/m), o que foi equivalente à adição

de 80 mg do composto à formulação contendo 0,4 g do polímero. Os resultados da análise da eficiência de incorporação do alfa-bisabolol pelo método da adição direta à mistura polimérica são mostrados na Tabela 12.

Observa-se que, para ambas as formulações de Q-G, a eficiência de incorporação do alfa-bisabolol foi baixa, indicando baixa afinidade do composto pela matriz polimérica. Esta baixa afinidade está relacionada ao caráter de hidrofiliicidade/hidrofobicidade do composto e da matriz, sendo que o primeiro é mais hidrofóbico, enquanto que a segunda é hidrofílica. Grande parte do composto provavelmente foi perdida nas etapas de neutralização e lavagem da membrana. Principalmente na etapa de neutralização, na qual etanol também está presente, é que possivelmente ocorreu maior arraste, uma vez que o composto ativo tem grande afinidade por este solvente. A incorporação do alfa-bisabolol na proporção de 30% (m/m) aumentou a quantidade do composto retido na membrana em comparação com a formulação na qual este composto foi incorporado na proporção de 20% (m/m), no entanto, apesar deste aumento, a quantidade incorporada ainda não foi significativa e não viabilizou o uso deste método.

Tabela 12: Eficiência de incorporação do alfa-bisabolol (Bis) às membranas pelo método da adição direta do composto à mistura polimérica.

<b>Formulação</b>	<b>Proporção de composto adicionado (% m/m)</b>	<b>Massa de composto adicionado (mg/g)</b>	<b>Massa de composto retido na membrana (mg/g)</b>	<b>Eficiência de incorporação (%)</b>
Q-G-Bis	20	200	1,33 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,17 <sup>a</sup>
Q-G-Bis	30	300	4,96 ± 0,93 <sup>b</sup>	1,65 ± 0,31 <sup>b</sup>
PCL-Bis	20	200	200	100

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para as membranas de PCL, em contrapartida, determinou-se que 100% do composto adicionado ficou nelas retido, tendo em vista que ensaios preliminares

mostraram que o alfa-bisabolol não evapora nas condições de preparo dos filmes e, na água de lavagem das placas de Petri nas quais os filmes foram preparados, não foi detectada a presença do composto. Como não há procedimentos de neutralização e lavagem para esta formulação, elimina-se a possibilidade de perdas do composto que haveria nestas etapas.

Conforme já mencionado, a incorporação do alfa-bisabolol às membranas de PCL por imersão em solução etanólica não foi realizada, considerando que os resultados de absorção de etanol pelos filmes de PCL mostraram que as amostras absorveram uma quantidade praticamente nula deste solvente. Conseqüentemente, não haveria o intumescimento necessário para a penetração do composto solubilizado no etanol e sua difusão pela matriz.

Já no caso das membranas de Q-G, a incorporação por impregnação a úmido foi feita primeiramente em amostras de 1 cm<sup>2</sup> e cerca de 45 mg, que foram expostas a 4 mL de soluções etanólicas de alfa-bisabolol de concentrações 0,075, 1,2, 3,0 e 7,5 mg/mL. Os resultados da análise da eficiência de incorporação do alfa-bisabolol nestas amostras são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Eficiência de incorporação do alfa-bisabolol às membranas pelo método de imersão em solução etanólica.

<b>Concentração inicial do composto no solvente (mg/mL)</b>	<b>Composto adicionado (mg/g)</b>	<b>Composto retido na membrana (mg/g)</b>	<b>Eficiência de incorporação (%)</b>
0,075	73,17	0,21 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,08 <sup>a</sup>
1,2	1116,28	96,09 ± 27,67 <sup>b</sup>	9,19 ± 2,72 <sup>b</sup>
3,0	2857,14	236,62 ± 10,66 <sup>c</sup>	7,33 ± 0,08 <sup>b</sup>
7,5	7500,00	509,10 ± 28,35 <sup>d</sup>	6,61 ± 0,21 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Observou-se, em todos os casos, baixa eficiência de incorporação do alfa-

bisabolol, que variou de 7 a 9% para as soluções de incorporação de concentrações mais elevadas, e 0,30% quando utilizada a solução de menor concentração. Esse resultado refletiu aqueles obtidos para a absorção de etanol, que mostraram a pequena capacidade das membranas de Q-G de absorver este solvente e, conseqüentemente, de reter compostos nele dissolvidos. Pode-se dizer que a maior eficiência de incorporação obtida por este método em relação ao método da adição deve-se ao fato de a incorporação ter ocorrido após a etapa de neutralização das membranas com NaOH e etanol, e assim não houve perda do composto decorrente desta etapa. Veiga (2012) fez a incorporação dos fármacos piroxicam, um alcaloide, e cetoprofeno, uma benzofenona (vide estruturas químicas no Anexo I), a membranas de Q-G. Tais compostos possuem caráter lipofílico e massas molares próximas à do alfa-bisabolol. A autora obteve eficiência de incorporação de 0,33% para o piroxicam e de 0,48% para o cetoprofeno, quando usado o método da impregnação em solução etanólica. Eficiências menores que aquelas obtidas neste trabalho na situação em que se utilizou as soluções de maiores concentrações para incorporação foram obtidas, provavelmente devido ao fato de que em seu trabalho foram adicionadas menores quantidades dos fármacos por grama de membrana e, neste caso, a força motriz para entrada destes compostos na matriz era menor.

Optou-se então por utilizar a água como co-solvente na solução de impregnação na qual as amostras eram imersas para se fazer a incorporação do alfa-bisabolol. Esta estratégia foi adotada considerando que os valores de absorção de água pelas membranas de Q-G são consideravelmente superiores aos valores de absorção de etanol. Assim sendo, era esperado que a solução de alfa-bisabolol em água e etanol penetrasse mais eficientemente na matriz, afastando as cadeias poliméricas e permitindo maior retenção do alfa-bisabolol nas membranas. Para se determinar a proporção de água e etanol utilizados, realizou-se um teste de solubilidade do alfa-bisabolol em soluções constituídas de diferentes proporções dos dois líquidos. Os resultados deste teste são mostrados na Tabela 14 e na Figura 29.

Destaca-se aqui que, alternativamente, poderia ter sido utilizada a técnica de



produção de micro ou nanocápsulas poliméricas ou nanopartículas densas contendo o alfa-bisabolol e sua incorporação às membranas de Q-G como uma tentativa de aumentar a eficiência de incorporação do agente ativo às matrizes. No entanto, a abordagem escolhida neste trabalho pode ser considerada mais atrativa por ser tecnicamente mais simples e também menos onerosa.

Tabela 14: Aspecto das soluções no teste de solubilidade do alfa-bisabolol em diferentes proporções da mistura água:etanol. Concentração do alfa-bisabolol nas soluções: 7,5 mg/mL.

Água (%)	Etanol (%)	Aparência da solução
0	100	Límpida
25	75	Límpida
50	50	Gotículas dispersas
75	25	Turva

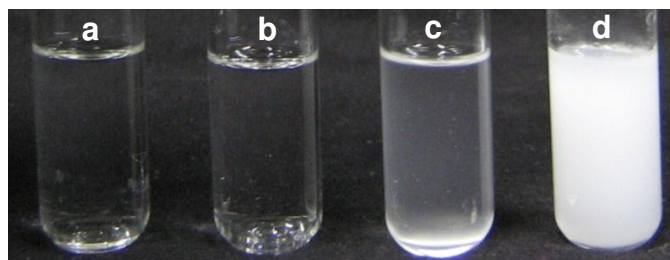


Figura 29: Aparência das soluções de alfa-bisabolol na concentração 7,5 mg/mL em água/etanol nas proporções em volume de (a) 0:100 %, (b) 25:75 %, (c) 50:50 % e (d) 75:25 %.

Com base no teste de solubilidade, foi determinado que a solução utilizada para a impregnação de alfa-bisabolol em membranas de Q-G seria composta de água e etanol na proporção de 25% e 75%, respectivamente. O resultado da eficiência de

incorporação do composto às membranas por imersão nesta solução é mostrado na Tabela 15. Observa-se que houve um aumento significativo da eficiência de incorporação do composto à matriz, bem como da massa de composto retido quando utilizado o solvente contendo uma proporção de água. Logo, como esperado, pode-se dizer que a água atuou intumescendo a estrutura da matriz e promovendo a entrada de maior quantidade da solução de impregnação, o que acarretou em uma maior massa de alfa-bisabolol retido nas amostras. Mesmo que a eficiência de incorporação ainda não seja alta, a vantagem deste método é que grandes quantidades do composto podem ficar retidas nas membranas.

Tabela 15: Eficiência de incorporação do alfa-bisabolol às membranas pelo método de imersão em solução de água/etanol (25:75 %)

<b>Concentração inicial do composto no solvente (mg/mL)</b>	<b>Composto adicionado (mg/g)</b>	<b>Composto retido na membrana (mg/g)</b>	<b>Eficiência de incorporação (%)</b>
0,075	74,07	10,26 ± 1,87 <sup>a</sup>	15,08 ± 2,12 <sup>a</sup>
1,2	1371,43	232,13 ± 31,65 <sup>b</sup>	17,89 ± 2,44 <sup>a</sup>
3,0	3000,00	537,32 ± 41,92 <sup>c</sup>	18,14 ± 1,49 <sup>a</sup>
7,5	6122,45	1076,46 ± 22,14 <sup>d</sup>	17,56 ± 1,16 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Na Tabela 16 são apresentados dados comparativos dos coeficientes de partição estimados nos sistemas resultantes das diferentes condições de incorporação (soluções alcoólicas e hidroalcoólicas de alfa-bisabolol). A partição do alfa-bisabolol entre a solução e a membrana foi estimada diretamente pela relação entre as massas do composto em cada sistema após tempo suficiente para se atingir o equilíbrio. Percebe-se pela Tabela 16 que, em qualquer situação, a tendência do alfa-bisabolol, por seu caráter hidrofóbico, é de se acumular nas soluções. Entretanto, o acúmulo na solução é muito menor quando se realiza sua incorporação a partir da mistura

água/etanol do que partindo-se diretamente da solução etanólica, possivelmente por a matriz se tornar mais acessível em razão de seu maior intumescimento em soluções hidroalcoólicas do que em etanol somente.

Tabela 16: Coeficientes de partição do alfa-bisabolol entre as soluções de incorporação e as membranas após imersão em soluções alcoólicas e hidroalcoólicas (25:75 % água/etanol) de alfa-bisabolol.

Concentração inicial do composto no solvente (mg/mL)	Coeficiente de partição (massa de bisabolol em solução/massa de bisabolol na membrana)	
	Incorporação de alfa-bisabolol em etanol	Incorporação de alfa-bisabolol na mistura água/etanol
0,075	347,4	6,2
1,2	10,6	4,9
3,0	11,1	4,6
7,5	13,7	4,7

Por fim, destaca-se que a solução usada para impregnação a partir da mistura água/etanol ao final do processo contém ainda grande parte do alfa-bisabolol nela solubilizado e poderia ser reaproveitada para se fazer novas bateladas de incorporação, o que elevaria a eficiência global do processo e a viabilidade do uso deste método.

#### 4.2.8.2. Aspecto visual, cor e opacidade das membranas contendo alfa-bisabolol

O aspecto típico das membranas de Q-G e PCL às quais foi incorporado o alfa-bisabolol pelo método da adição à mistura polimérica é mostrado na Figura 30. É possível observar que os filmes de Q-G contendo alfa-bisabolol são mais rugosos que os de PCL, cuja superfície se mostra lisa. Observa-se ainda que as formulações contendo o alfa-bisabolol são aparentemente mais opacas que as formulações às quais este composto não foi incorporado, mostradas na Figura 24.



Figura 30: Aspecto visual das membranas às quais alfa-bisabolol foi incorporado pelo método da adição à mistura polimérica, sendo (a) quitosana-goma guar-bisabolol 20% (m/m), (b) quitosana-goma guar-bisabolol 30% (m/m), e (c) policaprolactona-bisabolol 20% (m/m).

De fato, os valores de opacidade mostrados na Tabela 17, referentes às membranas às quais o alfa-bisabolol foi incorporado pelo método da adição, corroboram esta afirmação. Supõe-se que este aumento na opacidade tenha sido resultado do espalhamento de luz ocasionado pelo alfa-bisabolol alojado na matriz, que promove uma não uniformidade nos filmes, conforme será discutido mais adiante quando apresentadas as micrografias. Mehdizadeh et al. (2012) e Peng e Li (2014) observaram o mesmo comportamento ao adicionar óleos essenciais a matrizes constituídas de polissacarídeos. Pode-se notar ainda a alteração de cor dos filmes de Q-G contendo alfa-bisabolol nas duas proporções estudadas em relação àqueles mostrados anteriormente, de cor amarelo-esverdeada, já que o novo valor de *Hue* indica uma cor amarelo-alaranjada. Já para as membranas de PCL, este parâmetro indicou que não houve mudança na coloração, e os filmes contendo o composto ativo permanecem verde-amarelados. Para ambas as formulações, os valores de *Croma* revelam que a intensidade das cores obtidas é muito baixa. Logo, pode-se afirmar que a inserção do composto na matriz ocasiona mudanças significativas na aparência das membranas.

Tabela 17: Parâmetros relativos à cor e opacidade das amostras de quitosana e goma-guar (Q-G) e de policaprolactona (PCL) contendo alfa-bisabolol (Bis).

<b>Amostra</b>	<b>Opacidade (%)</b>	<b>Hue</b>	<b>Croma</b>
Q-G-Bis 20%	49,23 ± 1,50 <sup>a</sup>	72,31 ± 1,10 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,02 <sup>a</sup>
Q-G-Bis 30%	51,74 ± 1,82 <sup>a</sup>	70,67 ± 1,53 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,02 <sup>a</sup>
PCL-Bis 20%	81,63 ± 0,32 <sup>b</sup>	-66,95 ± 0,82 <sup>b</sup>	1,75 ± 0,04 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Quanto às membranas em que o alfa-bisabolol foi incorporado por impregnação em solução de água e etanol (25:75%) de concentração igual a 7,5 mg/mL, cuja quantidade de composto retido foi a maior dentre as membranas às quais o composto foi incorporado por este método, o aspecto visual é mostrado na Figura 31, comparativamente à membrana isenta do composto e àquelas às quais o composto foi incorporado por adição.

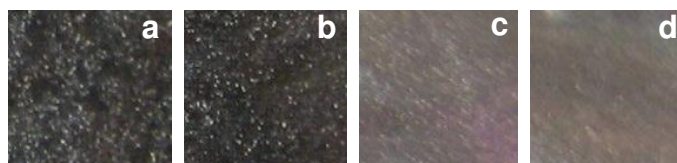


Figura 31: Aspecto visual de amostras das membranas (a) isenta de alfa-bisabolol, (b) à qual o alfa-bisabolol foi incorporado pelo método da impregnação em solução de água e etanol (25:75%) de concentração igual a 7,5 mg/mL, (c) à qual o alfa-bisabolol foi incorporado pelo método da adição à mistura polimérica na proporção de 20% e (d) à qual o alfa-bisabolol foi incorporado pelo método da adição à mistura polimérica na proporção de 30%. Nas fotografias as amostras foram posicionadas sobre um tecido de cor preta.

Aparentemente, não há alteração de opacidade da membrana à qual o

composto foi incorporado pelo método da impregnação em relação à membrana isenta do composto. Logo, a opacidade destas membranas é menor que a daquelas obtidas por incorporação por adição. Isto indica que, provavelmente, a incorporação por adição causou uma mudança morfológica nas membranas, no sentido de torná-las mais irregulares e, portanto, espalharem mais a luz, o que não ocorre no caso das membranas obtidas pelo outro método de incorporação. Esta afirmação será corroborada mais adiante quando apresentadas as micrografias das amostras, no item 4.2.8.3. Assim, apesar de no caso de as membranas obtidas por incorporação por impregnação a quantidade de composto retida ser significativamente maior, o que sugeriria um maior espalhamento da luz, o efeito da alteração da morfologia nas outras membranas se mostra bem mais significativo sobre a opacidade.

Não foi possível realizar as análises de cor e opacidade das amostras obtidas por incorporação por impregnação devido à quantidade limitada de material disponível. Tais caracterizações requerem amostras de tamanho maior que aquelas obtidas no ensaio de incorporação e a obtenção dessas amostras maiores demandaria grande quantidade do composto.

#### *4.2.8.3. Morfologia da superfície e seção transversal*

As morfologias da superfície e da seção transversal das amostras de Q-G e PCL após a incorporação de alfa-bisabolol são mostradas nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

Pode-se observar na Figura 32 que, nas membranas às quais o composto foi incorporado por adição à mistura polimérica, tanto na proporção de 20% (m/m) quanto na de 30% (m/m), existem pequenas bolhas distribuídas heterogeneamente na superfície, nas quais pode haver alfa-bisabolol alojado. No entanto, nota-se também a formação de poros na superfície, bem como na seção transversal, o que indica que o alfa-bisabolol, neste caso, atuou como um agente porogênico. Supõe-se que,

provavelmente, o composto adicionado ficou, em um primeiro momento, retido na membrana pela formação de bolhas revestidas por uma fina camada polimérica. Nas etapas de lavagem e neutralização, houve então o rompimento destas bolhas e arraste do material ali contido. Além do arraste do alfa-bisabolol pela solução de neutralização contendo etanol, é provável que o intumescimento das matrizes pela água de lavagem, mesmo sendo pequeno, provocou um maior relaxamento das cadeias poliméricas, facilitando a difusão e arraste do composto que se encontrava no interior da matriz.

Já para as membranas de Q-G às quais se incorporou o alfa-bisabolol por impregnação em solução etanólica a 75%, é possível notar a presença de regiões contendo bolhas na superfície, nas quais provavelmente o composto se encontra alojado. A micrografia da seção transversal revela uma estrutura densa, assim como a apresentada pela membrana na qual o composto ativo não está presente. Neste caso não foi possível observar a formação de poros.

Quanto às membranas de PCL contendo alfa-bisabolol mostradas na Figura 33, nota-se a presença de blocos interconectados decorrentes da exclusão do composto ativo durante a formação da matriz polimérica. O alfa-bisabolol tende a formar canais entre as redes poliméricas, em um comportamento que remete àquele apresentado na estrutura de uma espuma, na qual há formação de canais de Plateau, referentes à drenagem do líquido entre as bolhas presentes. Nota-se na imagem da seção transversal da amostra que o alfa-bisabolol é então direcionado para bolsões presentes no interior da matriz polimérica, onde permanece alojado. Yeh *et al.* (2011) relatam resultados de análise de morfologia da superfície similares aos obtidos neste trabalho para as membranas de PCL contendo alfa-bisabolol. No entanto, os autores utilizaram para a obtenção dos filmes a acetona, um solvente no qual o polímero é pouco solúvel e, portanto, tem pouca afinidade. Fazendo então uma analogia entre os comportamentos observados nos dois trabalhos, é possível supor que, em ambos os casos, a matriz polimérica tende a se formar de maneira a excluir da rede o composto no qual sua solubilidade é baixa, neste caso, o alfa-bisabolol, o que ocasiona a formação dos blocos de forma poligonal observados.

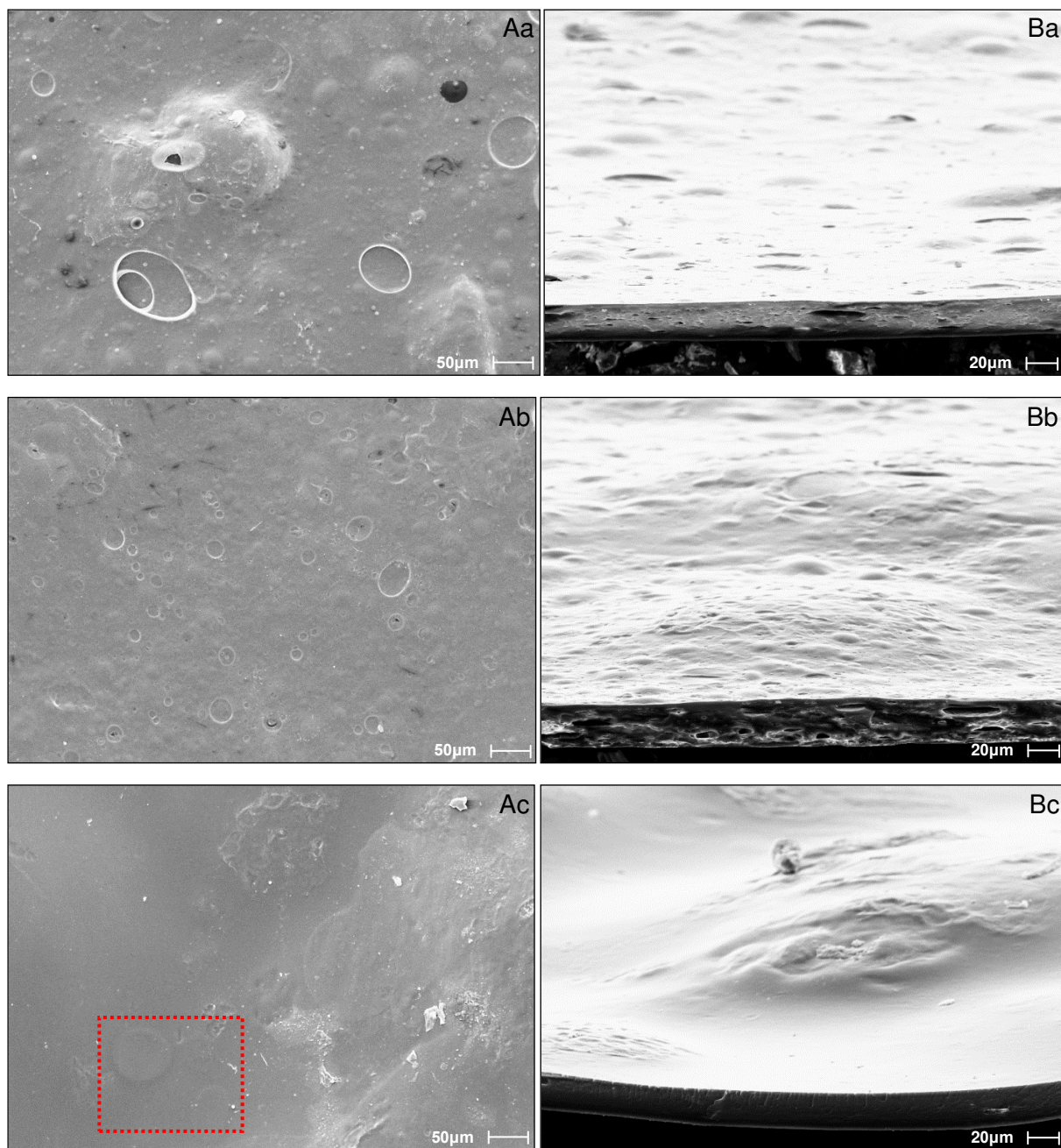


Figura 32: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de quitosana e goma-guar às quais foi incorporado o composto alfa-bisabolol (a) por adição à mistura polimérica na concentração de 20% (m/m), e (b) na concentração de 30% (m/m), e (c) por imersão em solução etanólica 75% de concentração 7,5 mg/mL. O destaque em (Ac) indica a presença de bolhas nas quais provavelmente o alfa-bisabolol se encontra alojado.



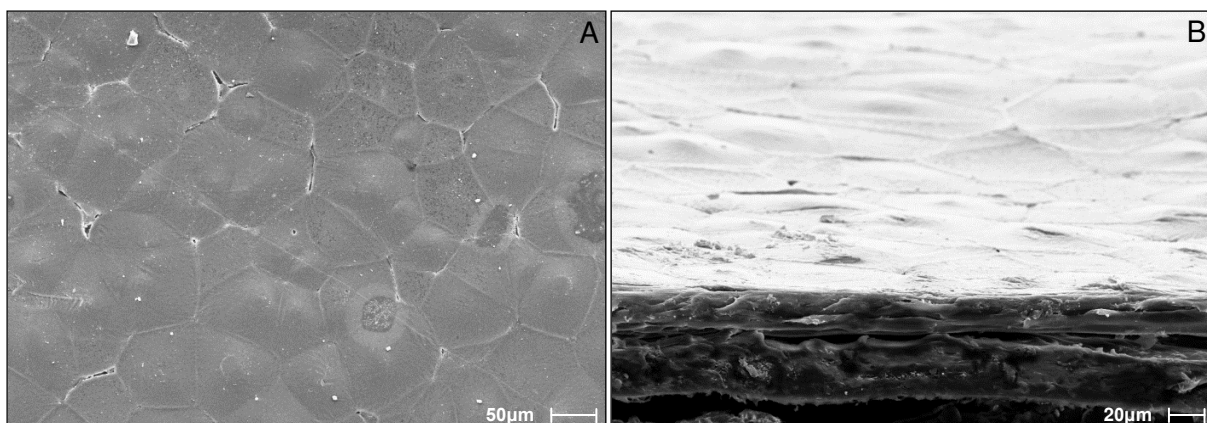


Figura 33: Superfície (A) e seção transversal (B) das membranas de policaprolactona às quais foi incorporado o composto alfa-bisabolol por adição à mistura polimérica na concentração de 20% (m/m) em relação à massa de polímero.

#### 4.2.8.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas com o objetivo de identificar interações entre os polímeros após o preparo das membranas, bem como verificar possíveis modificações na estrutura das matrizes poliméricas ao se incorporar um composto adicional. Os espectros FTIR das membranas poliméricas, dos polímeros isolados utilizados em sua produção e também do composto ativo alfa-bisabolol são mostrados nas Figuras 34 e 35.

Nos espectros da quitosana e da goma guar, mostrados na Figura 34, observa-se uma banda entre  $3600$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de grupos hidroxila presentes em ambos os polímeros. Outra banda é observada entre  $3000$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$ , relacionada a vibrações axiais de ligações C-H. Em torno de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , observam-se vários pequenos picos característicos de polissacarídeos, referentes a ligações C-O, C-C e C-O-C (Smitha *et al.* 2005; Mudgil *et al.*, 2012; Shahid *et al.*, 2013; Veiga, 2012).

Além das bandas acima mencionadas, no espectro da quitosana verificam-se também picos em  $1643\text{ cm}^{-1}$  e  $1581\text{ cm}^{-1}$ , referentes à ligação C=O dos grupos amida I

ainda acetilados e ao grupo amino, respectivamente (Li *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2010; Smitha *et al.*, 2005), e outro pico em  $1380\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à deformação de grupos  $-\text{CH}_2$  (Li *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2010; Smitha *et al.*, 2005). Já no espectro da goma guar, observa-se um pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , relativo à flexão dos grupos  $-\text{OH}$  (Wang e Wang, 2009), além de um segundo pico em  $875\text{ cm}^{-1}$ , típico deste polímero, referente aos grupos galactose e manose (Mudgil *et al.*, 2012; Manikoth *et al.*, 2012).

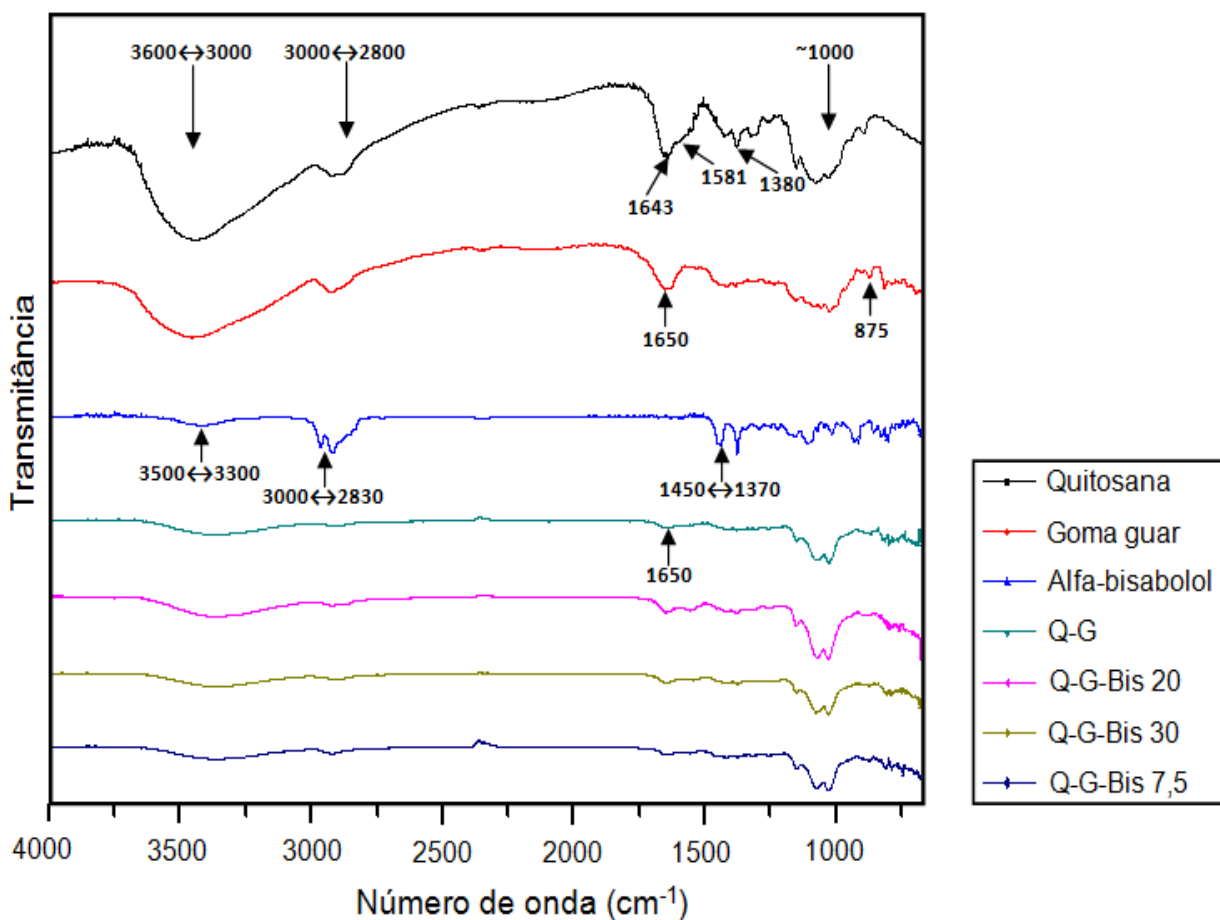


Figura 34: Espectro FTIR obtido para as membranas de quitosana e goma guar contendo ou não alfa-bisabolol incorporado pelos métodos da impregnação do composto em solução de água e etanol (25:75%) de concentração igual a  $7,5\text{ mg/mL}$  (formulação Q-G-Bis 7,5) e adição do composto à mistura polimérica (formulações Q-G-Bis 20 e Q-G-Bis 30). Também são mostrados os espectros dos componentes isolados.

No espectro da membrana de quitosana e goma guar, verifica-se que houve a sobreposição dos picos referentes às amidas da quitosana e às hidroxilas da goma guar. O pico resultante em  $1650\text{ cm}^{-1}$  tem menor intensidade, indicando que ocorre uma interação entre os dois polímeros. O mesmo resultado foi verificado nos espectros obtidos por Veiga (2012).

O alfa-bisabolol apresenta regiões com picos característicos, sendo a banda entre  $3500$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de grupos  $\text{-OH}$ , os picos compreendidos entre  $3000$  e  $2830\text{ cm}^{-1}$  relativos às deformações axiais de ligações  $\text{C-H}$ , enquanto que os picos entre  $1450$  e  $1370\text{ cm}^{-1}$  referem-se às deformações angulares das ligações  $\text{C-H}$  (Silva, 2009).

Os espectros das membranas às quais o alfa-bisabolol foi incorporado, seja por adição direta à mistura polimérica ou por imersão em solução etanólica, são similares ao espectro da membrana isenta do composto, logo, não é possível verificar, por meio desta técnica, a presença do composto adicionado na matriz polimérica. Levando em conta que o alfa-bisabolol, é distribuído na matriz de forma heterogênea, há a possibilidade de que as amostras analisadas realmente não contivessem o composto, que estaria presente apenas regiões não analisadas da membrana produzida.

O espectro da policaprolactona na forma de pellets, mostrado na Figura 35, apresenta picos em  $2948$  e  $2869\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento assimétrico e simétrico de grupos  $\text{-CH}_2$ . O pico de grande intensidade em  $1722\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento dos grupos carbonila ( $\text{-C=O}$ ), enquanto que os picos em  $1187$  e  $1243\text{ cm}^{-1}$  são relativos às vibrações dos grupos éster. O pico em  $1295\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de ligações  $\text{C-O}$  e  $\text{C-C}$  e o pico em  $1369\text{ cm}^{-1}$  é referente às vibrações dos grupos  $\text{-CH}_2$  (Khatiwala *et al.*, 2008; Suganya *et al.*, 2011; Martínez-Abad *et al.*, 2013).

Observa-se que o espectro da policaprolactona na forma de filme não sofreu alteração em relação àquele do polímero na forma de pellets. Da mesma forma, o espectro do filme polimérico ao qual o alfa-bisabolol foi incorporado apresenta o mesmo perfil daquele observado para o filme isento do composto. Este comportamento pode indicar que não há interação clara entre o composto incorporado e a matriz polimérica.

De fato, nas micrografias destes filmes já mostradas anteriormente, observou-se a exclusão do alfa-bisabolol durante a formação da matriz polimérica. Outra justificativa para o alfa-bisabolol não ter sido detectado nas membranas de PCL-Bis pode ser pelo fato de que a técnica de FTIR-ATR utilizada tem sensibilidade apenas até uma profundidade de 4  $\mu\text{m}$  a partir da superfície. Pela Figura 33, vemos que os bolsões onde estaria localizado preferencialmente o alfa-bisabolol estariam em uma profundidade maior que esta.

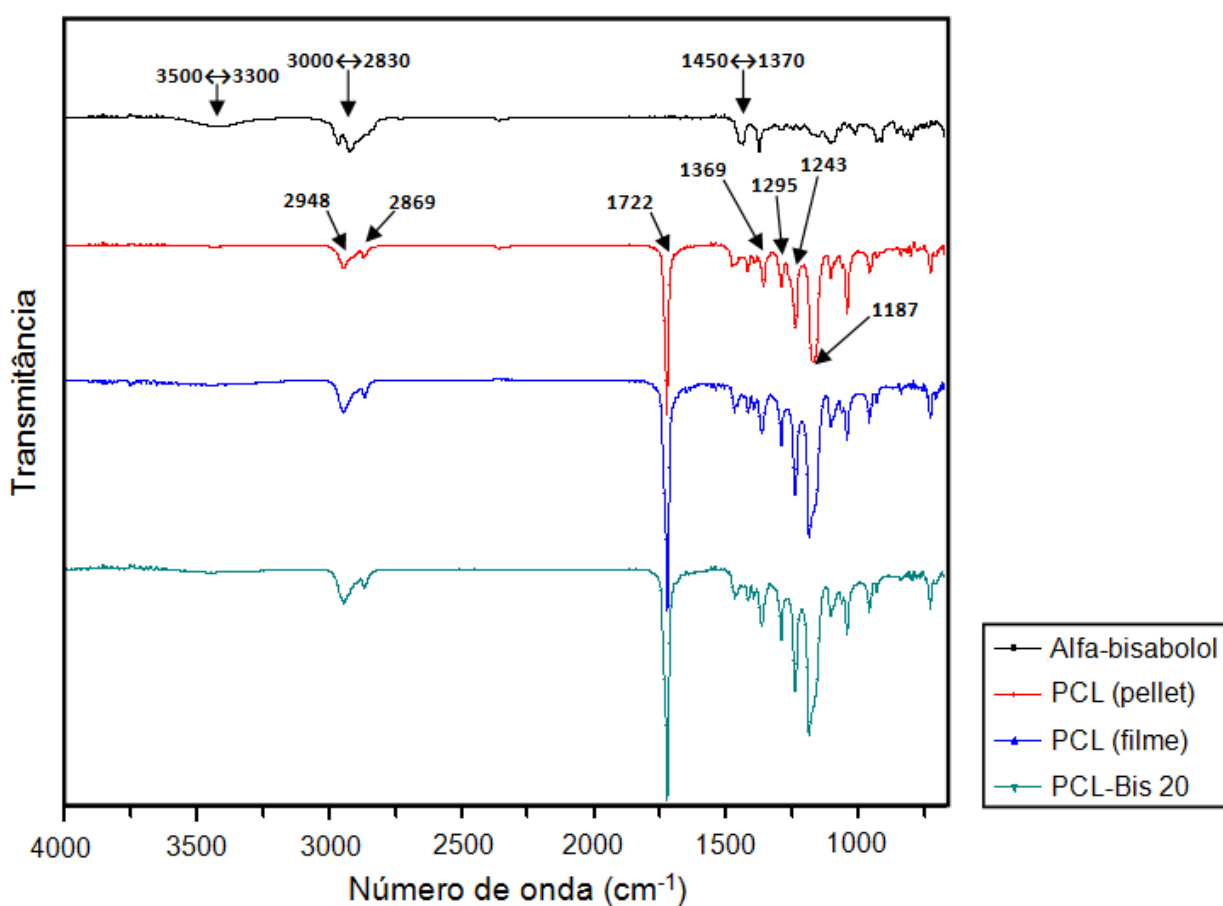


Figura 35: Espectro FTIR obtido para as membranas de policaprolactona contendo ou não alfa-bisabolol incorporado pelo método de adição do composto à mistura polimérica (formulação PCL-Bis 20). Também são mostrados os espectros dos componentes isolados.

### 4.3. Estudo da cinética de liberação do alfa-bisabolol

A fim de verificar se as membranas produzidas contendo alfa-bisabolol são capazes de liberar a quantidade requerida do composto para uso tópico (1 a 10 mg/g), fez-se o estudo da cinética de liberação do agente ativo em um meio de liberação que simula o ambiente fisiológico (PBS, pH 7,4, a 37 °C).

Na Tabela 18 e na Figura 36 são mostrados os resultados da cinética de liberação do alfa-bisabolol para as membranas de PCL, no que diz respeito à variação da concentração do composto na solução de liberação, quantidade liberada por grama de membrana e percentagem liberada em função do tempo. Houve troca do meio de liberação nos tempos de 15 e 48 horas.

Tabela 18: Concentração de alfa-bisabolol no meio de liberação em função do tempo para o ensaio com as membranas de PCL.

Tempo (h)	Concentração (mg/mL)
0,5	0,003
1	0,008
5	0,017
10	0,016
15*	0,017
24	0,002
48*	0,003
72	0,003
96	0,004
120	0,005

\* Tempos em que houve troca do meio de liberação.

Observa-se que cerca de 6% do composto, o equivalente a 12 mg<sub>composto</sub>/g<sub>membrana</sub>, foi liberado em um período de aproximadamente 120 horas. Verifica-se que em até 15 horas ocorre uma liberação relativamente mais rápida, que

possivelmente se deve ao desprendimento do composto mais fracamente associado à matriz, localizado apenas na sua superfície. Já a fração do composto que estava localizada nas camadas mais internas da membrana, ou nos bolsões, como visualizado nas micrografias, tem uma liberação lenta, atrasada pelo processo de difusão do composto pela matriz. Além da dificuldade imposta por este processo de difusão, deve-se considerar também o fato de que o alfa-bisabolol é liberado gradativamente em pequenas quantidades devido à grande afinidade do composto pela matriz de PCL, considerando que ambos possuem caráter hidrofóbico.

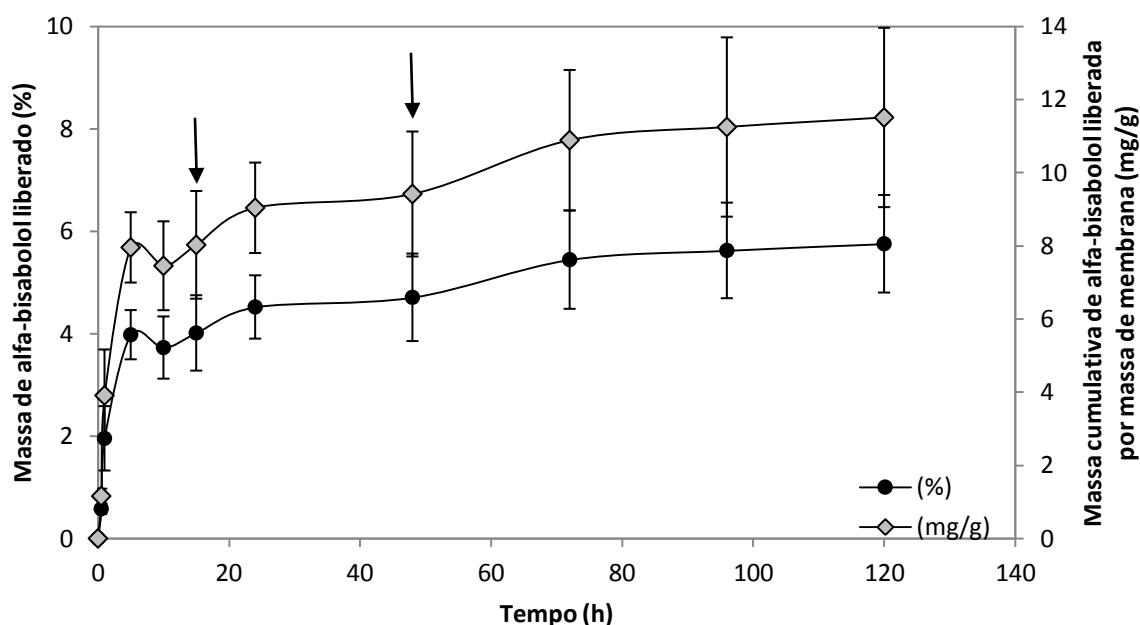


Figura 36: Liberação de alfa-bisabolol incorporado às membranas de PCL por adição direta à mistura polimérica em termos de massa liberada do composto por massa de membrana (mg/g) e porcentagem liberada (%). A massa do composto retida no filme era de 200 mg/g. As setas indicam os tempos em que houve troca do meio de liberação.

Tornello *et al.* (2012) incorporaram o composto bioativo hidrofóbico embelina a filmes de PCL e avaliaram sua cinética de liberação em PBS. Os autores observaram o mesmo tipo de perfil de liberação verificado neste trabalho, sendo que houve uma

liberação rápida da embelina em até 10 horas, seguida de uma liberação mais lenta a partir de então. No entanto, no caso da embelina, cerca de 80% do composto era liberado nas 10 primeiras horas e atingia um patamar próximo a 100% de liberação, correspondente à liberação de 46,85 mg<sub>composto/g</sub>membrana, em 150 horas.

Para as membranas de quitosana complexada com goma guar, o estudo de liberação foi feito apenas para a formulação que apresentou maior quantidade do composto retido na matriz, 1076,46 mg<sub>composto/g</sub>membrana, ou seja, aquela na qual o alfa-bisabolol foi incorporado ao filme de Q-G por imersão deste em solução de água/etanol (25%/75%) de concentração 7,5 mg<sub>composto/mL</sub>solvente.

Na Tabela 19 e na Figura 37 são mostrados os resultados da cinética de liberação do alfa-bisabolol para as membranas de Q-G, no que diz respeito à variação da concentração do composto na solução de liberação, quantidade liberada por grama de membrana e percentagem liberada em função do tempo. O meio de liberação foi trocado a cada 1 hora até o tempo de 4 horas para evitar que a quantidade liberada superasse o limite máximo de detecção da curva de calibração.

Tabela 19: Concentração de alfa-bisabolol no meio de liberação em função do tempo para o ensaio com as membranas de Q-G.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
0,5	0,006
1*	0,034
2*	0,026
3*	0,022
4*	0,018
5	0,014
10	0,025
15	0,023
24	0,027
48	0,029

\* Tempos em que houve troca do meio de liberação.

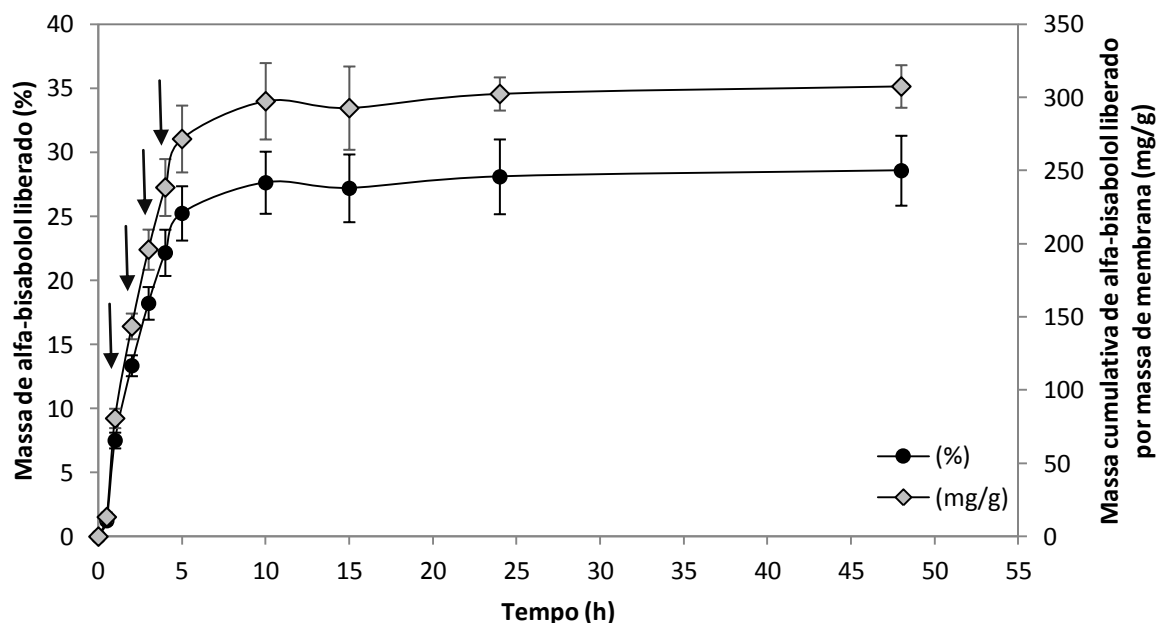


Figura 37: Liberação de alfa-bisabolol incorporado às membranas de quitosana e goma guar por imersão em solução de água/etanol (25:75%) de concentração 7,5 mg/mL em termos de massa liberada do composto por massa de membrana (mg/g) e porcentagem liberada (%). A massa do composto retida no filme era de 1076,46 mg/g. As setas indicam os tempos em que houve troca do meio de liberação.

Observa-se que a porcentagem máxima do composto liberada no período estudado, que foi de 48 horas, foi de cerca de 30% do retido, o que equivale a aproximadamente 300 mg<sub>composto</sub>/g<sub>membrana</sub>. Observa-se neste caso um perfil semelhante à liberação do composto das membranas de PCL, no qual há uma liberação de maior quantidade de composto em um menor intervalo de tempo logo no início, seguida de uma liberação mais lenta a partir de determinado ponto. Neste caso, a liberação rápida aconteceu em um tempo de até 10 horas. A explicação deste resultado pode ser feita de forma análoga à já feita para as membranas de PCL. O composto liberado de forma mais rápida no início estava localizado na superfície da matriz, enquanto que a fração liberada mais lentamente é aquela que se encontrava no seu interior.

Diferentemente da matriz de PCL, que apresenta uma alta afinidade pelo alfa-



bisabolol, como já comentado anteriormente, a matriz de Q-G é hidrofílica e, portanto, não possui tamanha afinidade pelo composto. No entanto, tendo em vista que esta possui em sua estrutura alguns grupos de natureza hidrofóbica ( $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ), que tendem a acomodar o alfa-bisabolol, pode-se dizer que o meio de liberação é mais hidrofílico que a membrana. Assim, a quantidade de alfa-bisabolol liberada é maior para as membranas de Q-G, porém, ainda não é considerada elevada. Além disso, levando em conta que a presença de PBS no interior da matriz facilitaria a difusão do composto, pois atuaria abrindo as cadeias poliméricas, a baixa absorção deste fluido pelas membranas de Q-G pode também justificar a dificuldade de transferência de massa e a liberação do composto no meio em pequena quantidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Haupt *et al.* (2006), que analisaram a liberação do fármaco celecoxib (vide estrutura química no Anexo I), altamente hidrofóbico, de membranas preparadas nas proporções mássicas de quitosana e goma guar de 1:0, 2:1 e 1:2. A liberação foi feita em meio PBS ao qual foi adicionado o ceco de ratos, ou seja, a parte inicial do intestino grosso, já que a aplicação desejada era a liberação do fármaco no cólon. Os autores observaram que, para membranas de quitosana e goma guar na proporção mássica de 2:1, a liberação do fármaco foi de cerca de 15% em 24 horas. Já para membranas nas quais a proporção em massa entre os dois polissacarídeos era de 1:2, a percentagem máxima liberada neste intervalo de tempo atingiu 45%. A maior liberação de celecoxib para a formulação com proporção mássica de 1:2 foi atribuída ao fato de que as bactérias presentes no ceco são capazes de degradar os filmes pelo rompimento de ligações glicosídicas presentes na estrutura dos polímeros, e essa degradação é tanto maior quanto maior for a proporção de goma guar na formulação. Tal degradação acelera a liberação da droga pela matriz. Os autores afirmaram que as percentagens liberadas no meio contendo ceco foram maiores que aquelas atingidas para liberação em meio PBS sem aditivos, porém, não mostraram os resultados para este estudo.

Assim como para as membranas de PCL contendo o alfa-bisabolol, a liberação do composto a partir das membranas de Q-G também pode ser considerada lenta. Esta

liberação lenta é vantajosa pois indica que os sistemas podem ser utilizados como reservatórios do composto ativo por um grande período de tempo, requerindo trocas menos frequentes do curativo e trazendo assim mais conforto ao paciente. Considerando que a dosagem do alfa-bisabolol para uso tópico está na faixa de 1 a 10 mg/g, pode-se afirmar que ambas as formulações seriam capazes de liberar esta quantidade do composto e, portanto, podem ser consideradas eficazes para a aplicação proposta.

## 5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho possibilitou que se chegasse às seguintes conclusões:

Filmes íntegros e levemente opacos de PCL foram obtidos pelo procedimento utilizado para sua preparação, que consistiu no uso do polímero de massa molar de 80 kDa, concentração de 2% e volume de solvente clorofórmio igual a 20 mL.

As membranas de PCL e de Q-G possuem superfície pouco hidrofílica e apresentaram reduzida absorção de soluções aquosas e baixa taxa de transmissão ao vapor d'água, o que sugere que estes filmes seriam adequados apenas para a aplicação em lesões pouco exsudativas ou ferimentos com cicatrização relativamente avançada. Alterações significativas nas propriedades mecânicas dos filmes de Q-G ocorreram apenas em condições de umidade mais elevada e, em toda a faixa de umidade estudada, estes filmes apresentaram compatibilidade mecânica com a pele. Os filmes de PCL são bastante alongáveis e, por isso, seu uso seria vantajoso do ponto de vista de sua adaptabilidade aos movimentos do paciente.

O alfa-bisabolol de origem natural, utilizado nos ensaios de incorporação, apresentou grau de pureza de 96%, sendo constituído majoritariamente do diastereoisômero alfa(-)-bisabolol. Entretanto, sua atividade antioxidante foi baixa quando comparada à de compostos antioxidantes comuns.

A incorporação do alfa-bisabolol às membranas de Q-G por adição do composto à mistura polimérica resultou em baixa eficiência de incorporação (máximo de 1,65%, equivalente a 4,96 mg composto/ g de membrana), o que indicou baixa afinidade do alfa-bisabolol pela matriz, além de grande perda do composto nas etapas de neutralização e de lavagem. O máximo de eficiência de incorporação obtido por impregnação das membranas em solução etanólica de alfa-bisabolol foi de cerca de 18%, com uma retenção de aproximadamente 1080 mg composto/ g de membrana para a formulação em que o composto foi incorporado por imersão em solução de água e

etanol (25:75 %) de concentração igual a 7,5 mg/mL. No caso das membranas de PCL, todo o alfa-bisabolol adicionado ficou retido na estrutura da matriz polimérica, logo, alta eficiência de incorporação foi observada.

A comparação do aspecto dos filmes contendo ou não alfa-bisabolol mostrou que a inserção do composto na matriz ocasiona mudanças significativas em sua aparência, já que, para ambas as formulações, houve aumento na opacidade com a adição do composto e, para a formulação de Q-G, houve alteração da cor dos filmes.

Para ambos os métodos de incorporação utilizados, o alfa-bisabolol ficou retido em bolhas heterogeneamente distribuídas na superfície da matriz de Q-G e, no caso específico do método da adição, o composto funcionou como agente porogênico. Nas membranas de PCL, o composto ficou alojado em bolsões no interior da estrutura dos filmes. A análise FTIR-ATR não foi sensível o suficiente para permitir a detecção do alfa-bisabolol nas matrizes.

A liberação do composto foi lenta tanto para os filmes de PCL como para os de Q-G. A percentagem máxima liberada ficou em torno de 6% e 30%, o equivalente a 12 e 300 mg composto/ g de membrana para filmes de PCL e de Q-G, respectivamente. Esta liberação de forma lenta permite que os sistemas sejam utilizados como reservatórios do composto ativo por grandes períodos, o que sugere que seria possível que a troca do curativo fosse realizada com intervalos de tempo maiores, tornando o tratamento menos incômodo para o paciente.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- ✓ O estudo de outros meios de lavagem dos filmes recém processados, como, por exemplo, o uso de uma solução contendo o composto incorporado, a fim de se evitar grandes perdas nesta etapa;
- ✓ A incorporação do alfa-bisabolol às matrizes de Q-G pela combinação dos métodos de incorporação estudados neste trabalho, isto é, incorporação primária por adição do composto diretamente à mistura polimérica, seguida da incorporação por impregnação em solução etanólica;
- ✓ A adição de um agente tensoativo à mistura de quitosana, goma guar e alfa-bisabolol, a fim de se obter maior retenção e melhor distribuição do composto nas matrizes;
- ✓ A encapsulação do alfa-bisabolol em lipossomas, SLNs (*solid lipid nanoparticles*) ou mesmo em partículas constituídas de polímeros de caráter hidrofóbico, como é a própria PCL, e a dispersão destas partículas nas matrizes de Q-G, a fim de aumentar a eficiência de incorporação do composto a estas matrizes;
- ✓ A adição de um terceiro polissacarídeo à mistura de quitosana e goma guar, como a xantana ou o alginato, com o intuito de se obter filmes com maior capacidade de intumescimento, que poderiam ser então utilizados no tratamento de lesões mais exsudativas;
- ✓ A avaliação da permeabilidade dos filmes ao oxigênio, uma vez que a oxigenação de lesões de pele é um fator importante para sua cura;

- ✓ A avaliação da atividade antioxidante remanescente do alfa-bisabolol após a sua incorporação às membranas, a fim de se verificar se ocorre perda na atividade durante o processamento do material;
- ✓ A caracterização físico-química e mecânica dos filmes aos quais o alfa-bisabolol foi incorporado em quantidade significativa;
- ✓ A análise da citotoxicidade a fibroblastos dos filmes *in vitro*;
- ✓ A avaliação do desempenho *in vivo* das membranas obtidas no que se refere ao tratamento de lesões de pele.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrahman, T.; Newton, H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery*, v. 29, n. 10, p. 491-495, 2011.
- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Allured Publishing Corporation*, 4<sup>a</sup> Ed., 2011. ISBN 9781932633214.
- 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 E95-96: Standard test methods for water vapor transmission of materials, 1995.
- Andrade, M. G. L.; Camelo, C. N.; Carneiro, J. A.; Terêncio, K. P. Evidências de alterações do comportamento de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica. *Revista Brasileira de Queimaduras*, v.12, n.1, p. 42-48, 2013.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Consulta Pública nº109 de 11/12/2003 - Indicadores de qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[6046-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[6046-2-0].PDF)>. Acesso em 27/03/2013.
- Ávila, A.; Bierbrauer, K.; Pucci, G.; López-González, 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.
- Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Fook, M. V. L.; Costa, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

- 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
- Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 325–347, 2010.
- 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 Sciences*, v. 97, p. 2892-2923, 2008.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- Brehm-Stecher, B. F.; Johnson, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, Bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3357-3360, 2003.
- Broussard, K. C.; Powers, J. G. Wound Dressings: selecting the most appropriate type. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 14, p. 449-459, 2013.
- 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.
- Chen, J.; Chang, G.; Chen, J. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 313, p. 183–188, 2008.



- Cheung, H. Y.; Lau, K.; Lu, T.; Hui, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B*, v. 38, p. 291-300, 2007.
- Chung, H. J.; Park, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 249-262, 2007.
- Clark, A.; Khweiss, N.; Salazar, L.; Verdadero, L. Promoting sustainability in the value chain of natural bisabolol, a Brazilian rainforest product. *School of International and Public Affairs, SIPA at Columbia University*, 2011.
- Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.; Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulation. *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 5-24, 2007.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p.3670-3695, 2013.
- Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 780-792, 2013.
- 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, 2005.
- Daroncho, M. Quantificação da atividade antioxidante através de análises pelos métodos DPPH e ABTS. *VI Seminário de nutrição da Unifra*, 2012.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.

- Dee, K. C.; Puleo, D. A.; Bizios, R. Biomaterials. In: *An introduction to tissue-biomaterial interactions*; Wiley-Liss, cap.1., 2002. ISBN 0-471-25394-4.
- Dias, A. M. A ; Rey-Rico, A.; Oliveira, R. A.; Marceneiro, S.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Júnior, R. N. C.; Braga, M. E. M.; de Sousa, H. C. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 74, p. 34-45, 2013.
- 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.
- Edwards, C.; Marks, R. Evaluation of biochemical properties of human skin. *Clinics in Dermatology*, v. 13, p. 375-380, 1995.
- Egydio, J. A. Avaliação do potencial de utilização de licopeno obtido por extração supercrítica como agente antiapoptótico no cultivo de células de inseto. *Tese de doutorado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.
- Ehrenreich M.; Ruszczak Z. Tissue-engineered temporary wound coverings. Important options for the clinician. *Acta Dermatoven APA*,v. 15, p. 5-13, 2006.
- Fernandes, L. L. Produção e caracterização de membranas de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas; *Projeto de graduação*; Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2009.
- Foglio, M. A. Um estudo químico da *Artemisia annua L.* aclimatada no Brasil; *Tese de Doutorado*; Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 1996.

- Franco, D.; Gonçalves, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.
- Gaudio, C. D.; Ercolani, E.; Nanni, F.; Bianco, A. Assessment of poly(epsilon-caprolactone)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends processed by solvent casting and electrospinning. *Materials Science and Engineering A*, v. 528, p. 1764-1772, 2011.
- Goycoolea, F. M.; Arguelles-Monal, W.; Peniche, C.; Higuera-Ciapara, I. Chitin and chitosan. *Novel Macromolecules in Food Systems*, p. 265-308, 2000.
- Haupt, S.; Zioni, T.; Gati, I; Kleinstern, J.; Rubinstein, A. Luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 28, p. 204-211, 2006.
- Hess, C. T. Wound Care. *Lippincott William and Wilkins*, 5th ed., 2005. ISBN: 978-1-58255-294-1.
- Htay, A. S.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W. Development of perforated microthin poly(epsilon-caprolactone)films as matrices for membrane tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 15, n. 5, p. 683-700, 2004.
- 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.
- Justo, O.; Moraes, A. M.; Barreto, G. P. M.; Mercadante A. Z.; Rosa, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química nova*, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

- Kamatou, G. P. P.; Viljoen, A. M. A Review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -bisabolol and  $\alpha$ -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, p. 1-7, 2010.
- Khatiwala, V. K.; Shekhar, N.; Aggarwal, S.; Mandal, U. K. Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) film by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 16, p. 61-67, 2008.
- Khor, H. L.; Ng, K. W.; Schantz, J. T.; Phan, T.; Lim, T. C.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. *Materials Science and Engineering C*, v. 20, p. 71-75, 2002.
- Kim, D.; Lee, K. W.; Lee, H. J; Lee, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, p. 3713-3717, 2002.
- Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 721-734, 1990.
- Kontogiannopoulos, K. N.; Assimopoulou, A. N.; Tsvintzelis, I.; Panayiotou, C.; Papageorgiou, V. P. Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 409, p. 216-228, 2011.
- Kumbar, S.; Laurecin, C.; Deng, M. Natural and synthetic biomedical polymers. *Elsevier*, 1st ed., 2014. ISBN: 978-0-12-396983-5.
- Kuravadi, N. A.; Verma, S.; Pareek, S.; Gahlot, P.; Kumari, S.; Tanwar, U. K.; Bhatele, P.; Choudhary, M.; Gill, K. S.; Pruthi, V.; Tripathi, S. K.; Dhugga, K. S.; Randhawa, G. S. Capítulo 3 - Guar: An industrial crop from marginal farms. In: *Agricultural Sustainability*, Elsevier, 2013.

- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; García-Padilla, M. C.; Fett, R. Atividade antioxidante de pigmentos antociânicos. *Revista Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 691-693, 2004.
- Kwak, H. W.; Kang, M. J.; Bae, J. H.; Hur, S. B.; Kim, I.; Park, Y. H.; Lee, K. H. Fabrication of *Phaeodactylum tricornutum* extract-loaded gelatin nanofibrous mats exhibiting antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 63, p. 190-204, 2014.
- Lamke, L.O.; Nilsson, G. E.; Reithner, H. L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns*, v. 3, p. 159-165, 1977.
- Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p.3919-3928, 2005.
- Lin, W.; Lu, C. Characterization and permeation of microporous poly( $\epsilon$ -caprolactone) films. *Journal of Membrane Science*, v. 198, p. 109–118, 2002.
- Liu, C.; Xia, Z; Czernuszka, J. T. Design and development of 3D scaffolds for tissue engineering. *Chemical engineering research and design*, v. 85, p. 1051–1064, 2007.
- Luong-Van, E.; Grondahl, L.; Chua, K. N.; Leong, K. W.; Nurcombe, V.; Cool, S. M. Controlled release of heparin from poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*, v. 27, p. 2042-2050, 2006.
- 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.

- Manikoth, R.; Kanungo, I.; Fathima, N. N.; Rao, J. R. Dielectric behaviour and pore size distribution of collagen-guar gum composites: effect of guar gum. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 628-637, 2012.
- Martínez-Abad, A.; Sánchez, G.; Fuster, V.; Lagaron, J. M.; Ocio, M. J. Antibacterial performance of solvent cast polycaprolactone (PCL) films containing essential oils. *Food Control*, v. 34, p. 214-220, 2013.
- McCarty, M. F. Glucosamine for wound healing. *Medical hypotheses*, v. 47, n. 4, p. 273-275, 1996.
- McHugh, T. H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, F. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 899-903, 1993.
- Mehdizadeh, T.; Tajik, H.; Rohani, S. M. R.; Oromiehie, A. R. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. *Veterinary Research Forum*, v. 3, n. 3, p. 167-173, 2012.
- Miguel, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, v. 15, p. 9252-9287, 2010.
- Mogosanu, G. D.; Grumezescu, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 463, p. 127-136, 2014.
- Moon, C. H.; Crabtree, T. G. New wound dressing techniques to accelerate healing. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, v. 5, p. 251-260, 2003.
- Mudgil, D.; Barak, S.; Khatkar, B. S. Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 224-228, 2012.

- Mulder, M.; Small, N.; Botma, Y; Ziady, L; Mackenzie, J. Basic principles of wound care. *Maskew Miller Longman*, 2002. ISBN 1-8689-1136-5.
- Muthukumar, T.; Prabu, P.; Ghosh, K.; Sastry, T. P. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 113, p. 207-212, 2014.
- Muthukumar, T.; Senthil, R.; Sastry, T. P. Synthesis and characterization of biosheet impregnated with *Macrotyloma uniflorum* extract for burn/wound dressings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102; p. 694-699, 2013.
- Newman, D. J; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.
- Ng, K. W.; Achuth, H. N.; Mochhala, S.; Lim, T. C.; Hutmacher, D. W. *In vivo* evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 18, n. 7, p. 925-938, 2007.
- Ovington, L. G. Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology*, v. 25, p. 33-38, 2007.
- Patra, A. K. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer Science and Business Media, 2012. ISBN: 978-94-007-3925-3.
- Peña, J.; Corrales, T.; Izquierdo-Barba, I.; Doadrio, A. L.; Vallet-Regí, M. Long term degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, p. 1424-1432, 2006.
- Peng, Y.; Li, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, v. 36, p. 287-293, 2014.

- Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: a challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 1-12, 2012.
- Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 641-678, 2009.
- 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.
- Popa, N.; Novac, O; Profire, L.; Lupusoru, C. E.; Popa, M. I. Hydrogels based on chitosan-xanthan for controlled release of theophylline. *Journal of Materials Science*, v. 21, p. 1241-1248, 2010.
- Prabaharan, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, p. 117–124, 2011.
- Ramalingam, M.; Ramakrishna, S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Engineering*, v. 12, n. 3, p. 435-447, 2006.
- Randhawa, R.; Bassi, P.; Kaur, G. *In vitro*, *in vivo* evaluation of inter polymer complexes between carboxymethyl fenugreek gum and chitosan or carboxymethyl guar gum and chitosan for colon delivery of tamoxifen. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S202-S207, 2012.
- Rao, M. S.; Kanatt, S. R.; Chawla, S. P.; Sharma, A. Chitosan and guar gum composite films: preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p.1243–1247, 2010.



- Rao, S. B.; Sharma, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 34, p. 21-28, 1997.
- Rodrigues A. P.; Sanchez E. M. S.; da Costa A. C.; Moraes A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 2703-10, 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.
- Salgado, C. L.; Sanchez, E. M. S.; Mano, J. F.; Moraes, A. M. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Material Science*, v. 47, p. 659-667, 2012.
- São Pedro, A.; Detoni, C.; Ferreira, D. Cabral-Albuquerque, E.; Sarmiento, B. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of (-)-alpha-bisabolol from particulate systems. *Biomedical Chromatography*, v. 23, p. 966-972, 2009.
- Schilcher, H.; Imming, P.; Goeters, S. Capítulo 10: Chemical analysis of the active principles of chamomile. In: *Chamomile Industrial Profiles*. CRC Press, 2005 (b).
- Schilcher, H.; Imming, P.; Goeters, S. Capítulo 4: Active chemical constituents of *Matricaria chamomilla* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. In: *Chamomile Industrial Profiles*. CRC Press, 2005 (a).
- Shahid, M.; Bukhari, S. A.; Gul, Y.; Munir, H.; Anjum, F.; Zuber, M.; Jamil, T.; Zia, K. M. Graft polymerization of guar gum with acryl amide irradiated by microwaves for colonic drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 172-179, 2013.

- Silva, A. P. Síntese e avaliação da atividade antitumoral de tiossemicarbazonas derivadas do alfa-(-)-bisabolol; *Dissertação de mestrado*; Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá; Maringá, 2009.
- Sistema de Informação em Saúde (SIS): Artigos - O cenário das queimaduras no país. Disponível em: <<http://www.sissaude.com.br/sis/inicial.php?case=2&idnot=14140>>. Acesso em 15/06/2013.
- Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A. A. Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1859-1866, 2005.
- Sobral, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. *Ciência e Engenharia*, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.
- Spin-Neto, R.; Pavone, C.; Freitas, R. M.; Marcantonio, R. A. C.; Marcantonio-Júnior, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.
- Stashak, T. S.; Farstvedt, E.; Othic, A. Update on wound dressings: indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 3, p. 148-163, 2004
- Suganya, S.; Ram, T. S.; Lakshmi, B. S.; Giridev, V. R. Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: an excellent matrix for wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 121, p. 2893-2899, 2011.
- Suwantong, O.; Ruktanonchai, U.; Supaphol, P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or *Centella asiatica* crude extract and the release characteristics of asiaticoside. *Polymer*, v. 49, p. 4239-4247, 2008.

- Tang, Z. G.; Black, R. A.; Curran, J. M.; Hunt, J. A.; Rhodes, N. P.; Williams, D. F. Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ $\epsilon$ -caprolactone] films. *Biomaterials*, v. 25, p. 4741-4748, 2004.
- Tavares, A. P. M. Composição terpénica e actividade antioxidante de plantas e óleos; *Tese de mestrado*; Departamento de Química - Universidade de Aveiro; Aveiro, 2011.
- Tips for Skin: Skin Structure and functions. Disponível em: <<http://tipforskin.com/understanding-your-skin/skin-structures-and-functions.html>>. Acesso em 03/06/2013.
- Tornello, P. R. C.; Feresin, G. E.; Tapia, A.; Veiga, I. G.; Moraes, A. M.; Abraham. G. A.; Cuadrado, T. R. Dispersion and release of embelin from electrospun, biodegradable, polymeric membranes. *Polymer Journal*, v. 44, p. 1105-1111, 2012.
- Tortora, G. J.; Derrickson, B. Principles of anatomy and physiology. *John Wiley & Sons*, 13rd ed., 2012.
- Veiga, I. G. Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para a liberação controlada de anti-inflamatórios; *Tese de doutorado*; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas, 2012.
- 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.
- Voss, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the royal horticultural society colour chart. *HortScience*, v. 27, p. 1256-1260, 1992.

- Wang, W.; Wang, A. Preparation, characterization and properties of superabsorbent nanocomposites based on natural guar gum and modified rectorite. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 891–897, 2009.
- Weller, C.; Sussman, G. Wound dressings update. *Journal of pharmacy practice and research*, v. 36, n. 4, p. 318-324, 2006.
- Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1217–1256, 2010.
- Yang, J. Y.; Singh, D.; Singh, D.; Lee, E. M.; Choi, S.; Han, S. S.; Park, S. J. *Terminalia bellirica* extracts loaded on stimuli responsive HEMA-DEA hydrogel for enhanced growth and proliferation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 4, n. 1, p. 37-45, 2014.
- Yeh, C. C.; Chen, C. N.; Li, Y. T.; Chang, C. W.; Cheng, M. Y.; Chang, H. I. The effect of polymer molecular weight and UV radiation on physical properties and bioactivities of PCL films. *Cellular Polymers*, v. 30, n. 5, p. 227-242, 2011.

## ANEXO I

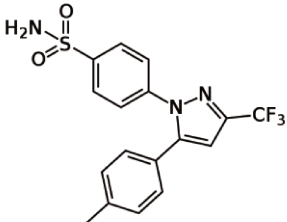
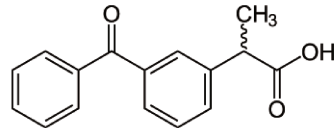
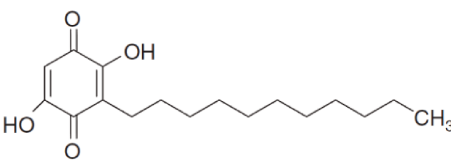
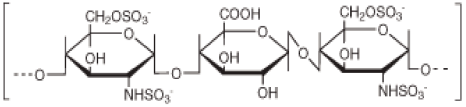
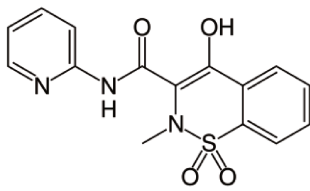
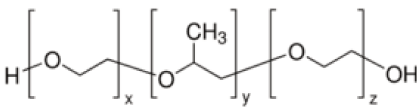
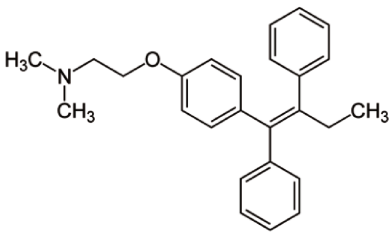
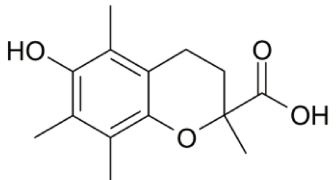
<p style="text-align: center;"><b>Celecoxib</b></p>  <p style="text-align: center;">4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-yl]benzenosulfonamida</p>	<p style="text-align: center;"><b>Cetoprofeno</b></p>  <p style="text-align: center;">ácido(RS)-2-(3-benzoil-fenil)propanóico</p>
<p style="text-align: center;"><b>Embelina</b></p>  <p style="text-align: center;">2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona</p>	<p style="text-align: center;"><b>Heparina</b></p>  <p style="text-align: center;">Polímero constituído de unidades de ácido urônico e glicosamina</p>
<p style="text-align: center;"><b>Piroxicam</b></p>  <p style="text-align: center;">(8E)-8-[hidroxi-piridina-2-ylamino]metilideno]-9-metil-10,10,dioxo-10-tia-9-azabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5-trien-7-ona</p>	<p style="text-align: center;"><b>Pluronic F68<sup>®</sup></b></p>  <p style="text-align: center;">Polímero constituído de unidades de óxido de etileno e óxido de propileno</p>
<p style="text-align: center;"><b>Tamoxifeno</b></p>  <p style="text-align: center;">(Z)-2-[4(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina</p>	<p style="text-align: center;"><b>Trolox<sup>®</sup></b></p>  <p style="text-align: center;">6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico</p>

Figura A1: Estrutura química dos compostos citados no trabalho.

## ANEXO II

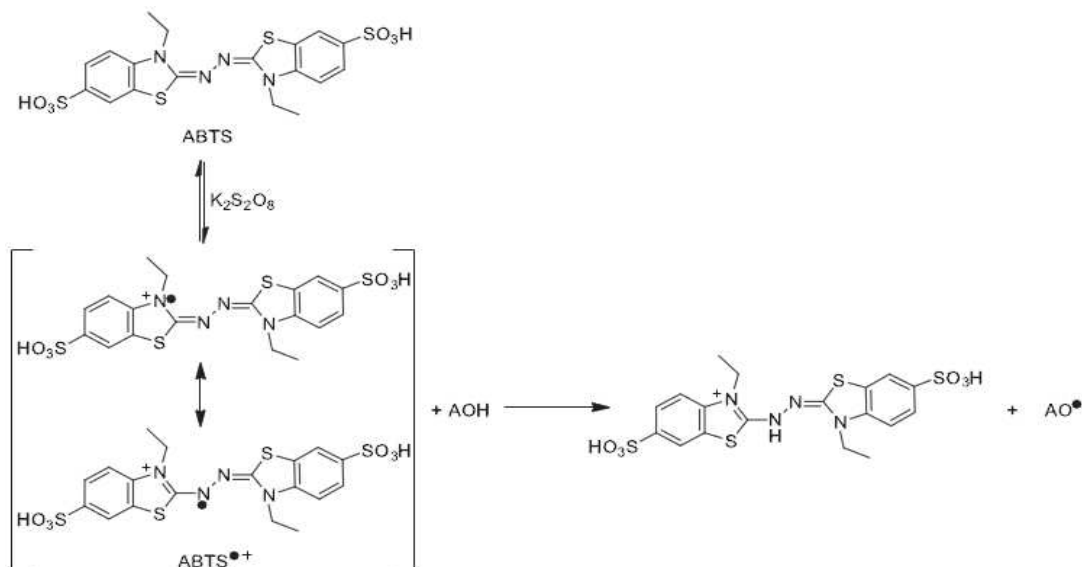


Figura All.1: Esquema da reação de oxidação do radical  $ABTS^{\bullet+}$  na presença de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_6$ ) e sua posterior reação com o composto antioxidante  $AOH$ <sup>1</sup>.

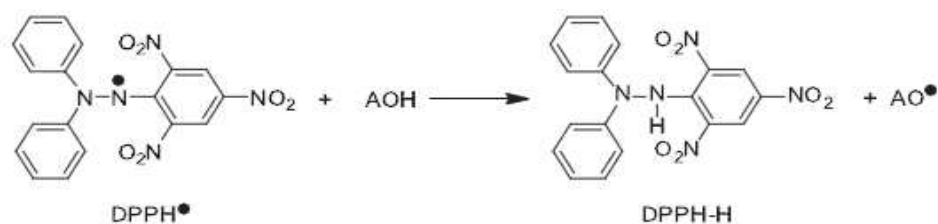


Figura All.2: Esquema de reação do radical  $DPPH^{\bullet}$  com o composto antioxidante  $AOH$ <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Adaptado de Oliveira, S.; Souza, G. A.; Eckert, C. R.; Silva, T. A.; Sobral, E. S.; Fávero, O. A.; Ferreira, M. J. P.; Romoff, P.; Baader, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, p. 1-7, 2014.

### **ANEXO III**

Tabela AIII: Umidade relativa mantida por soluções salinas saturadas em recipientes fechados à temperatura de 25 °C <sup>2</sup>.

<b>Sal</b>	<b>Umidade relativa a 25 °C (%)</b>
Acetato de potássio	22
Cloreto de magnésio	33
Nitrato de magnésio	53
Cloreto de sódio	75
Nitrato de potássio	92

A solução salina saturada deve ser preparada e colocada dentro de um dessecador. A umidade relativa obtida estará em torno dos valores listados na tabela acima para cada sal, e poderá variar um pouco de acordo com a quantidade de água utilizada para saturar esta solução.

<sup>2</sup> Adaptado de Quantifoil Instruments GmbH: Creating Constant air humidity in closed vessels. Disponível em: <http://www.qinstruments.com/uploads/media/humidity.pdf>. Acesso em 20/05/2013.

## ANEXO IV

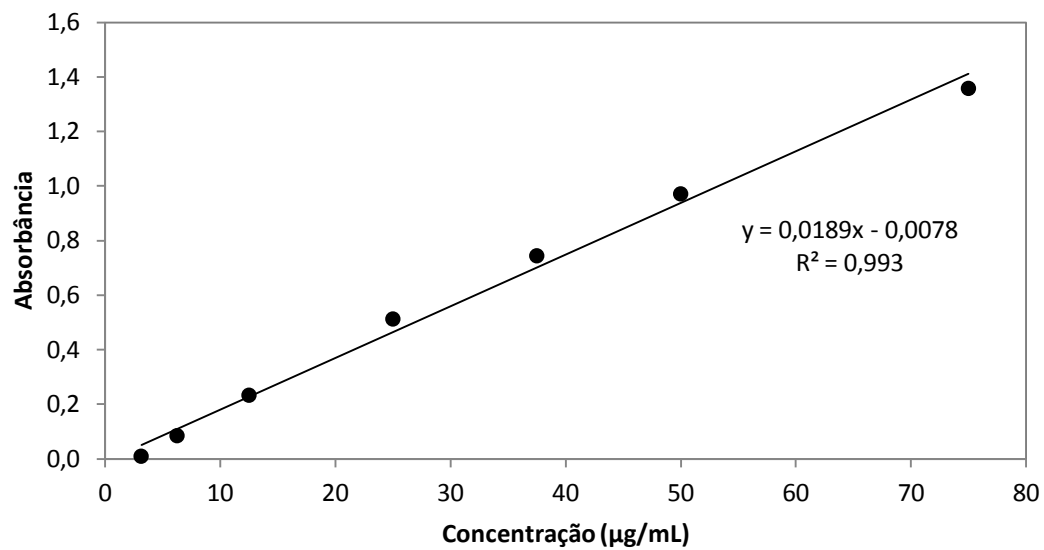


Figura AIV: Curva de calibração do alfa-bisabolol em etanol no comprimento de onda de 208 nm.



## ANEXO V

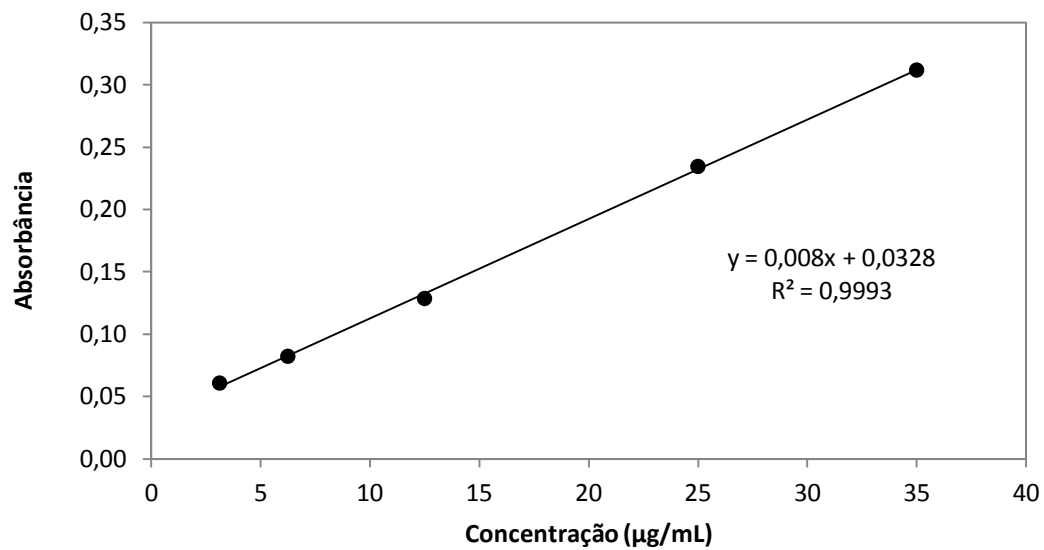


Figura AV: Curva de calibração do alfa-bisabolol em PBS no comprimento de onda de 208 nm.