



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Adalberto Enumo Junior

**Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose  
recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos  
cutâneos**

Florianópolis  
2020

Adalberto Enumo Junior

**Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose  
recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos  
cutâneos**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para  
a obtenção do título de Doutor em Química  
Orientador: Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Enumo Junior, Adalberto

Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de  
celulose recobertas com quitosana contendo curcumina  
aplicadas em tratamentos cutâneos / Adalberto Enumo Junior  
; orientador, Alexandre Luis Parize, 2020.

163 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Curcumina. 3. Quitosana. 4. Pluronic. 5.  
Curativo de pele. I. Parize, Alexandre Luis. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Química. III. Título.

Adalberto Enumo Junior

**Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose  
recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos  
cutâneos**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Marcia Margarete Meier, Dra.  
Relatora - UDESC/Joinville

Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.  
UFSC/Blumenau

Prof. Thiago Ferreira da Conceição Dr.  
UFSC

Giovana Carolina Bazzo Dra.  
UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Química.

---

Prof. Marcus Cesar Mandolesi Sá, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus familiares,  
por me ensinarem o significado de família e união.

Amo muito vocês!!!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Alexandre L. Parize, pela orientação, confiança, ensinamentos, apoio e amizade. E a todos os professores que me auxiliaram durante a pesquisa.

Aos meus familiares que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, em todos os momentos de minha vida. Além de me ensinarem o sentido de honestidade e companheirismo.

A todos os meus amigos do POLIMAT e agregados, pela companhia diária, conversas, risadas e trocas de experiências científicas. Todos vocês fizeram parte deste trabalho de alguma forma, e sou muito grato por isso. Vocês serão sempre lembrados por mim.

Aos laboratórios POLISSOL, LACBIO, GEEM, LCME, LabCQ, INCT, CERMAT Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia e Centrais de Análises do Departamento de Química e Engenharia Química, por seus valiosíssimos professores, alunos e técnicos.

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC por darem suporte ao programa.

CNPq e Capes PROEX pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Este estudo tem por objetivo o desenvolvimento de membranas a base de quitosana contendo curcumina associada a copolímeros do tipo Pluronic para posterior recobrimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose com finalidade de tratamentos cutâneos. Assim, o trabalho foi dividido em quatro capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral ao assunto, o segundo relata o estudo da curcumina (CUR) em diferentes solventes e sua interação com os copolímeros (PLU) P123 e F127 em meios aquosos e estado sólido por técnicas espectroscópicas e calorimétricas. Estudos de fluorescência demonstraram que a CUR interage mais com o P123 em comparação ao F127, quando em solução aquosa, e que o aumento da temperatura favorece a interação com ambos os copolímeros. O raio hidrodinâmico das partículas observadas por espalhamento de luz dinâmico demonstrou valores abaixo de 100 nm. Verificou-se por medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) a CUR tem solubilidade máxima, no estado sólido, próximas a 15% (m/m) em ambos os copolímeros. O Capítulo III, mostra o desenvolvimento de membranas a base de quitosana (QTS) contendo CUR incorporada nos PLUs na proporção 80:10:10 m/m através da técnica de secagem de solvente. Os resultados mostram que a adição dos copolímeros aumenta o grau de intumescimento, permeação ao vapor de água e alongação máxima das membranas a base de QTS e diminuem a tensão máxima, módulo de elasticidade e ângulo de contato em comparação às membranas contendo CUR, mas sem a adição dos copolímeros. Ou seja, as membranas ficam menos rígidas e quebradiças. Testes de liberação *in vitro* indicam que a presença dos PLUs nas membranas aumenta a quantidade de curcumina liberada para ~70% quando avaliadas em solução tampão contendo Tween 80, demonstrando bons ajustes ao modelo cinético de Peppas-Sahlin. Estudos de permeação *ex vivo* em pele humana mostram que a CUR permanece retida em uma quantidade entre 5 e 10 vezes maior na epiderme em comparação com a derme e que enzimas podem estar associadas à lise da estrutura das membranas de QTS e a concomitante liberação da CUR verificadas por microscopia confocal. Testes microbiológicos mostraram que os géis usados na formação das membranas de QTS contendo CUR foram eficientes contra o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações mínimas (MIC) de 25 e 100 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose (AC) e recobertas com as soluções filmogênicas de QTS foram objetos de estudo apresentados no Capítulo IV. Diferentes parâmetros instrumentais (distância agulha-coletor, voltagem e fluxo de solução) e de solução (concentração de polímero e mistura de solventes) foram abordados na tentativa de obter fibras com o maior tempo de continuidade possível. Dois recobrimentos diferentes foram avaliados: por *spin coating* e aspersão por aerógrafo. A combinação de fatores que demonstrou maior potencial de continuidade (~ 8 min) foi usando concentração de 11 % (m/m) de AC em mistura de acetona/[etanol/água] nas proporções 48/41[65/35], principalmente ao utilizar voltagem abaixo de 8,0 kV, distância entre 8,0 e 10,0 cm e fluxo de 4,0 mL h<sup>-1</sup>. O recobrimento das fibras de AC pelas soluções de QTS realizados através do aerógrafo proporcionou maior rendimento de deposição, uniformidade de aspersão e controle visual do processo.

**Palavras-chave:** Curcumina. Quitosana. Pluronic. Curativo de pele.

## ABSTRACT

This study aims to develop curcumin-loaded chitosan/Pluronic-type copolymers membranes for coating of electrospun cellulose acetate fibers for wound healing applications. Thus, the work was divided into four chapters, which the first one contains a general introduction to the subject, the second chapter reports the study of curcumin (CUR) in different solvents and its interaction with the copolymers (PLU) P123 and F127 in aqueous media and solid state by spectroscopic and calorimetric techniques. Fluorescence studies have shown that CUR interacts more with P123 than with F127, when in aqueous solution, and that the increase in temperature favor interaction with both copolymers. The hydrodynamic radii of the particles observed by dynamic light scattering showed values below 100 nm. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements showed that CUR has maximum solubility, in solid state, close to 15% (w/w) into both copolymers. Chapter III shows the development of chitosan-based (QTS) membranes containing CUR incorporated in the PLUs in the 8:10:10 (w/w) ratio using the casting method. The results showed that the addition of the copolymers to the formulations of QTS-based membranes increases the swelling degree, water vapor permeation and the elongation at break and decreases the tensile strength, Young's modulus and contact angle compared to those containing CUR, but without the addition of copolymers. That is, the membranes are less rigid and brittle. *In vitro* release essays indicate that the presence of PLUs in QTS membranes increases the amount of curcumin released to ~70%, when evaluated in a phosphate buffer containing Tween 80, demonstrating good fits to the Peppas-Sahlin kinetic model. *Ex vivo* permeation studies on human skin showed that CUR permeates between 5 to 10 times more in the epidermis than the dermis, and that enzymes may be associated with the lysis of the QTS membranes structure and concomitant release of CUR, verified by confocal microscopy. Microbiological tests indicated that the gels used to form the CUR-loaded QTS membranes were efficient against the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains at minimum concentration (MIC) of 25 and 100 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The development of cellulose acetate (AC) electrospun fibers and then covered with QTS-film-forming solutions were evaluated in Chapter IV. Different instrumental parameters (needle-collector distance, voltage and solution flow) were approached in an attempt to obtain fibers with the highest continuity time as possible. Two different coatings were evaluated: spin coating and spray by airbrush. The factors combination that demonstrated the greatest potential of continuity (~8 min) was using 11% (w/w) of AC in an acetone/[ethanol/water] mixture in the proportions of 48/41[65/35], mainly when employed voltage below 8.0 kV, distance between 8.0 and 10.0 cm and flow of 4.0 mL h<sup>-1</sup>. The covering of the AC fibers by QTS solutions performed through the airbrush provided greater deposition yield, spray uniformity and process visual control.

**Keywords:** Curcumin. Chitosan. Pluronic. Wound dressing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele e principais constituintes. .....	17
Figura 2 - Representação esquemática do processo geral de cicatrização de tecidos.	18
Figura 3 - Esquema da obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina por base concentrada ou por quitina desacetilase. ....	21
Figura 4 - Representação estrutural da celulose e do acetato de celulose. ....	23
Figura 5 - Estrutura dos principais curcuminóides presentes no açafrão: (A) curcumina (~77%), (B) demetóxicurcumina (~18%), e (C) bisdemetóxicurcumina (~5%). ....	25
Figura 6 – (A) Representação estrutural dos copolímeros P123 e F127 e (B) ilustração da formação de micelas em solução, abaixo e acima da concentração e temperatura micelar crítica (CMC e TMC, respectivamente). ....	28
Figura 7 - (A) Representação esquemática da interação em fase e fora de fase do momento de dipolo de transição, dando origem à divisão do estado excitado do dímero. (B) Processo de excitação/desexcitação das espécies monoméricas e diméricas, juntamente com o arranjo espacial dos dois tipos de dímeros. ....	33
Figura 8 - Estruturas relacionadas ao equilíbrio diceto/ceto-enol da CUR. ....	33
Figura 9 - Espectros de (A) absorção e (B) emissão normalizados da CUR (4,0 µg mL <sup>-1</sup> ) em acetona, acetonitrila, água, etanol e dimetilsulfóxido (a emissão da CUR em água foi a única não normalizada). Os espectros de emissão foram adquiridos a 25 °C utilizando $\lambda_{excitação} = \lambda_{abs}$ máxima. ....	40
Figura 10 - Influência da temperatura no espectro de absorção da CUR (4,0 µg mL <sup>-1</sup> ) em (A) etanol e (B) água. As setas indicam o sentido da variação espectral devido ao aumento da temperatura do sistema. ....	42
Figura 11 - Equilíbrio diceto/ceto-enólico (D/CE) da curcumina em (A) água, (B) etanol e (C) DMSO e (D) fase gasosa à 25°C. As constantes de equilíbrio (K) D/CE respectivo a direção enol estão destacadas e os comprimentos de ligação selecionados estão em Å. ....	44
Figura 12 - Esquema explicando a influência da temperatura, pH e solvente no equilíbrio tautomérico e no processo de agregação da curcumina em meio aquoso. ....	45
Figura 13 - (A) Variação dos espectros de absorção em função do tempo envolvidos na cinética de equilíbrio diceto/ceto-enol da curcumina (4,0 µg mL <sup>-1</sup> ) em água a 25°C e (B)	

zoom do ponto isobéstico em 374 nm. Os espectros foram obtidos após a adição de uma alíquota da solução estoque de CUR em etanol à uma cubeta contendo 2,5 mL de água..... 46

Figura 14 - Perfil cinético das principais bandas de absorção envolvidas no equilíbrio D/CE da CUR obtidos a partir da Figura 13. Mostrando a diminuição da banda da espécie ceto-enol em 428 nm, aumento da banda referente a espécie diceto em 358 nm e o perfil do ponto isobéstico em 374 nm..... 47

Figura 15 - (A) Perfil cinético de decaimento da banda de absorção normalizada referente à espécie ceto-enol (428 nm) em função do tempo em diferentes temperaturas e (B) logaritmo neperiano da absorção em 428 nm da CUR *versus* tempo em diferentes temperaturas. .... 48

Figura 16 - (A) Gráfico de  $\ln(k)$  versus  $1/T$  utilizado para obter o valor de energia de ativação ( $E_a$ ) e (B) gráfico de  $\ln(kh/k_B T)$  versus  $1/T$  utilizado para obter os parâmetros termodinâmicos de ativação ( $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  e  $\Delta G^\ddagger$ ) envolvidos no equilíbrio diceto/ceto-enol da curcumina em solução aquosa. .... 49

Figura 17 - Variação do espectro de emissão da CUR (2,08  $\mu\text{g}$ ) em função da concentração de (A) P123 (0–2,05  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e (B) F127 (0–40,00  $\text{mg mL}^{-1}$ ) em água.  $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$  e  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A massa de CUR indicada é obtida sabendo o volume da alíquota retirada da solução estoque de CUR em EtOH e transferida para a cubeta contendo 2,0 mL de água. 50

Figura 18 - Variação da intensidade de emissão da CUR (2,08 – 0,52  $\mu\text{g}$ ) em meio aquoso monitorada em 497 nm com o aumento da concentração de (A e C) P123 e (B e D) F127. São mostrados os resultados referentes às temperaturas de (A e B) 25  $^\circ\text{C}$  e (C e D) 37  $^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$ . As massas de CUR indicadas são obtidas sabendo o volume da alíquota retirada da solução estoque de CUR em EtOH e transferida para a cubeta contendo 2,0 mL de água. 52

Figura 19 - Solubilidade de cada quantidade de CUR utilizada para calcular a solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) em (A) P123 e (B) F127 a diferentes temperaturas. .... 53

Figura 20 – Gráfico de van't Hoff ( $\ln(K_M)$  *versus*  $1/T$ ) para o processo de interação da curcumina com os copolímeros (A) P123 e (B) F127 em meio aquoso..... 56

Figura 21 - Ajuste dos pontos experimentais de  $\Delta G$  em função de T relacionados a interação entre CUR e (A) P123 e (B) F127 em meio aquoso utilizando um polinômio de segunda ordem..... 57

Figura 22 - Curvas de autocorrelação  $G(\tau)$  das formulações de (A) P123 e (B) F127 (2,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) contendo CUR (0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) como função da temperatura. No canto direito superior está o gráfico de  $\Gamma$  *versus*  $q^2$ ..... 59

Figura 23 - Variação do raio hidrodinâmico aparente ( $R_h$ ) dos sistemas (A) P123, (B) F127, (C) CUR–P123 e (D) CUR–F127 em função da temperatura da solução.....	61
Figura 24 - Curvas de DSC da CUR, P123 e F127 puros realizados a uma taxa de 5 °C min <sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 0 a 190 °C.....	63
Figura 25 - Curvas de DSC dos plurônicos (A) P123 e (B) F127 com o aumento da quantidade de CUR (%m/m) na dispersão sólida. (C) e (D) apresentam a variação da temperatura de fusão dos componentes nos sistemas CUR–P123 e CUR–F127, respectivamente. ....	64
Figura 26 - Diagrama de triângulo de Tamman mostrando a entalpia de fusão dos plurônicos (círculos fechados) e da curcumina (círculos abertos) <i>versus</i> a porcentagem em massa da CUR incorporada em (A) P123 e (B) F127. ....	65
Figura 27 - Esquema de preparação de membranas a base de quitosana por secagem de solvente ( <i>casting</i> ).....	68
Figura 28 - Representação esquemática da célula de difusão de Franz. ....	77
Figura 29 - Características macroscópicas das membranas de (A) QTS pura, (B) QTS–F127, (C) QTS–P123, (D) QTS–CUR, (E) QTS–F127–CUR e (F) QTS–P123–CUR contendo 1% m/m de CUR e PLU.....	81
Figura 30 - Características macroscópicas das membranas de (A) QTS pura, (B) QTS–F127, (C) QTS–P123, (D) QTS–CUR, (E) QTS–F127–CUR e (F) QTS–P123–CUR contendo 10% m/m de CUR e/ou PLU. As figuras de cima exibem as fotos da parte de cima das membranas, enquanto que as figuras de baixo exibem as fotos da parte de baixo das membranas.....	81
Figura 31 - Microscopia óptica convencional (A, B e C) e microscopia de luz polarizada (D, E e F) das membranas de (A e D) QTS–CUR, (B e E) QTS–F127–CUR e (C e F) QTS–P123–CUR, respectivamente; As barras indicam tamanho de 250 µm. ....	83
Figura 32 - Microscopia confocal das membranas de composição (A) QTS–CUR, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR. As barras indicam a escala de 200 µm. As setas indicam domínios cristalinos de CUR não solubilizados na matriz. ....	84
Figura 33 - Espectros UV-Vis do conjunto de membranas (A) QTS pura, QTS–F127, QTS–CUR e QTS–F127–CUR e (B) QTS pura, QTS–P123, QTS–CUR e QTS–P123–CUR. ....	85

Figura 34 - Espectros de FTIR obtidos via KBr para (A) componentes puros e modo ATR para as membranas de (B) QTS–CUR, (C) QTS–F127–CUR, (D) QTS–P123–CUR. As imagens da direita mostram o zoom (1800–800 cm <sup>-1</sup> ) das imagens da esquerda. (E) Imagem fotográfica de uma membrana contendo CUR analisada no lado de baixo e cima. ....	87
Figura 35 - TGA e DTGA (A e C) dos componentes puros e (B e D) diferentes formulações a base de QTS. ....	90
Figura 36 - DSC (A) da QTS, (B) da CUR e dos PLUs e (C) das membranas a base de quitosana. ....	91
Figura 37 - Ensaio de tensão-deformação das membranas com diferentes composições contendo (A) F127 e (B) P123. ....	93
Figura 38 - Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em (A) pH 5,5 e (B) pH 9,0 a 25 °C. ....	95
Figura 39 - SEM das membranas contendo (A) QTS, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR secos (acima) e depois de intumescidos numa solução de pH 5,5, congelados e liofilizados (abaixo). A escala indica 200 µm. ....	97
Figura 40 - Formas e ângulo de contato de gotas de solvente em uma superfície sólida. ....	100
Figura 41 - Fotografias digitais das gotas adquiridas durante os ensaios de ângulo de contato das membranas de composição (A) QTS, (B) QTS–F127, (C) QTS–P123, (D) QTS–CUR, (E) QTS–F127–CUR, (F) QTS–P123–CUR utilizando água como solvente em pH ~7,0. ....	100
Figura 42 - Perfil de liberação da CUR a partir das diferentes formulações de membranas em tampão PBS (pH 5,5) contendo (A) Tween 80 (1,0% m/V) e (B) SDS (1,0% m/V). Imagens de uma das membranas após liberação em (C) Tween 80 e (D) SDS. ....	103
Figura 43 - Quantidade de CUR (A) em área e (B) em massa permeada através da pele humana a partir da solução controle em propileno glicol (PG) e das membranas a base de quitosana. ....	106
Figura 44 - Imagens de microscopia confocal para secções de 20 µm de (A) pele humana pura, e pele permeada pela CUR a partir de (B) solução de propileno glicol e das membranas formuladas contendo (C) QTS–CUR, (D) QTS–F127–CUR e (E) QTS–P123–CUR; Magnificação de 200x, as barras indicam 200 µm. ....	110
Figura 45 - Imagens de SEM das membranas contendo (A) QTS–CUR, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR após o experimento de permeação; à esquerda estão	

as imagens do lado de cima da membranas (que não ficaram em contato com a pele) e à direita as imagens do lado de baixo das membranas (que ficaram em contato com a pele).....	112
Figura 46 - Concentração inibitória mínima (MIC) dos géis a base de quitosana determinados <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição. ....	114
Figura 47 - Esquema da parede celular de bactérias (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas. ....	115
Figura 48 – (A) Esquema geral do aparato instrumental para a fabricação de fibras eletrofiadas a partir de uma solução polimérica e (B) fotografia do equipamento utilizado no presente trabalho.....	120
Figura 49 - Fotografia dos instrumentos de (A) aerografia e (B) <i>spin coating</i> . ....	126
Figura 50 - Fotografias das soluções de acetato de celulose em diferentes proporções de acetona/etanol/água utilizadas para a eletrofiação de acordo com a Tabela 12.....	127
Figura 51 - Variação do aspecto da solução e do cone em função do tempo de eletrofiação. ....	129
Figura 52 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A2. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	129
Figura 53 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A3. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	130
Figura 54 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A4. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	131
Figura 55 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A5. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	132
Figura 56 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir das melhores condições de processo das soluções entre X1 e X10. A legenda na parte inferior das imagens indicam a voltagem—distância—fluxo. A magnificação utilizada foi de 3000X. ....	133
Figura 57 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução X11. A magnificação utilizada foi de 3000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	134

Figura 58 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução X12. A magnificação utilizada foi de 3000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente. ....	135
Figura 59 - Gráficos de (A) TG e (B) DSC do acetato de celulose como recebido e após a eletrofiação. ....	136
Figura 60- Espectros de FTIR do acetato de celulose como recebido e na forma de fibra.....	137
Figura 61 - Fotografia das fibras eletrofiadas a partir da amostra X12 submetidas ao ensaio de tração (A) com suporte de papel e (B) após o rompimento do suporte. ....	138
Figura 62 - Ensaio mecânico das fibras de acetato de celulose (A) ainda no papel suporte e (B) após o rompimento do papel suporte. Cada curva, tanto em (A) quanto em (B) representa uma replicata do ensaio.....	139
Figura 63 - Morfologia das fibras de AC recobertas com QTS pela técnica de aspersão (A e B) por aerógrafo e por <i>spin coating</i> (C e D). As imagens superiores mostram as superfícies e as inferiores mostram as secções transversais. A magnificação usada foi de 500X.....	141
Figura 64 – (A) Fotografia e (B) espectro de FTIR da amostra de fibra de AC recoberta com solução filmogênica composta por QTS–CUR.....	143
Figura 65 – Microscopia confocal das fibras eletrofiadas de AC (A) não recobertas e recobertas com (B) QTS–CUR, (C) QTS–F127–CUR e (D) QTS–P123–CUR. A escala indica 100 µm. ....	144
Figura 66 – Fotografias digitais das gotas adquiridas durante os ensaios de ângulo de contato das fibras de AC (A) sem e com recobrimento pelas soluções de composição (B) QTS, (C) QTS–CUR, (D) QTS–F127–CUR, (E) QTS–P123–CUR utilizando água como solvente em pH ~7,0. ....	145

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros termodinâmicos teóricos calculados a 298,15 K e 1 atm. Todas as energias são relativas à forma enol em cada meio. As constantes de equilíbrio descrevem o observado na Figura 11.....	44
Tabela 2 - Valores das constantes cinéticas relacionadas ao equilíbrio de tautomerização da CUR em água em função da temperatura.....	48
Tabela 3 - Solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) da CUR em P123 e F127 em função da temperatura.....	53
Tabela 4 - Temperatura micelar crítica (TMC) dos copolímeros P123 e F127 em função da concentração de copolímero. ....	54
Tabela 5 - Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros P123 e F127 em função da temperatura da solução. ....	55
Tabela 6 - Coeficiente de partição molar micela-água ( $K_M$ ) e parâmetros termodinâmicos relacionados a interação da CUR com P123 e F127 em função da temperatura. ....	58
Tabela 7 - Proporção de cada constituinte utilizado no preparo das membranas.....	71
Tabela 8 - Propriedades mecânicas das membranas de quitosana com diferentes composições obtidas pela análise da Figura 37. ....	93
Tabela 9 - Permeabilidade ao vapor de água ( $K_w$ ) para as membranas com diferentes formulações utilizando atmosfera saturada com NaCl (UR ~70%). ....	99
Tabela 10 - Valores dos ângulos de contato das membranas a base de quitosana obtidas através da Figura 41.....	101
Tabela 11 - Ajuste dos pontos experimentais de liberação da CUR a diferentes modelos cinéticos.....	105
Tabela 12 - Composição das soluções de acetato de celulose para eletrofiliação, dados de condutividade e tensão superficial das soluções. Entre parênteses está a razão etanol/água do sistema. ....	125
Tabela 13 – Valores dos ângulos de contato das fibras de AC sem e com recobrimento obtidas através da Figura 66. ....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta G$ – Variação de energia livre	$E_a$ – Energia de ativação
$\Delta G^\ddagger$ – Variação de energia livre de ativação	EM – Elongação máxima
$\Delta H$ – Variação de entalpia	$e_{mi}$ – Emissão
$\Delta H^\ddagger$ – Variação de entalpia de ativação	EO – óxido de etileno
$\Delta S$ – Variação de entropia	$E_T(30)$ – Escala empírica de polaridade de solvente
$\Delta S^\ddagger$ – Variação de entropia de ativação	EtOH – Etanol
Å – Angström	$e_{exc}$ – Excitação
A – área	F – Fluxo de solução ( $\text{mL h}^{-1}$ )
AAB – Ácido abiético	F127 – Plurônico F127
Abs – Absorbância	FDA – <i>Food and Drug Administration</i>
$abs$ – Absorção	$F_m$ – Força máxima
AC – Acetato de celulose	FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier
ACN – Acetonitrila	$f_{fus}$ – Fusão
agregados H – Agregados empilhados em orientação paralela	$G(\tau)$ – Função de autocorrelação
agregados J – Agregados em linha	GD – Grau de desacetilação
ASTM – American Society for Testing and Materials	GI – Grau de intumescimento
ATCC – <i>American Type Culture Collection</i>	$h$ – Constante de Planck ( $6,62607 \times 10^{-34} \text{ J s}$ )
ATR – Refletância total atenuada	h – Horas
CMC – Concentração micelar crítica	HAc – Ácido acético
CUR – Curcumina	HLB – Balanço hidrofílico-lipofílico
$D$ – Coeficiente de difusão translacional	IL-1 – Interleucina-1
$D$ (Capítulo IV) – Distância agulha-coletor	IL-8 – Interleucina 8
$D/CE$ – Equilíbrio 1,3 diceto/ceto-enólico	IMA – Imatinibe
DDP – Diferença de potencial	IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
DLS – Espalhamento de luz dinâmico	J – Joule
DSC – Calorimetria diferencial de varredura	$k$ – Constante de velocidade
DTGA – Derivada da curva obtida da análise termogravimétrica	K – Kelvin
$E\%$ – Elongação em %	$K_a$ – Constante de acidez

$k_B$ – Constante de Boltzmann ( $1,380645 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )	$R_h$ – Raio hidrodinâmico aparente
$K_{eq}$ – Constante de equilíbrio	$R_H$ – Raio hidrodinâmico efetivo
$k_{obs}$ – Constante de velocidade observada	rpm – Rotação por minuto
$K_w$ – Permeabilidade ao vapor de água	s – Segundos
M – Monômero	<i>S. aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>
$M_2$ ou D – Dímero	SDS – Dodecilsulfato de sódio
$m_{max}$ – Máximo	SEM – Microscopia eletrônica de varredura
ME – Módulo de elasticidade	T – Temperatura absoluta
MH – Müller-Hinton	T – Tração
MIC – Concentração inibitória mínima	$T_m$ – Temperatura de fusão
min – Minutos	$T_g$ – Transição vítrea
$M_n$ – Massa molar numérica média	TGA – Análise termogravimétrica
$M_v$ – Massa molar viscosimétrica	TGF- $\beta$ – fator de crescimento transformador beta
N – Newton	TGF- $\beta 1$ – Fator de transformação do crescimento beta
NF-( $\kappa$ ) – Fator de transcrição nuclear kappa	TM – Tensão máxima
<i>P. aeruginosa</i> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TMC – Temperatura micelar crítica
P123 – Plurônico P123	TSA – Ágar triptona de soja
Pa – Pascal	UFC – Unidade formadora de colônia
PBS – Meio simulado tampão fosfato	UR – Umidade relativa
PEO – poli(óxido de etileno)	UV-Vis – Ultravioleta-visível
PG – Propileno glicol	V – Voltagem aplicada (kV)
pH – Potencial hidrogeniônico	<i>vs</i> – <i>Versus</i>
PLOM – Microscopia óptica de luz polarizada	W – Watts
PLU – Plurônico ou Poloxâmero	$\alpha_w$ – Umidade relativa
PO – óxido de propileno	$\Gamma$ – Coeficiente angular da taxa de relaxação
PPO – poli(óxido de propileno)	$\delta$ – Espessura média
$p_s$ – Pressão de saturação	$\eta$ – viscosidade do solvente
$q$ – Magnitude do vetor de espalhamento	$\theta$ – Ângulo de espalhamento
QTS – Quitosana	$\lambda$ – Comprimento de onda
R – Constante dos gases ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )	$\chi$ – Solubilidade intrínseca
$R^2$ – Coeficiente de determinação	

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>16</b>
<b>1 JUSTIFICATIVA E INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Considerações iniciais .....	17
1.2 Polímeros naturais .....	20
1.3 Quitina e quitosana .....	21
1.4 Celulose e acetato de celulose .....	23
1.5 Açafrão e curcumina.....	24
1.6 Copolímeros tribloco da classe dos Plurônicos® .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral .....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>30</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>31</b>
<b>2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
2.1 Materiais .....	35
2.2 Métodos .....	35
<b>2.2.1 Espectros de absorção e emissão da CUR em diferentes solventes</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.2 Influência da temperatura nos espectros de absorção da CUR em etanol e água.</b>	<b>35</b>
<b>2.2.3 Cálculos computacionais referentes ao equilíbrio diceto/ceto-enólico da CUR</b>	<b>35</b>
<b>2.2.4 Cinética de equilíbrio tautomérico (D/CE) e influência da temperatura no processo.</b>	<b>36</b>
<b>2.2.5 Interação da CUR com os copolímeros micelares P123 e F127</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos sistemas de PLU–CUR</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os sistemas PLU–CUR</b>	<b>39</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
3.1 Espectros de absorção e emissão da CUR em diferentes solventes.....	39

3.2	Influência da temperatura nos espectros de absorção da CUR em etanol e água..	41
3.3	Cálculos computacionais referentes ao equilíbrio diceto/ceto-enólico da CUR....	43
3.4	Cinética de equilíbrio tautomérico (D/CE) e influência da temperatura no processo.	45
3.5	Interação da CUR com os plurônicos P123 e F127 .....	50
3.6	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) do sistema PLU–CUR .....	59
3.7	Calorimetria diferencial de varredura do sistema PLU–CUR .....	62
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>66</b>
	<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>67</b>
<b>1</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>68</b>
<b>2</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>70</b>
2.1	Materiais .....	70
2.2	Métodos .....	70
2.2.1	Preparo das membranas a base de quitosana .....	70
2.2.2	Microscopia óptica de luz polarizada (PLOM).....	71
2.2.3	Espectrofotometria de ultravioleta-visível das membranas .....	72
2.2.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das membranas.....	72
2.2.5	Análise termogravimétrica (TGA) .....	72
2.2.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	72
2.2.7	Ensaio de tração <i>versus</i> deformação para as membranas a base de quitosana	73
2.2.8	Grau de intumescimento das membranas a base de quitosana (%GI).....	74
2.2.9	Microscopia eletrônica de varredura das membranas a base de quitosana...	74
2.2.10	Propriedade superficial por ângulo de contato das membranas a base de quitosana	74
2.2.11	Permeabilidade ao vapor de água das membranas a base de quitosana .....	75
2.2.12	Quantificação da CUR pela técnica de espectroscopia de fluorescência .....	75

2.2.13	Teste de uniformidade de conteúdo das membranas a base de QTS contendo CUR	76
2.2.14	Liberação <i>in vitro</i> da CUR a partir das membranas a base de quitosana.....	76
2.2.15	Permeação <i>ex vivo</i> da CUR a partir das diferentes membranas de quitosana	77
2.2.16	Microscopia confocal das membranas e da pele .....	78
2.2.17	Morfologia da superfície das membranas pós permeação.....	78
2.2.18	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) através do método de microdiluição.....	78
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
3.1	Considerações iniciais e análise visual das membranas .....	80
3.2	Microscopia óptica de luz polarizada e confocal.....	83
3.3	Espectroscopia UV-Vis das membranas.....	85
3.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier .....	86
3.5	Análise termogravimétrica.....	90
3.6	Calorimetria diferencial de varredura .....	91
3.7	Propriedades mecânicas das membranas .....	93
3.8	Determinação do grau de intumescimento das membranas.....	94
3.9	Análise morfológica das membranas após intumescimento .....	96
3.10	Permeabilidade ao vapor de água das membranas a base de QTS .....	98
3.11	Molhabilidade por ângulo de contato .....	100
3.12	Liberação <i>in vitro</i> da CUR a partir das membranas a base de QTS .....	102
3.13	Ensaio de permeação <i>ex vivo</i> da CUR em pele humana.....	106
3.14	Microscopia confocal das amostras de pele submetidas à permeação .....	109
3.15	Morfologia da superfície das membranas pós permeação .....	111
3.16	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) através do método de microdiluição .....	113
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>116</b>

<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>118</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>119</b>
1.1 Parâmetros da solução .....	120
1.2 Parâmetros do equipamento.....	121
1.3 Considerações sobre a eletrofição dos polímeros QTS e AC .....	122
<b>2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>124</b>
2.1 Materiais .....	124
2.2 Métodos .....	124
<b>2.2.1 Preparo das soluções de acetato de celulose para eletrofição</b> .....	<b>124</b>
<b>2.2.2 Parâmetros instrumentais de eletrofição das soluções poliméricas</b> .....	<b>125</b>
<b>2.2.3 Recobrimento das fibras eletrofiadas de acetato de celulose pelas soluções de QTS</b>	<b>126</b>
<b>2.2.4 Morfologia da superfície das fibras eletrofiadas</b> .....	<b>126</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>127</b>
3.1 Obtenção e análise das fibras de acetato de celulose.....	128
3.2 Caracterizações térmicas e espectroscópica do AC.....	136
3.3 Ensaio de tensão vs deformação das fibras de AC .....	138
3.4 Recobrimento das fibras de ac com soluções filmogênicas de QTS .....	140
<b>3.4.1 Análises das fibras de AC recobertas com solução filmogênicas de QTS contendo CUR</b> .....	<b>143</b>
<b>4 CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	<b>146</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>147</b>
<b>INDICADORES DE PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO</b> ....	<b>149</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>151</b>

# **CAPÍTULO I**

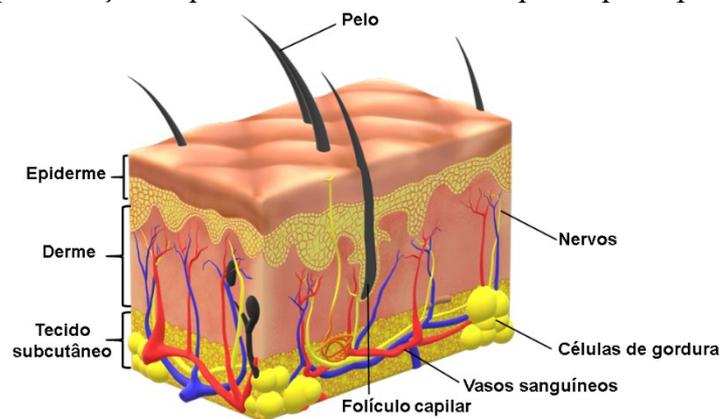
**Introdução geral e justificativa**

## 1 JUSTIFICATIVA E INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A pele (Figura 1) se destaca, entre os tecidos humanos, não só por suas importantes funções biológicas, mas também por sua extensão, sendo o órgão de maior extensão no corpo humano. A pele funciona como uma barreira para o ambiente externo, mantendo a homeostase e temperatura corpórea, dentre outras funções. Danos ocasionados a esta barreira após lesão ou queimadura aumentam a suscetibilidade de infecção por bactérias presentes na microbiota natural da pele, como as do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, por exemplo. O tecido necrótico do seio da ferida também pode atuar como um meio para o crescimento de patógenos.<sup>1,2</sup>

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele e principais constituintes.



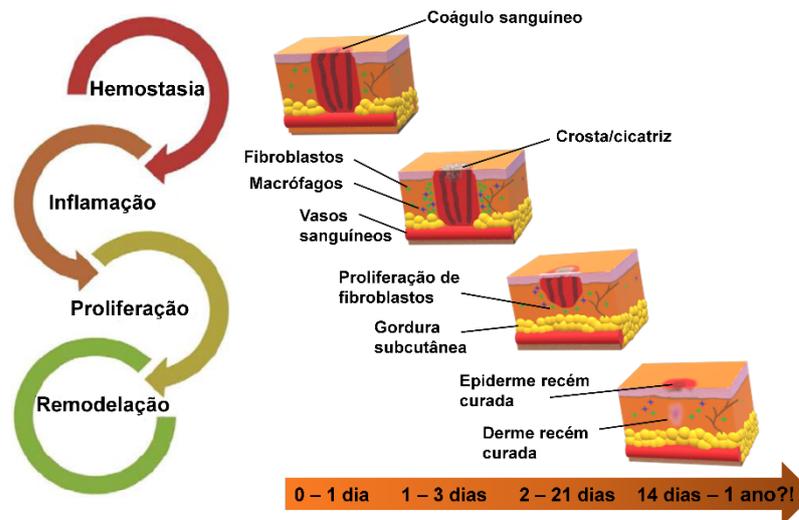
Fonte: figura adaptada de Kamoun *et al.* (2017).<sup>3</sup>

Lesões de pele causadas por feridas, queimaduras e diversas doenças atingem milhares de pessoas ao redor do mundo. A *Swift Medical Inc.* estima que, todos os anos, mais de 305 milhões de feridas agudas e queimaduras são registradas e tratadas globalmente. Esse é um número nove vezes maior do que a quantidade de pessoas que vivem com câncer no mundo.<sup>4</sup> A Organização Mundial da Saúde estima que aproximadamente 180 mil pessoas morrem devido a queimaduras anualmente, sendo que a maioria delas ocorrem em acidentes domésticos ou em locais de trabalho.<sup>5</sup>

A ferida de queimadura pode ser dividida em três zonas: a parte central da ferida (zona de coagulação) é exposta à maior quantidade de calor e sofre mais danos. Em torno da zona central está a zona de isquemia, caracterizada por diminuição da perfusão e o tecido pode ser potencialmente recuperável. Nas regiões periféricas da ferida encontra-se a zona de hiperemia que recebe o fluxo sanguíneo aumentado através de vasodilatação inflamatória e provavelmente irá se recuperar.<sup>1</sup>

O processo normal de cura e cicatrização de feridas e queimaduras é um processo dinâmico muito bem orquestrado e regulado, que consiste em uma série de fases sobrepostas (Figura 2). A sequência de cicatrização começa com a hemostasia e inflamação. Esse estágio inicial envolve o direcionamento de plaquetas e células imunológicas para controlar a perda de sangue e a eliminação de patógenos, prevenindo a infecção durante a cicatrização e degradando o tecido necrosado. Neutrófilos e monócitos são enviados para o local da lesão via vasodilatação localizada e extravasamento de fluido, iniciando uma resposta imune sustentada por macrófagos e quimiocinas. A fase inflamatória é seguida pela fase proliferativa, caracterizada por ativação de fatores de crescimento, queratinócitos e fibroblastos, ajudando no processo de fechamento e restauração de uma rede vascular (angiogênese), que é um passo vital no processo de cura. Sobreposto a essa fase, ocorre a fase final de cura que envolve o evento de remodelação da ferida, em que a matriz previamente formada é lentamente transformada em pele funcional ou tecido cicatricial semifuncional.<sup>1,6</sup>

Figura 2 - Representação esquemática do processo geral de cicatrização de tecidos.



Fonte: figura adaptada de Korrapati *et al.* (2016).<sup>2</sup>

O principal objetivo dos tratamentos de pele que sofreram feridas e queimaduras são o alívio rápido da dor, fechamento apropriado do tecido lesionado e obter uma cicatrização com os melhores resultados funcionais e estéticos possíveis. Isso é alcançado através da prevenção de infecções e traumas adicionais e proporcionando um ambiente que otimize o processo de cicatrização.<sup>1,7</sup>

De maneira geral, feridas e queimaduras necessitam de cuidados iniciais semelhantes, os quais podem ajudar a reduzir significativamente a probabilidade de infecção. Por exemplo,

é importante lavar bem o local com água morna corrente, dependendo do caso, aplicar alguma formulação farmacêutica contra infecções e micro-organismos em conjunto com bandagem ou curativo na ferida, para proteger o tecido lesionado de patógenos provenientes do ambiente externo e/ou favorecer a cicatrização. Dependendo do grau da lesão, é necessária intervenção cirúrgica para fechar rapidamente o tecido lesionado via enxerto.<sup>1,8</sup>

Certos fatores como presença de infecção, acúmulo de líquidos e detritos, limpeza e integridade estrutural do curativo influenciam a frequência de manutenção do mesmo. A substituição do curativo é o item que causa mais preocupação tanto aos profissionais da saúde quanto aos pacientes, pois sua manutenção periódica é um tanto quanto complicada e porque o curativo é o material que oferece a principal barreira contra patógenos e detritos do ambiente externo. Durante uma pesquisa de campo realizada com 121 especialistas da área de tratamento de pele de 39 países, foi constatado, por 55% dos especialistas entrevistados, que trauma mínimo durante a remoção/manutenção é um dos requisitos mais importantes para curativos emergentes. Propriedades essas que não são demonstradas pelos curativos comercialmente disponíveis.<sup>8,9</sup>

Os curativos tradicionais comercialmente disponíveis, incluindo gaze, algodão e lã causam um segundo trauma e dores significativas durante a sua manutenção devido a adesão excessiva ao seio da ferida e desprendimento de fiapos. Esses curativos podem provocar reações alérgicas, contaminação por fiapos, além de aderir às feridas à medida que o exsudato\* seca,<sup>10</sup> ademais, os tecidos regenerados na fase proliferativa podem vir a crescer através do curativo, provocando inflamação e atrasando o processo de cicatrização do tecido.<sup>8,11,12</sup>

Um curativo ideal para o tratamento de lesões e queimaduras deve proteger o leito da ferida contra a penetração de micro-organismos e ameaças externas, proporcionar um ambiente condutor dos mecanismos defensivos naturais do corpo, manter um ambiente de cura úmido (removendo o exsudato em excesso), permitir a troca de oxigênio, promover a cicatrização com mínima formação de cicatriz e ser de fácil aplicação e remoção. No caso de um biocurativo também é importante que esse se degrade em componentes não tóxicos quando em contato com a pele, sendo eliminados ou reabsorvidos pelo organismo.<sup>13,14</sup>

Neste contexto, permanece a preocupação em ser desenvolvido novas tecnologias para a fabricação de curativos com características biocompatíveis que apresentem biodegradabilidade, propriedades hemostática, anti-inflamatória, antimicrobiana e que não

---

\* Exsudato é um fluido inflamatório rico em proteínas e fragmentos celulares que são provenientes de feridas e se depositam nos tecidos superficiais.

gerem trauma ao paciente durante a remoção/manutenção do curativo. Uma alternativa para tal é o uso de materiais na forma de membranas e fibras baseados em biopolímeros. Estes chamam atenção da comunidade científica como uma abordagem alternativa para lidar com os problemas apresentados pelos curativos tradicionais, promovendo mudanças no ambiente do tecido danificado e proporcionando uma cura mais satisfatória.<sup>15</sup> Assim, o presente trabalho apresenta o esforço de produzir um material com essas características, partindo-se de matrizes poliméricas de quitosana e acetato de celulose. Como essas matrizes não exibem propriedades cicatrizantes e bactericidas tão significativas, optou-se por enriquecê-las com curcumina, um composto que apresenta propriedades antioxidante, anticâncer, antimicrobiana e anti-inflamatória, oferecendo sinergismo ao sistema curativo.

## 1.2 POLÍMEROS NATURAIS

Nessa perspectiva, polímeros naturais, em especial os polissacarídeos e seus derivados vêm atraindo um grande interesse pelas comunidades temáticas e científicas em virtude de suas propriedades interessantes no campo da medicina regenerativa para feridas e queimaduras. Essa classe de materiais é muito versátil por desempenhar diferentes funções fisiológicas (hemostasia, interação com fator de crescimento, etc.), possuem uma ampla variedade de potenciais aplicações, como, carreador de ativos, *scaffold*, curativos, entre outros e apresentam similaridade com o meio celular.<sup>16</sup>

Além dessas propriedades, existe a preocupação em se diminuir o uso de reagentes perigosos e danosos à saúde humana e da biota utilizados na produção de polímeros sintéticos, como derivados de petróleo e hidrogeno cianeto, por exemplo.<sup>15,17,18</sup> Graças a semelhança dos polímeros naturais com os componentes da matriz extracelular, esses materiais apresentam baixa estimulação de reações imunológicas crônicas e toxicidade, muitas vezes ocasionadas por polímeros sintéticos.<sup>18</sup> Dentre a família dos biopolímeros, os polissacarídeos possuem a vantagem de serem abundantes, renováveis e de baixo custo. Vários desses polímeros fazem parte da nossa dieta e podem ser utilizados como excipientes farmacêuticos, membranas ou como fonte nutritiva.<sup>15,18</sup>

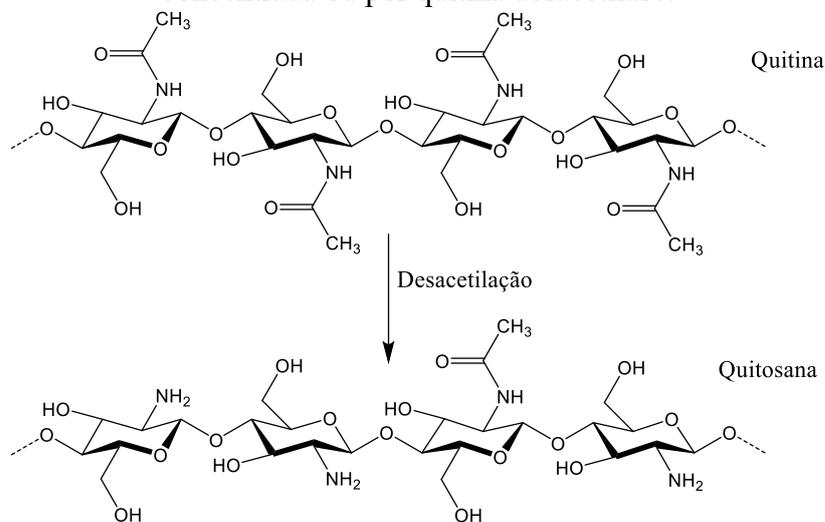
Polissacarídeos consistem em monossacarídeos (açúcares) ligados entre si por ligações glicosídicas. As diferenças na composição dos monossacarídeos, em decorrência da fonte biológica, padrões de ligação, estrutura da cadeia e massa molar fornecem diferentes conjuntos de características físico-químicas que influenciam a solubilidade, viscosidade, propriedades superficiais dentre outras características desses biopolímeros.<sup>18,19</sup> Incluso nessa classe de polímeros se encontram diversos compostos, dentre eles podemos citar o amido, a celulose e

seus derivados, a goma guar, a goma arábica, os alginatos, as galactanas, as carragenanas, a quitina e seus derivados, dextrina, dentre outros.<sup>15,18</sup> Dentre os citados, os derivados de quitina e o acetato de celulose têm sido muito pesquisados para aplicações farmacêuticas, biomédicas e em engenharia de tecidos, por serem substratos semelhantes às macromoléculas reconhecidas pelo corpo humano, apresentando propriedades hemostáticas, mucoadesivas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, serem biodegradáveis e abundantes.<sup>15,18</sup>

### 1.3 QUITINA E QUITOSANA

A quitina [poli( $\beta(1\rightarrow4)$ -*N*-acetil-*D*-glicosamina)] é um polissacarídeo de ocorrência natural e abundantemente disponível, sintetizado por uma variedade de micro-organismos vivos, sendo extraída principalmente do exoesqueleto de crustáceos (caranguejo e camarão) por tratamento ácido, para dissolver carbonato de cálcio, seguido de extração alcalina para solubilizar proteínas. É o segundo biopolímero mais abundante, após a celulose.<sup>18,20,21</sup> No entanto, as aplicações da quitina são limitadas, por ser estruturalmente semelhante a celulose, mas quimicamente inerte. O derivado mais importante da quitina em termos de aplicação é a quitosana (QTS), obtida por desacetilação parcial (>50%) da quitina em condições alcalinas (NaOH concentrado) ou por hidrólise enzimática via quitina desacetilase. Como resultado, a QTS possui em sua estrutura grupos hidroxila, acetilamida e grupos amina livres, como demonstrado na Figura 3, e dessa forma fornece propriedades muito diferentes das da celulose.<sup>18,20,21</sup>

Figura 3 - Esquema da obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina por base concentrada ou por quitina desacetilase.



Fonte: figura adaptada de Aravamudhan *et al.* (2014).<sup>18</sup>

Ambos os polissacarídeos são insolúveis em água a pH neutro, no entanto a quitosana possui um pKa de aproximadamente 6,5 tornando-a solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, incluindo ácido acético, fórmico, tartárico e cítrico diluídos (1–3%) com pH entre 4,5 e 6,5. A maior solubilidade ocorre devido a protonação dos grupos NH<sub>2</sub> em pH baixo, tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Porém a quantidade de ácido necessária para solubilizá-la depende do grau de desacetilação (GD) deste polissacarídeo. Poucos biopolímeros possuem alto teor de aminas primárias, conferindo importantes propriedades funcionais à quitosana. O caráter catiônico da quitosana leva à interação deste polímero com moléculas pequenas e proteínas negativamente carregadas em sistemas biológicos.<sup>22,23</sup> A QTS é comercialmente disponível com massa molar média variando entre 50 e 375 kg mol<sup>-1</sup> e grau de desacetilação (GD) entre 66 e 95%.<sup>14,21,24</sup> As propriedades gerais da quitosana dependem principalmente da massa molar e da distribuição dos grupos acetilênicos ao longo da cadeia principal. Geralmente, quitosanas com massas molares mais baixas e GD maiores apresentam maior solubilidade que aquelas com massas molares elevadas. Desta forma, QTS com maior massa molar pode proporcionar maior controle de liberação de ativos.<sup>21,24</sup>

Ao longo da última década, a quitosana tem atraído cada vez mais atenção como biomaterial por ser obtida de fontes renováveis, ao seu baixo custo de produção e às suas propriedades vantajosas, incluindo biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesão, rápido intumescimento, não toxicidade e alta estabilidade, além de ser levemente bactericida e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Trabalhos relatam que a quitosana é muito adequada para a preparação de partículas para a liberação controlada de agentes ativos, especialmente como transportador de compostos sensíveis ao pH devido sua propriedade ionizante. Métodos de preparação simples e fáceis sem a utilização de solventes orgânicos perigosos são outros atributos da quitosana.<sup>25,26</sup>

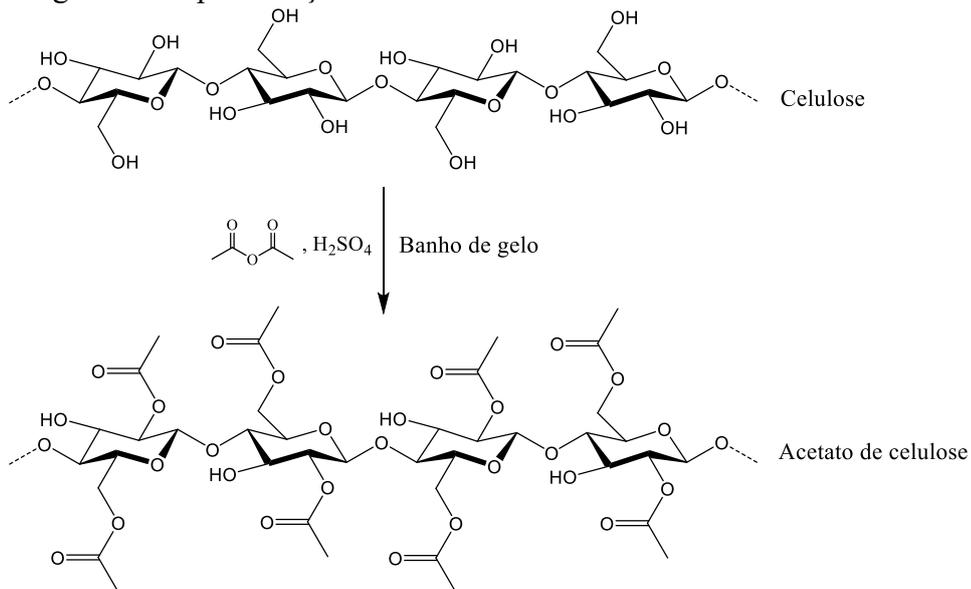
Hidrogéis, membranas e fibras a base de quitosana oferecem várias vantagens sobre materiais utilizados no processo de cicatrização de feridas e queimaduras, além da utilização como *scaffold* em enxertos e transplantes. Esses materiais mostram aumento na adesão, proliferação e diferenciação celular, levando à regeneração de um novo tecido, ou seja, acelerando o processo de cicatrização de tecidos lesionados. A QTS também possui boa aderência em pele e mucosas em geral e sua porosidade auxilia no processo de troca de gases e material líquido como, por exemplo, os exsudatos.<sup>27,28</sup>

#### 1.4 CELULOSE E ACETATO DE CELULOSE

A celulose (Figura 4), outro polissacarídeo, é também um polímero natural de alta massa molar e cadeia linear composto de unidades  $\beta$ -D-glicopiranosose que são ligadas covalentemente através de funções acetais entre o átomo de carbono C1 e o grupo  $-OH$  equatorial do C4 (ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas), conferindo à celulose resistência ao ataque químico/enzimático. É constituída por três grupos hidroxila e um acetila. Considerada como o polímero orgânico mais abundante na natureza, é sintetizada por uma variedade de organismos vivos, incluindo plantas, algas e bactérias, sendo o principal componente das paredes celulares das plantas. A madeira, por exemplo, possui um teor de 40 a 50% de celulose e vários milhões de toneladas são produzidas a cada ano. Já a fibra de algodão possui um teor de aproximadamente 90% de celulose.<sup>18,29</sup>

É um polímero altamente cristalino e insolúvel em muitos solventes, exceto em alguns ácidos minerais. Para tornar a celulose mais solúvel e, conseqüentemente, mais aplicável e processável, são realizadas modificações estruturais no polímero. Os derivados mais importantes da celulose são ésteres e éteres produzidos a partir da reação dos grupos hidroxilas da celulose com diferentes ácidos. A esterificação diminui o número de ligação de hidrogênio, interferindo na natureza cristalina do polímero. Desta forma, os derivados de celulose possuem aplicações amplas e importantes na preparação de membranas semipermeáveis para processos de separação, materiais de embalagem alimentícias e para aplicações biomédicas.<sup>18,30</sup>

Figura 4 - Representação estrutural da celulose e do acetato de celulose.



Fonte: figura adaptada de Konwar *et al.* (2016).<sup>31</sup>

O acetato de celulose (AC; Figura 4), preparado pela primeira vez em 1865, é um derivado éster da celulose muito importante e amplamente utilizado em muitas aplicações em decorrência da sua biodegradabilidade, estabilidade térmica, resistência química e relativa transparência. Além de ser abundante é também amplamente utilizado na tecnologia de alimentos, aplicações biomédicas e na fabricação de membranas de separação devido seu baixo custo. Possui estabilidade hidrolítica, compatibilidade com material biológico e baixa toxicidade.<sup>32,33</sup>

Ainda que os polissacarídeos descritos acima possuam atividade bactericida e antifúngica, a capacidade de ação não é suficientemente ampla e dependem de vários fatores intrínsecos à natureza do polímero como, por exemplo, fonte de obtenção, massa molar, grau de acetilação, dentre outros.<sup>21</sup> Observa-se que o enriquecimento de formulações poliméricas com compostos naturais que possuam múltiplas ações terapêuticas podem ser um interessante artifício para aumentar o potencial de tratamento. Nessa perspectiva, o composto natural curcumina apresenta diversas propriedades farmacológicas interessantes, as quais serão apresentadas a seguir.

## 1.5 AÇAFRÃO E CURCUMINA

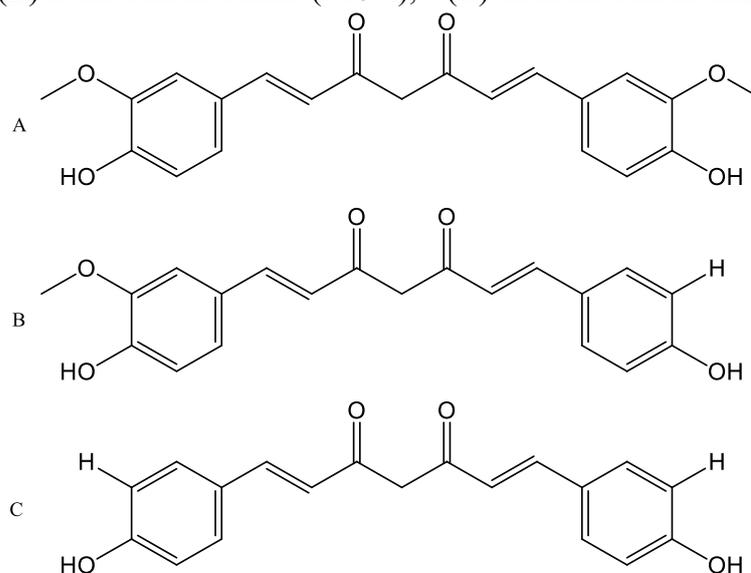
Após o advento de várias drogas sintéticas pelos esforços contínuos dos químicos sintéticos com o objetivo de melhorar os padrões gerais de saúde a um custo mais acessível, há uma crescente preocupação com o aumento do custo para projetar novas moléculas e seus ensaios clínicos, assim como os riscos ambientais inerentes às suas produções em larga escala e os efeitos adversos a longo prazo.<sup>34</sup> Devido a estas razões, os pesquisadores voltaram suas atenções novamente para os produtos naturais, medicamentos tradicionais de povos antigos, que apresentam baixo custo de obtenção e ação terapêutica significativa.

Em face do exposto anteriormente, um agente ideal a ser adicionado a um curativo para cicatrização de feridas protege o tecido da ferida contra infecções bacterianas, reduz a inflamação e induz a proliferação celular para ajudar na reconstrução do tecido danificado. Adicionalmente, deve atuar como um antioxidante, uma vez que os radicais livres são considerados a principal causa de inflamação durante o processo de cicatrização de feridas.<sup>35</sup> Um dos produtos naturais que possui esses requisitos é o açafrão e seus constituintes.

O açafrão (*Curcuma Longa L.*) é uma planta tropical da família do gengibre, nativa do sul da Ásia. É comumente usada como corante alimentício, especiaria na culinária e cosméticos, bem como na medicina tradicional de países asiáticos. A Índia é o maior produtor de açafrão, com produção anual de cerca de 25 milhões de toneladas. Entre a família do gengibre, apenas

membros do gênero *Curcuma* contém os compostos amarelos curcuminóides.<sup>36,37</sup> A curcumina (Figura 5; diferuloilmetano) é um pigmento amarelo natural e um dos principais componentes polifenólicos presentes nos rizomas do açafrão. O nome IUPAC da curcumina (CUR) é 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, portanto a molécula possui dois grupos orto metoxifenol ligados por uma  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$  insaturada. A curcumina comercialmente disponível é uma mistura de três curcuminóides: curcumina, demetóxi e bisdemetóxicurcumina, sendo que as duas últimas estão presentes em até 30% nas amostras rotuladas como “pura”. Embora seja produzida uma quantidade considerável de açafrão, o rendimento da curcumina, que é o componente mais valioso, é de cerca de 2 a 7%, dependendo da variedade e das condições durante o crescimento.<sup>34,37,38</sup> A CUR possui valores de pKa entre 7,8 e 11,12 e coeficiente de partição (LogP) próximo a 3,2.<sup>39-42</sup>

Figura 5 - Estrutura dos principais curcuminóides presentes no açafrão: (A) curcumina (~77%), (B) demetóxicurcumina (~18%), e (C) bisdemetóxicurcumina (~5%).



Fonte: figura adaptada de Chen *et al.* (2016).<sup>43</sup>

Nas últimas décadas, este composto se tornou foco de pesquisa em diferentes áreas por suas múltiplas propriedades. No campo da biologia e farmacologia tem sido estudado como agente terapêutico contra diversas doenças crônicas, como por exemplo, na cicatrização de doenças cutâneas, cardiovasculares e oculares devido suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, etc.<sup>37,43-46</sup> Recentemente também surgiu como potencial agente antitumoral e inibidor de agregação  $\beta$ -amilóide relacionado com a doença de Alzheimer (o qual depende do tautomerismo da CUR), atraindo atenção dos pesquisadores de diferentes áreas como química, biologia e medicina.<sup>47</sup> Toxicologicamente, a

curcumina é relativamente inerte, e não apresenta toxicidade tanto para animais quanto para humanos, mesmo em alta concentração (~ 10 g ao dia).<sup>44</sup>

Além das propriedades descritas acima, existem estudos indicando que a CUR exerce influência em algumas etapas do processo de cicatrização de pele. O potencial de cura da curcumina é atribuído principalmente a seus efeitos anti-inflamatórios, bactericidas e atividade antioxidante.<sup>35</sup> Tem-se verificado também que a CUR melhora a cicatrização de feridas cutâneas através do seu envolvimento na remodelação dos tecidos, formação de granulação e deposição de colágeno. Aparentemente a aplicação de CUR em feridas também melhora a regeneração epitelial, aumenta a proliferação de fibroblastos e a densidade vascular.<sup>35,48</sup>

Notavelmente, demonstrou-se que a curcumina inibe a produção de interleucina-1 (IL-1), uma das principais citocinas liberadas por monócitos e macrófagos que desempenham papéis importantes na regulação das respostas inflamatórias. Assim como inibe a atividade do NF-( $\kappa$ ), um fator de transcrição que regula muitos genes implicados no início de respostas inflamatórias.<sup>35,48</sup>

A fase proliferativa na cicatrização envolve a formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (a formação da matriz proteica extracelular), proliferação de fibroblastos, epitelização e apoptose de células indesejadas. Pesquisas indicam que na fase de proliferação a CUR melhora a migração de fibroblastos, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e, em geral, reepitelização.<sup>46</sup> É apoptótica na fase inicial da cicatrização, eliminando assim células inflamatórias indesejadas do local da ferida.<sup>35,48,49</sup> Na fase de remodelação a curcumina melhora a contração da ferida, aumentando a produção de fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e, portanto, aumentando a proliferação de fibroblastos.<sup>35,50</sup> Em estudos com animais, foi demonstrado que a CUR aplicada topicamente reduziu pela metade o período de epitelização das feridas tratadas em ratos, quando comparadas ao grupo controle não tratado.<sup>35,51</sup>

Apesar disso, o uso da curcumina é limitado devido sua baixa solubilidade aquosa ( $1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ , equivalente a  $3,64 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),<sup>52</sup> e conseqüentemente, fraca absorção e baixa biodisponibilidade, seguindo de rápida eliminação sistêmica pelo metabolismo. Essas são as principais dificuldades que precisam ser superadas para aumentar sua eficácia terapêutica.<sup>34,53</sup> Ao longo dos últimos anos foram realizados muitos esforços para contornar os problemas descritos acima relacionados à curcumina, através do seu encapsulamento em várias “montagens” biológicas, como micelas, vesículas, membranas, fibras de polímeros naturais ou sintéticos e macromoléculas presentes no organismo humano, como proteínas e ciclodextrinas.<sup>54,55</sup> Dentre as estratégias descritas acima, destaca-se a utilização de micelas

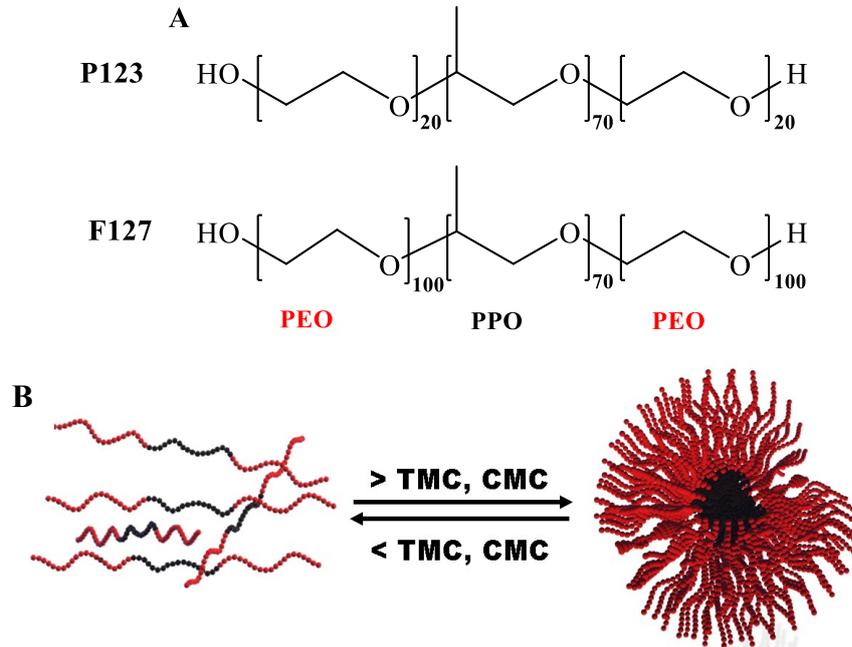
copoliméricas em razão do seu fácil preparo, biocompatibilidade e eficiência de encapsulação de compostos pouco solúveis.

### 1.6 COPOLÍMEROS TRIBLOCO DA CLASSE DOS PLURÔNICOS®

Diferentes estratégias têm sido adotadas e citadas na literatura visando melhorar a solubilidade, absorção e aumentar a eficácia terapêutica de compostos ativos. Dentre as diferentes estratégias, os copolímeros em bloco com comportamento anfifílico que formam estrutura micelar autoassociada espontaneamente ganharam muita atenção nos últimos anos objetivando a aplicação de entrega de princípios ativos. Plurônicos (*Pluronic*) ou poloxâmeros (*Poloxamer*) (Figura 6), como são conhecidos, são compostos de um bloco central de poli(óxido de propileno) PPO flanqueado em ambos os lados por cadeias de poli(óxido de etileno) PEO, arrançados numa estrutura de  $PEO_x-PPO_y-PEO_x$ .<sup>56-58</sup> Esses copolímeros apresentam diferentes unidades de repetição de ambos os grupos e massa molar que varia de 1.800–15.000  $g\ mol^{-1}$ . São sintetizados por polimerização aniônica adicionando sequencialmente monômeros de PO (óxido de propileno) e EO (óxido de etileno) na presença de um catalisador alcalino, são copolímeros aprovados pela FDA como excipientes inativos.<sup>56,58,59</sup>

Dois copolímeros da classe dos plurônicos bastante estudados são o F127 e o P123 (Figura 6). O primeiro possui massa molar de 12.600  $g\ mol^{-1}$ , contém, em média, unidades EO  $\cong 100$  e PO  $\cong 70$ . O P123 apresenta massa molar de 5.750  $g\ mol^{-1}$  e unidades EO  $\cong 20$  e PO  $\cong 70$ , esses números podem apresentar pequena variação dependendo do fabricante e lote. Ambos possuem unidades de repetição dos grupos PO hidrofóbicos iguais, diferenciando apenas no número de repetição dos grupos EO hidrofílicos. Onde o P123, por ter um balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) menor (8) em consequência do menor número de repetição EO tende a se autoassociar com maior facilidade que o F127, que possui um valor de HLB igual a 22.<sup>60</sup> Isso pode acarretar comportamento diferente no tocante a capacidade de encapsulamento e liberação controlada de ativos.<sup>58,61,62</sup>

Figura 6 – (A) Representação estrutural dos copolímeros P123 e F127 e (B) ilustração da formação de micelas em solução, abaixo e acima da concentração e temperatura micelar crítica (CMC e TMC, respectivamente).



Fonte: figura adaptada de Basak e Bandyopadhyay (2013).<sup>63</sup>

O núcleo hidrofóbico formado pelas unidades PPO é um segmento incompatível com o meio aquoso, e forma o núcleo da micela, porém interage bem com compostos hidrofóbicos. Esse compartimento insolúvel pode ser transportado pelo sistema sanguíneo pelas cadeias hidrofílicas da corona, formada pelas unidades PEO, pois fornece compatibilidade às micelas em meio aquoso. Assim, essa estrutura micelar do tipo *core-shell* organizada é essencial para suas aplicações como encapsulador de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, os quais sozinhos exibem farmacocinética indesejável e baixa estabilidade no ambiente fisiológico. A corona hidrofílica é biocompatível e causa um reconhecimento reduzido das micelas por sistemas retículoendoteliais, contribuindo grandemente para o comportamento farmacêutico das formulações dos copolímeros, mantendo as micelas no estado disperso. Isso faz com que diminua a ocorrência de interações indesejáveis dos ativos com células, proteínas e componentes do sangue através de efeitos de estabilização estérica.<sup>56,61,62</sup>

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com filme fino de quitosana/plurônico contendo curcumina aplicados à liberação controlada e sustentada para possível aplicação em feridas cutâneas e queimaduras.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o comportamento tautomérico da curcumina em meio aquoso e como melhorar sua solubilidade pela utilização dos copolímeros micelares anfífilicos P123 e F127 principalmente por técnicas espectrofotométricas e calorimétricas.

Investigar a melhor condição de produção de membranas de quitosana/plurônico contendo curcumina pelo método da evaporação de solvente, variando-se o tempo de agitação, utilização de temperatura, método de adição dos constituintes e secagem de solução.

Caracterizar as membranas produzidas quanto as propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas, através das técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA); analisador mecânico universal; microscopia óptica com luz polarizada (PLOM), confocal e eletrônica de varredura (SEM); assim como determinar o grau de intumescimento, permeação ao vapor de água e ângulo de contato das amostras.

Avaliar a cinética de liberação *in vitro* das formulações contendo curcumina em meio de pH simulado de pele e a permeação *ex vivo* em pele humana empregando a célula de Franz, sendo quantificada por fluorescência utilizando curva analítica validada.

Realizar testes microbiológicos *in vitro* das formulações obtidas contra cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), respectivamente, no intuito de determinar a concentração inibitória mínima através do método de microdiluição.

Desenvolver sistemas eletrofiados a base de acetato de celulose variando-se a concentração do polímero e a razão da mistura acetona/etanol/água utilizada como solvente; assim como a distância entre coletor e agulha, fluxo de solução, voltagem aplicada.

Avaliar a influência dos parâmetros de eletrofiação no tempo de eletrofiação e recobrir a fibra obtida com maior tempo de eletrofiação com uma fina camada das formulações a base de QTS/PLU contendo curcumina.

# **CAPÍTULO II**

**Estudos da curcumina em solução e estado sólido**

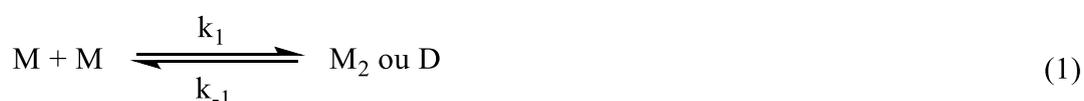
## 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Apesar de o foco do estudo ser uma formulação na forma de matriz sólida, também é de extrema importância o estudo da curcumina e dos copolímeros em solução. Uma vez que tanto a corrente sanguínea quanto o exsudato possuem grande quantidade de líquidos. O exsudato é um fluido inflamatório extra vascular rico em proteínas e fragmentos celulares, que sai dos vasos e deposita-se nos tecidos superficiais.

As características físico-químicas do solvente como: polaridade, o tipo de interação intermolecular (forças de Van der Waals), constante dielétrica e a capacidade de formação de ligação de hidrogênio afetam fortemente o perfil espectral, a absorvidade molar, assim como o comprimento de onda de máxima absorção e emissão da curcumina (CUR) ou outro soluto qualquer. Isso ocorre devido a diferente estabilização dos estados fundamental e excitado do soluto pelo solvente, como explica o princípio de Franck-Condon.<sup>64</sup>

Além das características do solvente, equilíbrios envolvendo o próprio soluto também influenciam consideravelmente o perfil espectral deste. A avaliação da solubilidade, quantificação e o equilíbrio iônico ( $K_a$ ) da CUR, como de outros compostos, são geralmente realizados através de técnicas espectrofotométricas, como UV-Vis e fluorescência. Sendo o UV-Vis muito utilizado para determinar os valores de  $K_a$  de compostos cromóforos.<sup>40</sup> Para a curcumina, outros dois equilíbrios são muito importantes quando em meio aquoso e merecem destaque: o equilíbrio 1,3 diceto/ceto-enólico (ceto-enol; D/CE) e o processo de autoagregação em dímeros, quando duas moléculas de curcumina se associam formando o autoagregado. Ambos os equilíbrios dependem das características do solvente e do pH, quando em meio aquoso.<sup>65,66</sup>

O processo de autoagregação de compostos hidrofóbicos a partir de moléculas individuais livres (monomérica) formando agregados diméricos, é descrito como um fenômeno que se origina de um equilíbrio complexo, dinâmico e reversível entre forças intermoleculares dos monômeros e agregados, como descrito no equilíbrio da Equação 1. Onde as interações de Van der Waals entre as moléculas do próprio soluto (principalmente as hidrofóbicas) são mais favorecidas em comparação as interações soluto-solvente, neste caso, água.<sup>64,65</sup> Neste modelo, duas moléculas de monômero (M) de curcumina, ou outro cromóforo hidrofóbico qualquer, se associam para formar um único dímero ( $M_2$  ou D), que estão em equilíbrio dinâmico.

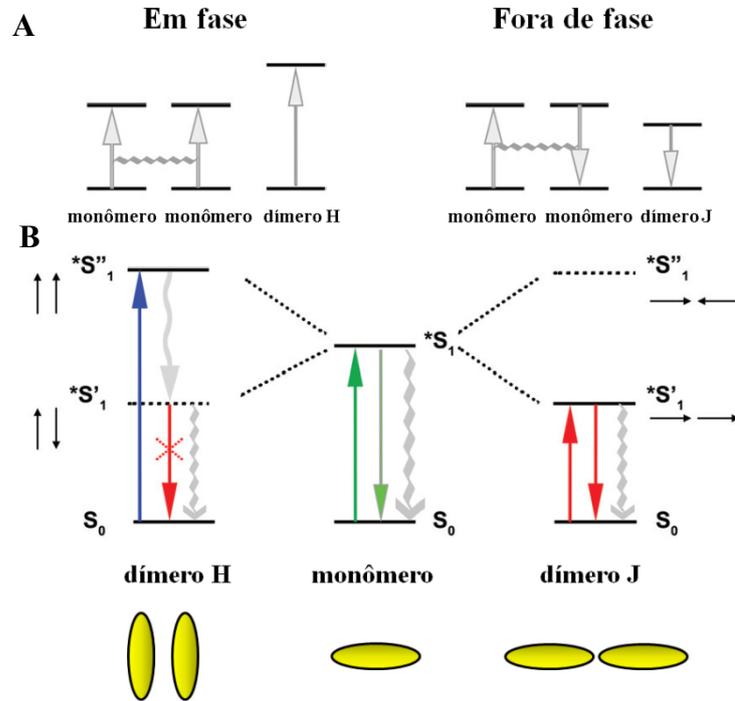


onde M é a espécie na forma monomérica e M<sub>2</sub> ou D representa o composto associado em dímeros.

Desta forma, o microambiente, pH e a temperatura são fatores que podem afetar o equilíbrio envolvido na agregação de compostos como a curcumina.<sup>64,65</sup> Comumente as espécies de monômeros e dímeros são caracterizadas por diferenças nas propriedades ópticas apresentadas por essas espécies.<sup>34,64,67</sup> Os agregados em solução aquosa exibem características distintas nas bandas de absorção em comparação com as espécies monoméricas. Deslocamento espectral, divisão da banda de absorção, ou diminuição da absorção de máximo comprimento de onda do monômero e formação de banda adicional em outros comprimentos de onda são características típicas de agregação.<sup>64,67,68</sup> Assim, conhecendo os padrões das mudanças espectrais é possível propor o tipo de agregado que o composto apresenta.<sup>64</sup>

Os dímeros são formados por duas moléculas associadas e, portanto, possuem dois momentos de dipolos de transição interativos. Desta forma, os momentos de dipolo de transição podem estar em fase ou fora de fase. Quando estão em fase, a interação é repulsiva, resultando num aumento de energia. Se os momentos de dipolo de transição estão fora de fase a interação é atrativa, diminuindo a energia total do sistema, como demonstrado na Figura 7A.<sup>64</sup> Normalmente existem duas possibilidades de autoagregação das moléculas de CUR, os agregados J e os agregados H. Quando as moléculas estão empilhadas em orientação paralela o agregado é chamado H, e ocorre mudança do comprimento de onda de absorção para valores menores ou ocorre desaparecimento da banda de absorção do monômero e aparecimento de banda de absorção do agregado em comprimento de onda menor. Por outro lado, moléculas agregadas em linha são caracterizadas como agregado J, ocorrendo mudança do comprimento de onda de absorção principal para valores maiores, ou deslocamento para o vermelho (Figura 7B).<sup>64,68,69</sup> Em geral, o agregado H é o tipo mais recorrente entre os compostos orgânicos, uma característica importante desse tipo de agregado é que a fluorescência do cromóforo é extinta, pois seu nível de energia excitado mais baixo se torna proibido.

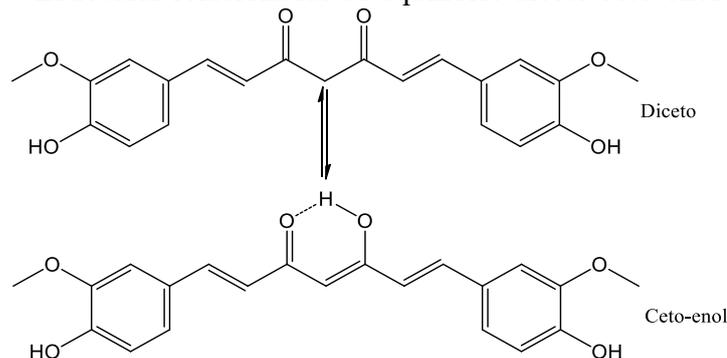
Figura 7 - (A) Representação esquemática da interação em fase e fora de fase do momento de dipolo de transição, dando origem à divisão do estado excitado do dímero. (B) Processo de excitação/desexcitação das espécies monoméricas e diméricas, juntamente com o arranjo espacial dos dois tipos de dímeros.



Fonte: figura adaptada de Heyne (2016).<sup>64</sup>

Como dito anteriormente, além do processo de agregação, a CUR apresenta outro equilíbrio muito importante quando em meio aquoso. A curcumina pertence ao grupo das  $\beta$ -dicetonas fenólicas, possuindo equilíbrio tautomérico diceto/ceto-enol (D/CE) que é caracterizado por uma forte ligação hidrogênio intramolecular, como mostrado na Figura 8, além de poder formar ligações de hidrogênio intermoleculares com moléculas de solventes. A solubilidade da CUR também é afetada pelo pH do meio, onde menores pHs tendem a aumentar a solubilidade do composto.<sup>38,70</sup>

Figura 8 - Estruturas relacionadas ao equilíbrio diceto/ceto-enol da CUR.



Fonte: figura elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Existem diferentes estudos envolvendo a termodinâmica do equilíbrio ceto-enólico da CUR, no entanto a cinética deste processo é relativamente pouco estudada. Além disso, a curcumina possui três prótons ionizáveis, correspondendo aos grupos fenólicos e ao hidrogênio metileno ativo da  $\beta$ -dicetona (alguns autores atribuem ao hidrogênio enólico), respectivamente.<sup>39</sup> No entanto, diferentes valores de pKa para a dissociação desses hidrogênios ácidos foram determinados por técnicas espectroscópicas. Tønnesen *et al.* (1985) encontraram valores de pKa de 7,80, 8,50 e 9,00. Bernabé-Pineda *et al.* (2004) indicam que os valores de pKa são na realidade 8,38, 9,88 e 10,51, enquanto os valores relatados por Zhang *et al.* (2012) foram 8,41, 9,94 e 11,12.<sup>39-41</sup> Desta maneira, a diferença nos valores de pKas obtidos pelos pesquisadores podem estar associados ao tempo necessário para o equilíbrio ceto-enólico ser estabelecido.<sup>40,70</sup> Portanto, o estudo do comportamento cinético do equilíbrio D/CE da CUR em água ainda pode ser muito investigado.

A fim de evitar o processo de dimerização e induzir a presença de um único tautômero no meio fisiológico, diferentes estratégias têm sido empregadas por pesquisadores, aumentando a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade da CUR. Os copolímeros triblocos do tipo plurônicos ( $\text{PEO}_x\text{-PPO}_y\text{-PEO}_x$ ) possuem a capacidade de incorporar ativos pouco solúveis. A natureza hidrofóbica do núcleo das micelas formadas por esses copolímeros fornece um ambiente favorável a proteção de moléculas insolúveis em água do processo de agregação, enquanto a corona protege o sistema estericamente contra o metabolismo e agentes biológicos.<sup>62,71</sup> Sendo ótimos candidatos a eficiente encapsulação de curcumina.

Este capítulo tem como objetivo estudar a influência da variação do solvente e da temperatura no comportamento espectral da CUR e avaliar a melhora da solubilidade deste composto pelo emprego dos copolímeros P123 e F127, tanto em meio aquoso quanto em estado sólido. Para isso utilizou-se principalmente técnicas espectrofotométricas (UV-Vis e fluorescência) e calorimétrica (calorimetria diferencial de varredura).

## 2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS

Curcumina (contendo > 65% de curcumina e < 35% de demetóxi e bisdemetóxi-curcumina), Plurônico P123 ( $M_n = 5.750 \text{ g mol}^{-1}$ ) e F127 ( $M_n = 12.600 \text{ g mol}^{-1}$ ) com 99% de pureza foram adquiridos da Sigma-Aldrich, acetona, etanol, dimetilsulfóxido e acetonitrila foram comprados da NEON. Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico e usados sem purificação prévia. Água deionizada foi utilizada em todo o estudo.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Espectros de absorção e emissão da CUR em diferentes solventes

Os espectros de absorção e emissão da CUR ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram obtidos em etanol, acetona, DMSO, acetonitrila e água utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Cary-60 da Varian e o fluorímetro Hitachi F-4500. As absorbâncias em todos os solventes foram normalizadas, assim como para a fluorescência, com exceção da água nesse último.

#### 2.2.2 Influência da temperatura nos espectros de absorção da CUR em etanol e água.

Este estudo foi realizado no intuito de verificar se a diferença do perfil espectral da curcumina em solvente orgânico e em meio aquoso é devido ao equilíbrio diceto/ceto-enólico ou devido ao processo de autoagregação que moléculas hidrofóbicas sofrem quando em contato com moléculas de água

Espectros de absorção da CUR ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em etanol e água foram adquiridos em diferentes temperaturas (15–50 °C) a fim de avaliar como a mudança deste parâmetro influencia a variação espectral do composto.

#### 2.2.3 Cálculos computacionais referentes ao equilíbrio diceto/ceto-enólico da CUR

Os cálculos computacionais foram realizados no Grupo de Estrutura Eletrônica e Molecular do Departamento de Química da UFSC.

Otimização das geometrias e frequências por cálculos computacionais foram realizadas usando o software ORCA versão 4.0.1.2 (PBE0-D3/def2-TZVP), a fim de avaliar a direção do equilíbrio D/CE da CUR em fase gasosa, dimetilsulfóxido, etanol e água.<sup>72,73</sup> Estruturas implicitamente solvatadas foram calculadas usando o modelo universal de solvatação SMD.<sup>72</sup> Com exceção da forma enol em água que apresentou uma única frequência imaginária ( $< 14 \text{ cm}^{-1}$ ) todas as estruturas foram obtidas nos mínimos das superfícies de energia

potencial sem a presença de frequências imaginárias. As imagens foram feitas com o Chemcraft versão 1.8 (build 518a).

#### 2.2.4 Cinética de equilíbrio tautomérico (D/CE) e influência da temperatura no processo.

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de CUR ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em etanol foi transferida para uma cubeta contendo 2,5 mL de água deionizada e agitada manualmente duas vezes de forma vigorosa para homogeneização. Espectros UV-Vis foram adquiridos por um período total de 12 min, com intervalos de 10 s em cada leitura, nas temperaturas de 21, 25, 29, 33, 37 e 41  $^{\circ}\text{C}$ . As constantes cinéticas (k) em cada temperatura foram ajustadas à lei cinética de primeira ordem (Equações 2 e 3) utilizando o  $\lambda = 426 \text{ nm}$ .<sup>74</sup>

$$A_t = A_0 e^{-k t} \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{A_t - A_{\infty}}{A_0 - A_{\infty}}\right) = -k t \quad (3)$$

onde  $A_0$  é a absorção no tempo zero,  $A_t$  é a absorção no tempo  $t$ ,  $A_{\infty}$  a absorção no tempo infinito,  $k$  a constante cinética de primeira ordem referente ao processo de equilíbrio diceto/ceto-enólico da CUR e  $t$  o tempo em segundos.

A energia de ativação ( $E_a$ ) do equilíbrio tautomérico da curcumina foi obtido empregando-se a Equação 4, construindo-se um gráfico de  $\ln(k)$  vs  $1/T$ .  $E_a$  é obtido através do coeficiente angular.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (4)$$

Os parâmetros termodinâmicos de ativação ( $\Delta G^{\ddagger}$ ,  $\Delta H^{\ddagger}$ ,  $\Delta S^{\ddagger}$ ) foram obtidos a partir da teoria do complexo ativado. Construiu-se um gráfico de  $\ln(kh/k_B T)$  vs  $1/T$  empregando-se a Equação 5.<sup>75</sup> A partir do coeficiente angular obtém-se a entalpia de ativação ( $\Delta H^{\ddagger}$ ) e a partir do linear a entropia de ativação ( $\Delta S^{\ddagger}$ ).  $\Delta G^{\ddagger}$  é obtido através da Equação 6.<sup>75</sup>

$$\ln\left(\frac{kh}{k_B T}\right) = \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT} \quad (5)$$

$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger} \quad (6)$$

em que  $k$  é a constante cinética a uma determinada temperatura  $T$ ,  $h$  a constante de Planck ( $6,62607 \times 10^{-34}$  J s),  $k_B$  a constante de Boltzmann ( $1,380645 \times 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>) e  $R$  a constante dos gases ( $8,314$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>).

### 2.2.5 Interação da CUR com os copolímeros micelares P123 e F127

Isotermas de interação da CUR com os copolímeros foram realizadas por titulação de uma solução aquosa de CUR por solução estoque de cada PLU, conforme proposto por Vilsinski *et al.* (2015), obtendo-se a fluorescência da CUR no sistema.<sup>76</sup> A concentração de P123 variou de 0 a 2,05 mg mL<sup>-1</sup>, e a de F127 variou de 0 a 40,00 mg mL<sup>-1</sup>, dependendo da temperatura avaliada. Foram avaliadas seis diferentes temperaturas (21, 25, 29, 33, 37 e 41 °C). Este procedimento foi conduzido em quatro concentrações estoque distintas de CUR (0,208; 0,156; 0,104 e 0,052 mg mL<sup>-1</sup>), adicionando 10 µL de cada solução estoque em uma cubeta contendo 2,0 mL de água deionizada. Desta forma é possível saber qual a massa de CUR que está dispersa na cubeta contendo água. Alíquotas dos copolímeros foram adicionadas à cubeta contendo a CUR. A interação/solubilidade da CUR com cada copolímero foi avaliada adquirindo o espectro de fluorescência no intervalo de 446 a 700 nm usando um  $\lambda_{exc} = 426$  nm e monitorando a intensidade de emissão em 497 nm.

A solubilidade nos copolímeros foi obtida pela intersecção de duas linhas derivadas da região de interação e da região de saturação para cada uma das quatro soluções estoque de CUR. A intersecção individual dessas linhas derivadas fornece a solubilidade de cada concentração de CUR à cada PLU em uma determinada temperatura. O coeficiente angular do gráfico dessas intersecções *versus* massa de PLU é a solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) em mg de CUR por g de PLU.

A partir de  $\chi$  obtém-se o coeficiente de partição molar micela-água ( $K_M$ ), utilizando a equação 7.<sup>77</sup>

$$K_M = \frac{\chi(1-CMC)}{S_w} \quad (7)$$

onde CMC é a concentração micelar crítica do plurônico a uma dada temperatura e  $S_w$  é a solubilidade da CUR pura em água ( $3,64 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).<sup>52</sup> Do ponto de vista termodinâmico, a solubilização pode ser considerada como uma partição normal da CUR entre duas fases, micela e aquosa, e a energia livre de solubilização ( $\Delta G$ ) pode ser representada pela Equação 8.<sup>77</sup>

$$\Delta G = -RT \ln(K_M) \quad (8)$$

Para sistemas complexos, a equação de van't Hoff não se adequa de forma satisfatória. Desta forma, a equação polinomial de segunda ordem (Equação 9) descreve melhor o comportamento termodinâmico de sistemas mais complexos como é o caso da solubilização da CUR nos plurônicos. Em que a, b e c são coeficientes polinomiais.<sup>78,79</sup>

$$\Delta G = a + bT + cT^2 \quad (9)$$

Dividindo a Equação 9 por T e derivando-a em relação à 1/T nos fornece a equação de Gibbs-Helmholtz (Equação 10). Usando essa equação e conhecendo os coeficientes polinomiais a e c pelo gráfico dos pontos experimentais de  $\Delta G$  versus 1/T é possível obter  $\Delta H$  em cada temperatura. A entropia em cada temperatura foi obtida empregando a Equação 11.<sup>78</sup>

$$\frac{\partial\left(\frac{\Delta G^0}{T}\right)}{\partial\left(\frac{1}{T}\right)} = a - cT^2 = \Delta H^0 \quad (10)$$

$$\Delta S^0 = \left(\frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T}\right) \quad (11)$$

### 2.2.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos sistemas de PLU–CUR

O tamanho das partículas com e sem CUR, em seis diferentes temperaturas no intervalo de 21 a 41 °C, foram medidos por um DLS (goniômetro ALV CGS-3 multi-tau com laser de 35 mW e  $\lambda = 632,8$  nm com controle de temperatura), de acordo com a metodologia usada por Basak e Bandyopadhyay (2013) com algumas modificações.<sup>63</sup> A concentração de ambos os copolímeros foi de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> e a de CUR foi de 0,8 µg mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções analisadas foram previamente filtradas em filtro de acetato de celulose de 0,22 µm.

O sistema contendo CUR foi preparado usando o método de dispersão sólida, de acordo com o procedimento descrito por Vilsinski *et al.* (2015).<sup>76</sup> Neste método, CUR e PLU são dissolvidos em um cossolvente, etanol por exemplo, sendo posteriormente rota evaporado (Büchi, R-114) a 50 °C em baixa pressão. O filme fino resultante foi deixado em dessecador por 24 h para completa eliminação do solvente e então hidratado com água deionizada a aproximadamente 50 °C com auxílio de um banho Dubnoff da Quimis por 2 h.<sup>80</sup>

As distribuições de tamanho de todas as formulações analisadas foram obtidas diretamente através da curva normalizada de auto correlação dependente do tempo (intensidade

de espalhamento). O coeficiente de difusão translacional  $D$ , para partículas em movimento de translação, é obtida pelo coeficiente angular da taxa de relaxação  $\Gamma$  *versus*  $q^2$  ( $\Gamma = Dq^2$ ),  $q$  (Equação 12) é a magnitude do vetor de espalhamento a um dado ângulo de espalhamento  $\theta$  para um comprimento de onda  $\lambda$  específico em um solvente com índice de refração  $n_0$  (água).

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (12)$$

O raio hidrodinâmico efetivo ( $R_H$ ) das partículas foi obtido usando a relação de Stokes-Einstein (Equação 13).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (13)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $\eta$  é a viscosidade do solvente e  $T$  a temperatura em Kelvin.<sup>81</sup>

### 2.2.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os sistemas PLU–CUR

A técnica de calorimetria diferencial de varredura foi empregada para avaliar a interação da CUR com cada PLU no estado sólido. As amostras foram preparadas solubilizando diferentes proporções de CUR e P123 ou F127 (0 a 100%) em acetona e a solução resultante foi deixada em pressão reduzida durante aproximadamente 24 h para completa evaporação do solvente. A interação entre cada PLU e a curcumina foi avaliada pela diminuição do ponto de fusão e/ou desaparecimento do pico de fusão da CUR adquirido usando o equipamento Shimadzu DSC-50. Entre 5 e 10 mg de cada amostra foi depositada em cadinho de alumínio e submetida a aquecimento de 0 a 190 °C com uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>). Um cadinho de alumínio vazio foi utilizado como referência.<sup>82</sup>

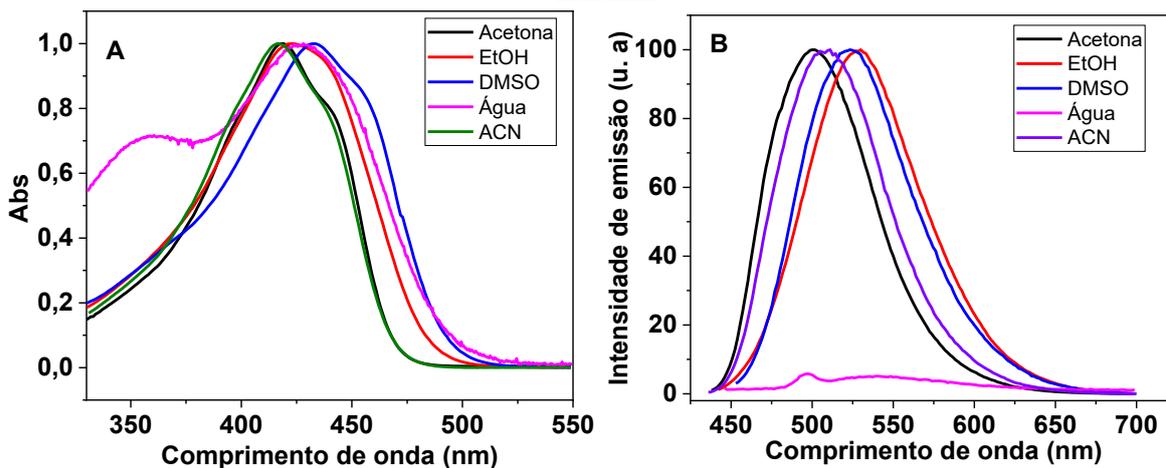
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DA CUR EM DIFERENTES SOLVENTES

A avaliação da solubilidade e quantificação da CUR é geralmente realizada através de técnicas espectrofotométricas como UV-Vis e fluorescência. No entanto, para avaliar a solubilização e outras propriedades físico-químicas da CUR por essas técnicas, é necessário também avaliar o comportamento deste composto em solventes onde ele é solúvel a fim de

verificar se ocorrem certos padrões espectrais característicos nesses solventes e na água. Desta maneira, os espectros de absorção e emissão da CUR ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram obtidos em diferentes solventes (Figura 9) para avaliar a influência da polaridade destes nos perfis espectrais da CUR.

Figura 9 - Espectros de (A) absorção e (B) emissão normalizados da CUR ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em acetona, acetonitrila, água, etanol e dimetilsulfóxido (a emissão da CUR em água foi a única não normalizada). Os espectros de emissão foram adquiridos a  $25^\circ\text{C}$  utilizando  $\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{abs}}$  máxima.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

De forma geral, a curcumina é solúvel em solventes orgânicos polares próticos e apróticos, se mostrando na sua forma livre monomerizada nesses meios. Os espectros e comprimentos de onda ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) de máxima absorção da CUR em solventes apróticos (acetona, acetonitrila (ACN) e dimetilsulfóxido(DMSO)) são similares (Figura 9), apresentando uma única banda estreita. Em solventes orgânicos próticos como é o caso do etanol (EtOH) a CUR exibe também uma única banda de absorção, porém mais larga que os exemplos de solventes apróticos citados anteriormente.<sup>83,84</sup> Os  $\lambda_{\text{abs}}$  máximos para todos os solventes não são os mesmos, entretanto não foi notado tendências desse parâmetro em relação às constantes dielétricas, momentos de dipolo ou a polaridade  $E_{\text{T}}(30)$  dos solventes orgânicos avaliados.<sup>83,84</sup> Em água a CUR possui duas bandas de absorção, uma de maior intensidade com  $\lambda_{\text{abs}}$  muito próxima aquelas apresentadas pelos solventes orgânicos próticos e outra de menor intensidade em comprimentos de onda menores.<sup>34,84</sup>

Os perfis espectrais de emissão da CUR em solventes orgânicos seguem uma tendência similar aos espectros de absorção do composto, porém, as diferenças de larguras praticamente não existem. Ficando, assim, a diferença por conta dos comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{\text{emi}}$ ) máximos. Novamente não foi verificado qualquer correlação entre o  $\lambda_{\text{emi}}$  máximo e as características físico-químicas dos solventes. A grande singularidade aqui ficou por conta da

CUR quando em água, neste solvente o composto tem sua intensidade de emissão quase que totalmente reduzida. Nota: a intensidade do espectro da CUR em água foi aumentado significativamente (porém não normalizada), uma vez que a de intensidade de emissão da CUR em água é muito menor comparada aos outros solventes utilizados.<sup>84,85</sup>

Analisando-se os espectros de absorção e emissão da curcumina obtidos em solventes orgânicos e água sugeriu-se a ocorrência da autoagregação da CUR em dímeros do tipo H (empilhadas em orientação paralela) quando em água, visto que ocorre diminuição da banda principal de absorção em maior comprimento de onda e o surgimento de uma banda de absorção de menor intensidade em menor comprimento de onda. Em solventes orgânicos esse fenômeno não é observado, já que nesses ambientes a CUR está na forma monomérica ou livre. Adicionalmente, o espectro de emissão da curcumina em água é praticamente extinto, sendo este mais um fator que poderia corroborar com a sugestão de agregação proposta. Uma vez que, como discutido, agregados do tipo H tem sua intensidade de emissão severamente diminuída em comparação a solventes onde o composto é solúvel, no caso, solventes orgânicos polares.<sup>66</sup>

Adicionalmente, além do processo de agregação, outro fator (supressão) pode influenciar significativamente a intensidade de emissão da CUR e outros cromóforos em meio aquoso.<sup>64,85</sup> Em solução aquosa, moléculas de água podem atuar como supressores de fluorescência e diminuir significativamente a emissão de fluorescência da curcumina e outros cromóforos, transferindo a energia adquirida pelo composto durante o processo de absorção por colisões entre a CUR e as moléculas de água supressoras, como visto na Figura 9. Desta forma, a desativação do estado excitado da curcumina se dá por rota não radiativa. Além disso, estudos sugerem que a capacidade supressora de fluorescência da água depende da quantidade desta no sistema.<sup>85</sup>

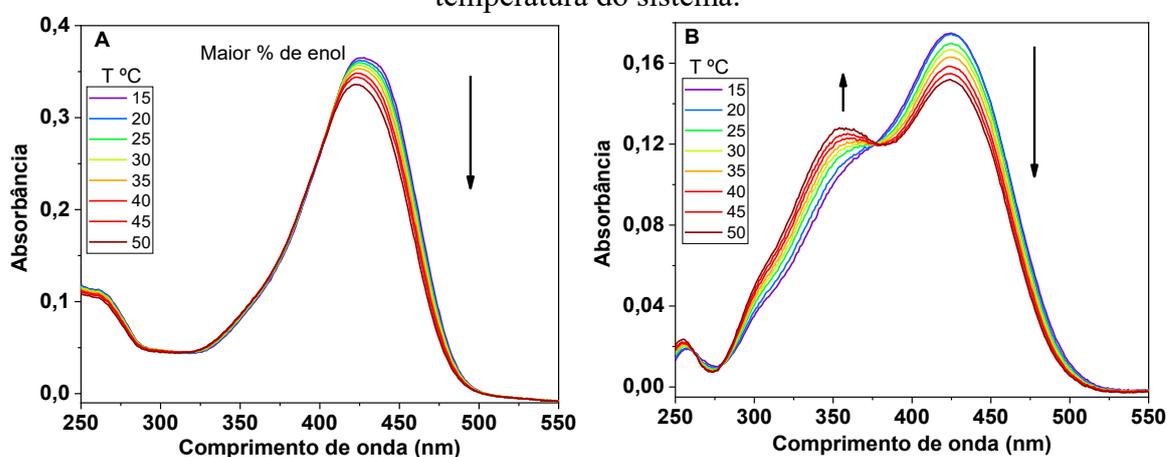
Provavelmente os fatores de agregação e supressão prevalecem no comportamento de fluorescência da CUR. Ainda assim, é difícil apontar com rigor se é o processo de agregação ou outro equilíbrio, tal como o de equilíbrio tautomérico o causador da modificação espectral de absorção molecular da CUR em meio aquoso, ou ainda se é a participação sinérgica de ambos os processos.<sup>34,70</sup>

### 3.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CUR EM ETANOL E ÁGUA.

O processo de autoagregação de compostos orgânicos é favorecido a baixas temperaturas devido ao maior tempo de contato entre monômero-monômero provendo tempo suficiente para que ocorra alinhamento das moléculas e, assim, a formação de dímeros.

Enquanto que altas temperaturas aumentaria a velocidade do movimento difusional dos monômeros no solvente, diminuindo assim o tempo de contato entre monômero-monômero e consequentemente restringindo a formação de dímeros.<sup>64</sup> No propósito de verificar qual dos dois comportamentos (equilíbrio tautomérico e agregacional) é predominante na influência da constituição do espectro de absorção molecular da CUR em solução aquosa, realizou-se medidas de UV-Vis em função da temperatura para a CUR em etanol e água. A Figura 10 apresenta os espectros de absorção do princípio ativo nesses solventes em diferentes temperaturas.

Figura 10 - Influência da temperatura no espectro de absorção da CUR ( $4,0 \mu\text{g m L}^{-1}$ ) em (A) etanol e (B) água. As setas indicam o sentido da variação espectral devido ao aumento da temperatura do sistema.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

É possível observar na Figura 10A que a curcumina solubilizada em etanol exibe um espectro de absorção bem resolvido, com uma única banda de absorção próximo a 426 nm referente à espécie livre, não ocorrendo modificação significativa do perfil espectral da CUR neste solvente com a variação da temperatura e que a conformação ceto-enol é predominante nesse meio.<sup>66,70,84</sup> Nota-se somente um pequeno alargamento da banda de absorção e um aumento da intensidade de absorção com a diminuição da temperatura, isso é resultado da maior probabilidade de transições eletrônicas com a diminuição da temperatura, influenciando apenas a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da CUR em etanol e não o equilíbrio tautomérico do composto neste solvente.<sup>66,70,84</sup> Em solução aquosa (Figura 10B) ocorre um comportamento diferente do observado em etanol. Inicialmente a baixas temperaturas a curcumina apresenta uma banda de absorção em 428 nm e um ombro em 358 nm. O aumento da temperatura resulta na diminuição da banda em 428 nm e no aumento na intensidade do ombro em 358 nm, este comportamento indica que a mudança espectral não é devido a diminuição da probabilidade da transição

eletrônica ocorrer, mas sim que outro tipo de equilíbrio está envolvido no processo e que é favorecido pelo aumento da temperatura.<sup>66,70</sup>

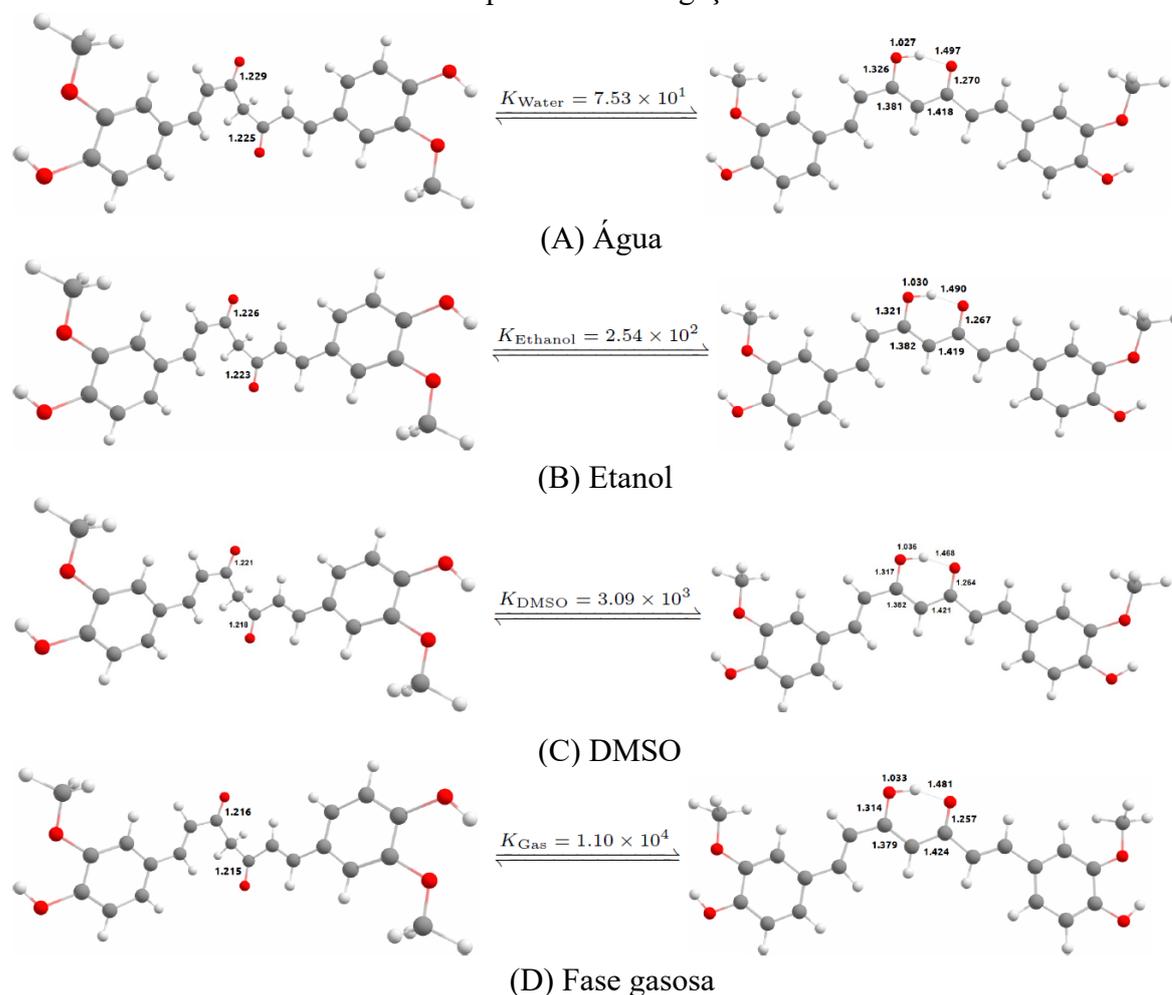
Como mencionado anteriormente, se o processo de dimerização fosse o predominante para a composição do espectro de UV-Vis da CUR ocorreria o processo oposto ao observado na Figura 10, uma vez a agregação é desfavorecida com o aumento da temperatura. Isto é, se a banda em 428 nm fosse atribuída ao monômero e a em 358 nm ao dímero ocorreria um aumento da banda em 428 nm em vez do decaimento da mesma. Entretanto, foi observado o efeito oposto à teoria agregacional com o aumento da temperatura. Desta forma pode-se apontar que o processo de equilíbrio tautomérico é o responsável pelo comportamento espectral da CUR em solução aquosa e que a banda em 428 nm é atribuída à espécie ceto-enol, enquanto a banda em 358 nm está relacionada à forma diceto do equilíbrio tautomérico.<sup>34,66,70</sup>

### 3.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS REFERENTES AO EQUILÍBRIO DICETO/CETO-ENÓLICO DA CUR

Com base nas observações experimentais, fez-se uso de estudos baseados em cálculos computacionais para simular e avaliar o equilíbrio diceto/ceto-enólico da curcumina em água, etanol, DMSO e em fase gasosa (Figura 11) e avaliar se os dados teóricos corroboram com os experimentais. Os dados obtidos das simulações apresentados na Figura 11 estão sintetizados na Tabela 1.

Em todos os ambientes (solventes), a forma ceto-enol é a mais estável e predominante. A forma enólica pode existir em diferentes formas isoméricas cis e trans dependendo da natureza, temperatura, polaridade ou ligação de hidrogênio dos solventes, no entanto, a forma cis-enólica deve ser energeticamente mais estável devido à forte ligação de hidrogênio intramolecular.<sup>84</sup> A diferença de energia entre as formas diceto e ceto/enol depende do ambiente (Figura 11, Tabela 1). Conforme ilustrado na Figura 11,  $K_{\text{água}}$  é aproximadamente 3 três vezes menor do que  $K_{\text{etanol}}$ , mas quase 40 e 150 vezes menor que  $K_{\text{DMSO}}$  e  $K_{\text{gás}}$ , respectivamente. Isso enfatiza a maior abundância esperada da forma diceto em água, em comparação com solventes orgânicos ou fase gasosa. A principal contribuição energética para esta diferença vem do componente entálpico da energia livre de Gibbs (Tabela 1) quando em fase gasosa e pelo componente entrópico nos solventes. A mesma tendência foi observada por Anjomshoa *et al.* (2016) ao estudarem a otimização da geometria e o equilíbrio tautomérico utilizando outro tipo de código funcional (B3LYP) ao realizar os cálculos teóricos.<sup>86</sup>

Figura 11 - Equilíbrio diceto/ceto-enólico (D/CE) da curcumina em (A) água, (B) etanol e (C) DMSO e (D) fase gasosa à 25°C. As constantes de equilíbrio (K) D/CE respectivo a direção enol estão destacadas e os comprimentos de ligação selecionados estão em Å.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 1 - Parâmetros termodinâmicos teóricos calculados a 298,15 K e 1 atm. Todas as energias são relativas à forma enol em cada meio. As constantes de equilíbrio descrevem o observado na Figura 11.

	$K_{\text{ambiente}}$	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
Água	$7,53 \times 10^1$	-15,95	-17,57
Etanol	$2,54 \times 10^2$	-15,28	-5,20
DMSO	$3,09 \times 10^3$	-15,91	+13,48
Fase gasosa	$1,10 \times 10^4$	-23,82	- 2,51

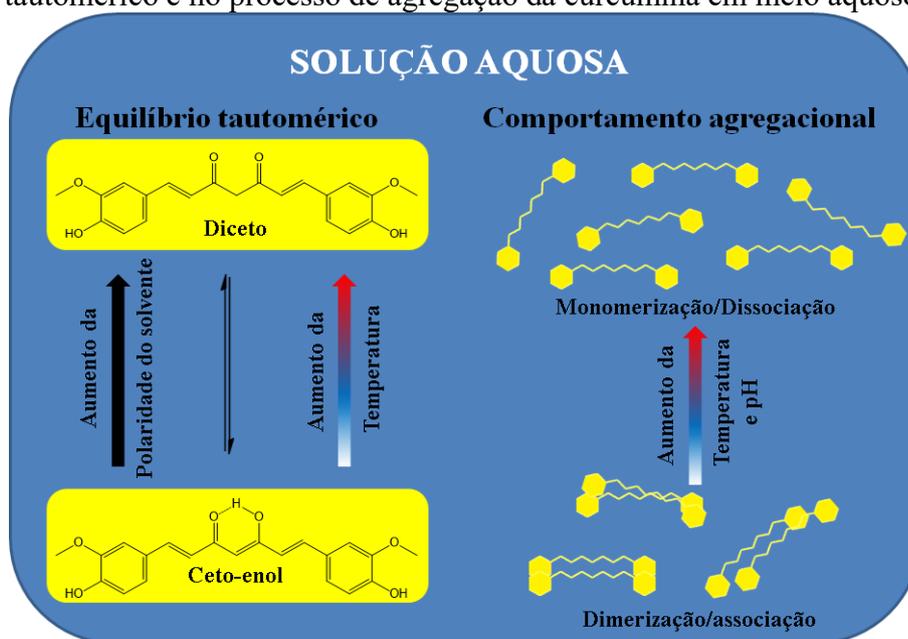
Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

É possível observar pela Tabela 1 que a contribuição entálpica do processo de equilíbrio é relativamente próxima comparando-se água (-15,9 kJ mol<sup>-1</sup>), etanol (-15,3 kJ mol<sup>-1</sup>) e DMSO (-15,9 kJ mol<sup>-1</sup>), entretanto, a contribuição entrópica (desfavorável) em água é

relativamente maior que em etanol,  $-17,6$  e  $-5,2 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente. Isso reflete nos valores de energia livre de Gibbs e na  $K_{eq}$  do equilíbrio D/CE da curcumina.<sup>86</sup>

De acordo com os resultados analisados podemos propor as seguintes afirmações: O processo de dimerização/agregação e a supressão são os responsáveis pelo efeito de decaimento da intensidade de emissão de fluorescência da curcumina em meio aquoso, uma vez que este composto forma agregados do tipo H em água. Entretanto, o processo de dimerização da CUR parece não conferir qualquer significância à construção do espectro de absorção da curcumina, já que o aumento da temperatura causa um comportamento oposto ao esperado para a agregação de compostos hidrofóbicos. Sendo, portanto, o equilíbrio D/CE o responsável pela diminuição da banda em 428 nm e aumento da banda em 358 nm quando a CUR muda de um solvente orgânico para o meio aquoso. Esses achados estão compilados na Figura 12.<sup>65,70,84</sup>

Figura 12 - Esquema explicando a influência da temperatura, pH e solvente no equilíbrio tautomérico e no processo de agregação da curcumina em meio aquoso.



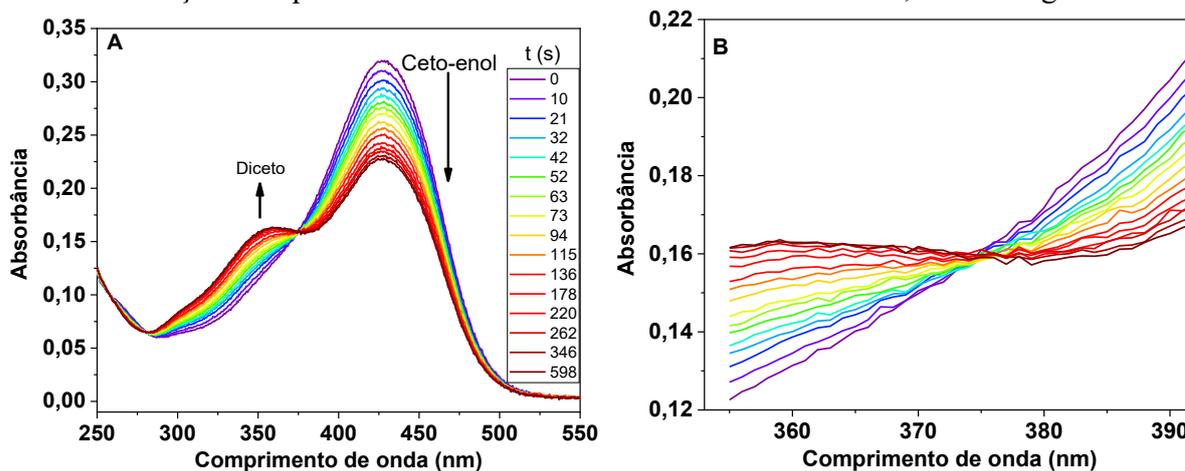
Fonte: figura adaptada de Bhatia *et al.* (2016).<sup>66</sup>

### 3.4 CINÉTICA DE EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO (D/CE) E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO PROCESSO.

Apesar de ambos os equilíbrios (dimerização e tautomerização) serem importantes e acontecerem em solução aquosa, o equilíbrio diceto/ceto-enólico predomina em relação ao primeiro se a técnica de UV-Vis for utilizada para avaliar o processo de mudança espectral da curcumina em meio aquoso. Desta forma, a cinética envolvida no equilíbrio D/CE da CUR em solução pode ser satisfatoriamente avaliada pelo emprego da técnica de UV-Vis sem influência

do processo de dimerização da CUR.<sup>66</sup> A Figura 13 mostra os sucessivos espectros de absorção da CUR ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em função do tempo com a mudança do solvente (de etanol para água).

Figura 13 - (A) Variação dos espectros de absorção em função do tempo envolvidos na cinética de equilíbrio diceto/ceto-enol da curcumina ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em água a  $25^\circ\text{C}$  e (B) zoom do ponto isobéstico em  $374 \text{ nm}$ . Os espectros foram obtidos após a adição de uma alíquota da solução estoque de CUR em etanol à uma cubeta contendo  $2,5 \text{ mL}$  de água.

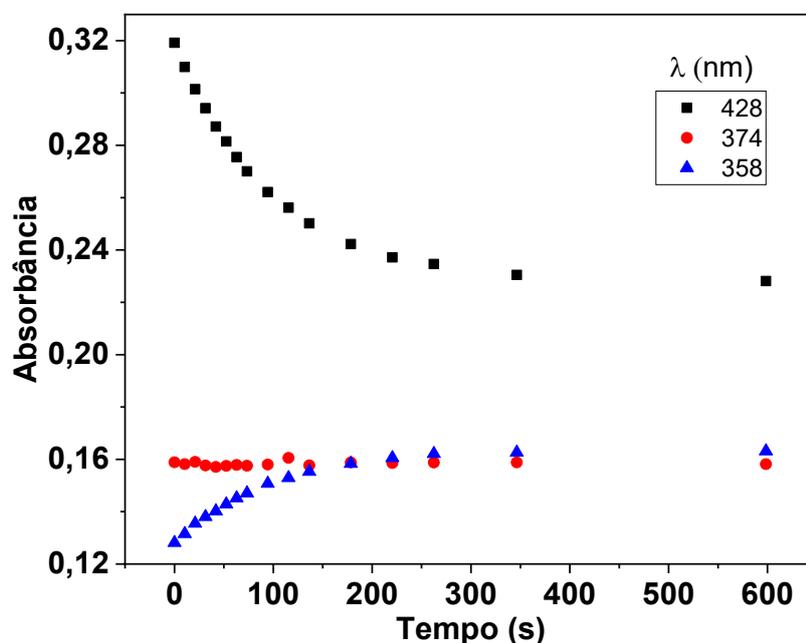


Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Quando uma alíquota de uma solução etanólica de CUR foi transferida para uma cubeta contendo solução aquosa, um decaimento na banda característica da espécie ceto-enol e um aumento na intensidade da banda diceto em função do tempo pôde ser observado. Ou seja, o equilíbrio tautomérico foi deslocado para a forma diceto quando em meio aquoso. A mesma tendência foi encontrada por Namazian *et al.* (2016) em seus estudos teóricos.<sup>86</sup> Também foi observada a formação de ponto isobéstico em  $374 \text{ nm}$  durante a variação espectral, indicando que o processo de equilíbrio ocorre em uma única etapa.<sup>66</sup> O perfil cinético das principais bandas referentes às espécies diceto ( $358 \text{ nm}$ ) e ceto-enol ( $428 \text{ nm}$ ), além do ponto isobéstico ( $374 \text{ nm}$ ) estão expostos na Figura 14.

Neste contexto é possível entender melhor o motivo pelo qual a literatura apresenta valores de  $\text{pK}_a$  distintos para a CUR, dependendo do tipo de método utilizado, principalmente quando o estudo é realizado por métodos espectrofotométricos, como mostrado por Tønnesen *et al.* (1985),<sup>39</sup> Bernabé-Pineda *et al.* (2004)<sup>40</sup> e por Zhang *et al.* (2012).<sup>41</sup> Como o equilíbrio tautomérico ocorre paralelamente ao equilíbrio iônico, é factível que os espectros (ou as leituras em geral) obtidos pelos investigadores tenham sido colhidos antes que o equilíbrio tautomérico tivesse sido estabelecido. Fazendo com que valores incorretos ou discrepantes de  $\text{pK}_a$  fossem encontrados pelos diferentes pesquisadores.

Figura 14 - Perfil cinético das principais bandas de absorção envolvidas no equilíbrio D/CE da CUR obtidos a partir da Figura 13. Mostrando a diminuição da banda da espécie ceto-enol em 428 nm, aumento da banda referente a espécie diceto em 358 nm e o perfil do ponto isosbético em 374 nm.

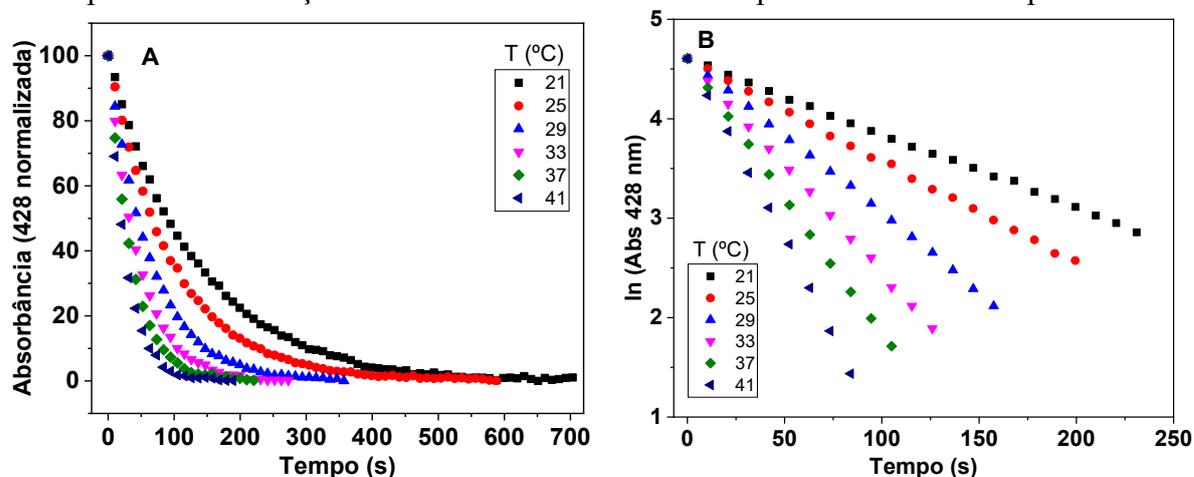


Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

É importante enfatizar que mesmo não sendo mostrado matematicamente, o desaparecimento da banda em 428 nm ocorre na mesma taxa de aumento da banda em 358 nm, o que está de acordo com nossa proposta em relação ao equilíbrio tautomérico ocorrer em uma única etapa.

Adicionalmente, os estudos de cinética do equilíbrio D/CE da CUR em meio aquoso foi realizado em diferentes temperaturas a fim de conhecer o efeito desse parâmetro neste processo. O gráfico da Figura 15 mostra o perfil cinético monitorado em 428 nm a diferentes temperaturas.

Figura 15 - (A) Perfil cinético de decaimento da banda de absorção normalizada referente à espécie ceto-enol (428 nm) em função do tempo em diferentes temperaturas e (B) logaritmo neperiano da absorção em 428 nm da CUR *versus* tempo em diferentes temperaturas.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Figura 15 pode ser notado que a velocidade com que o equilíbrio tautomérico é estabelecido é altamente dependente da temperatura. A 21 °C o equilíbrio é alcançado em aproximadamente 700 segundos, enquanto que em temperaturas mais elevadas a cinética ocorre mais rapidamente. Assim, a temperatura afeta tanto o deslocamento do equilíbrio D/CE como também a velocidade que ele ocorre. Adicionalmente, os decaimentos exponenciais se ajustam perfeitamente ao modelo cinético de primeira ordem (Equação 3; Figura 15B). Os valores das constantes cinéticas obtidos pela equação de primeira ordem estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores das constantes cinéticas relacionadas ao equilíbrio de tautomerização da CUR em água em função da temperatura.

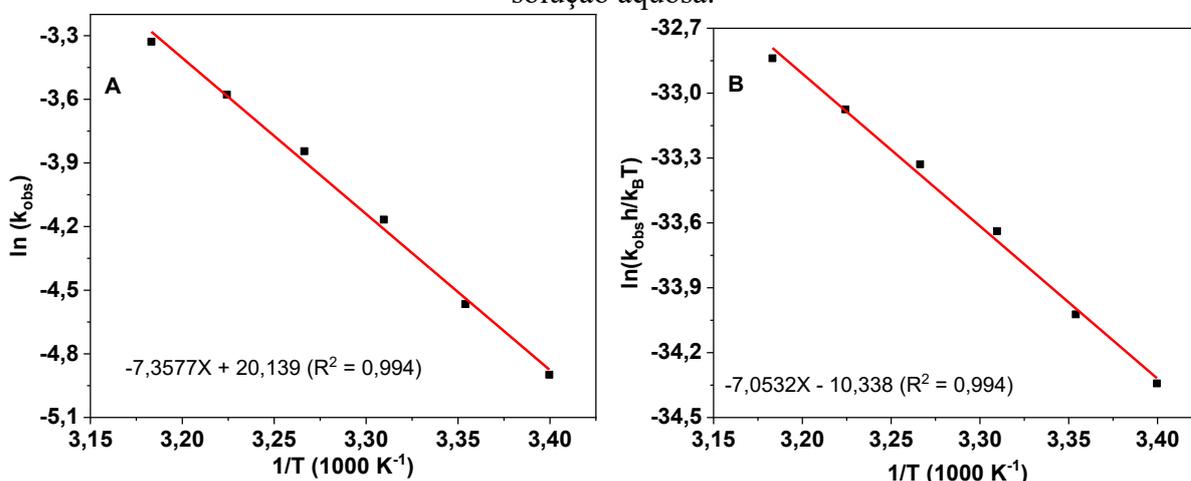
T (K)	T (°C)	k (10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )
294,15	21	7,46 ± 0,05
298,15	25	10,40 ± 0,04
302,15	29	15,39 ± 0,07
306,15	33	21,13 ± 0,11
310,15	37	28,07 ± 0,18
314,15	41	35,74 ± 0,33

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

A Tabela 2 denota que as constantes cinéticas ( $k$ ) aumentam quase 5 vezes com o aumento da temperatura de 21 para 41 °C. O valor da energia de ativação ( $E_a$ ) foi obtida a partir do coeficiente angular do gráfico da Figura 16A, usando a Equação 4.<sup>75</sup>

Os valores de  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  foram adquiridos usando a Equação 5 (Figura 16B), onde o coeficiente angular do gráfico representa o termo  $\Delta H^\ddagger/R$  e o coeficiente linear  $\Delta S^\ddagger/R$ . A energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) pôde ser obtida pela relação entre  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$  como resultado da Equação 6.<sup>75</sup>

Figura 16 - (A) Gráfico de  $\ln(k)$  versus  $1/T$  utilizado para obter o valor de energia de ativação ( $E_a$ ) e (B) gráfico de  $\ln(kh/k_B T)$  versus  $1/T$  utilizado para obter os parâmetros termodinâmicos de ativação ( $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  e  $\Delta G^\ddagger$ ) envolvidos no equilíbrio diceto/ceto-enol da curcumina em solução aquosa.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da análise dos dados acima constatou-se que a energia de ativação do processo de tautomerização é de aproximadamente  $61,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$  têm valores de  $58,6 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $-86,0 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores são consistentes, uma vez que a entalpia foi positiva e a entropia negativa, pois a entropia do complexo ativado deve ser menor que a entropia dos reagentes e produtos. Outra informação importante foi que tanto o  $\Delta H^\ddagger$  quanto o termo  $-\Delta S^\ddagger$  contribuem sinergicamente para o valor positivo de  $\Delta G^\ddagger$ . Estudos conduzidos por Huang *et al.* (2009) demonstraram valores de  $E_a$  similares ao da curcumina em sua pesquisa envolvendo o equilíbrio tautomérico do ácido 4-hidroxifenilpirúvico.<sup>87</sup>

Como demonstrado acima, em meio aquoso a CUR tende a sofrer autoagregação em dímeros e seu equilíbrio tautomérico ser deslocado para a espécie diceto, principalmente em baixas temperaturas para o primeiro e altas temperaturas para o último, ocasionando precipitação ou saída do meio de dissolução. Esses dois fatores no ambiente fisiológico ricos em água, como é o caso da corrente sanguínea e exsudato, podem influenciar fortemente a

interação/ligação da curcumina em células, receptores ou proteínas específicas de uma determinada doença ou condição de saúde. Como demonstrado por Yanagisawa *et al.* (2010) em sua pesquisa relacionada a ação da CUR em doença de Alzheimer.<sup>47,88</sup>

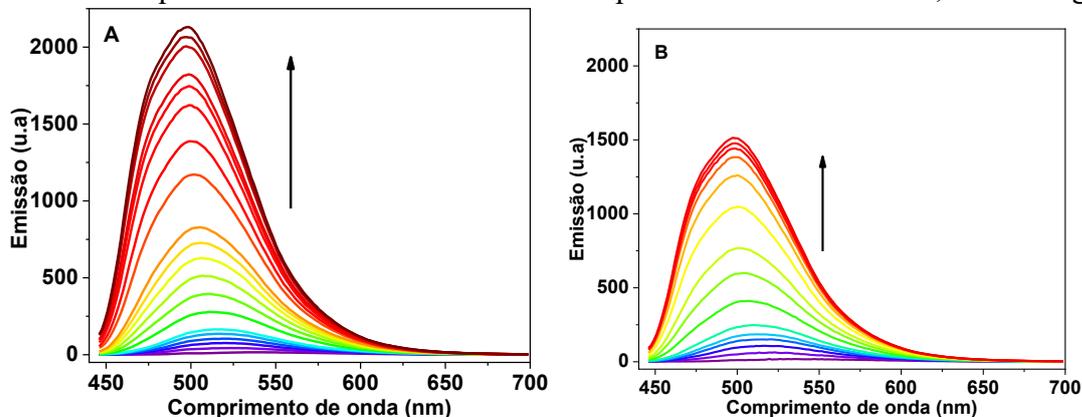
Conseqüentemente, é necessário encontrar um sistema carreador que proporcione um ambiente favorável à manutenção e permanência da CUR na sua forma enol e aumente sua solubilidade. Copolímeros tribloco do tipo plurônico formados por  $\text{PEO}_x\text{-PPO}_y\text{-PEO}_x$  tem sido empregues a fim de evitar a agregação de compostos hidrofóbicos, aumentando assim a solubilidade, estabilidade e a atividade em meio fisiológico desses compostos. Foram reportados a incorporação de hipericina, ftalocianinas e a própria curcumina à esses sistemas transportadores.<sup>89-91</sup>

### 3.5 INTERAÇÃO DA CUR COM OS PLURÔNICOS P123 E F127

O estudo da interação da CUR com os copolímeros em solução aquosa é de grande interesse para o desenvolvimento de formulações biocompatíveis que visem a melhoria da solubilidade e/ou liberação de ativos pouco solúveis em água e fluidos biológicos, assim como a manutenção e permanência da CUR na sua forma enol.<sup>89-91</sup> Os copolímeros exibem boa compatibilidade, integridade estrutural das micelas e são indetectáveis por macrófagos.

O perfil de interação da CUR com os plurônicos P123 e F127 foi acompanhado por emissão de fluorescência (Figura 17) adicionando-se a solução aquosa de CUR alíquotas de uma solução concentrada de copolímero de acordo com a descrição do item 2.2.5.

Figura 17 - Variação do espectro de emissão da CUR (2,08  $\mu\text{g}$ ) em função da concentração de (A) P123 (0–2,05  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e (B) F127 (0–40,00  $\text{mg mL}^{-1}$ ) em água.  $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$  e  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A massa de CUR indicada é obtida sabendo o volume da alíquota retirada da solução estoque de CUR em EtOH e transferida para a cubeta contendo 2,0 mL de água.



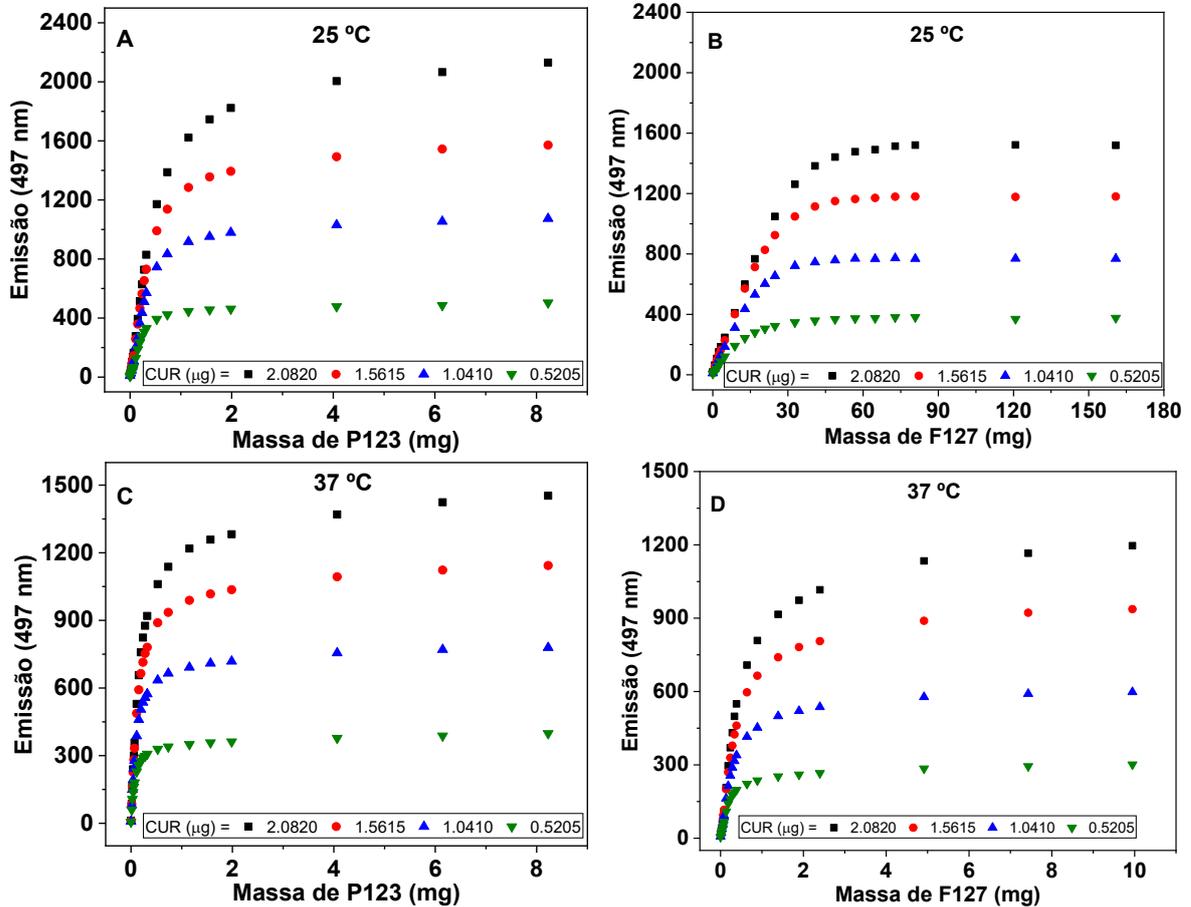
Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Inicialmente, observa-se que a intensidade de emissão da CUR é praticamente zero, causado pelo processo de supressão e autoagregação deste composto em meio aquoso, como já discutido na seção 3.1.<sup>65,66,70,84</sup> Após as adições de alíquotas de soluções concentradas de P123 ou F127 é possível observar um aumento gradativo na intensidade de emissão da CUR em solução em virtude da solubilização deste composto pelos plurônicos.

Em água, o principal mecanismo de solvatação da CUR é por ligações de hidrogênio entre CUR e água ou entre CUR–CUR (dímero). Após a adição dos plurônicos a curcumina se difunde a partir do seio da solução para o núcleo interno das micelas, no qual o principal meio de solvatação é por interações dipolo-dipolo proporcionado pelas cadeias não próticas de PPO da estrutura dos copolímeros (PEO<sub>x</sub>–PPO<sub>y</sub>–PEO<sub>x</sub>). Fenômeno favorecido pela existência de um microambiente mais hidrofóbico comparado ao sistema aquoso.<sup>76,92</sup> Assim, a CUR fica menos acessível a moléculas de água, dificultando o estabelecimento de interações com moléculas do solvente supressor e moléculas da própria CUR.

As isotermas de ligação CUR–PLU usando diferentes quantidades de curcumina (2,08–0,52 µg) foram monitoradas em comprimento de onda de emissão igual a 497 nm. Os experimentos foram realizados em 5 temperaturas diferentes (25, 29, 33, 37 e 41 °C), onde as curvas referentes às temperaturas de 25 e 37 °C para ambos os copolímeros são mostradas na Figura 18. As massas de CUR indicadas são obtidas sabendo o volume da alíquota retirada da solução estoque de CUR em EtOH e adicionadas à cubeta contendo água.

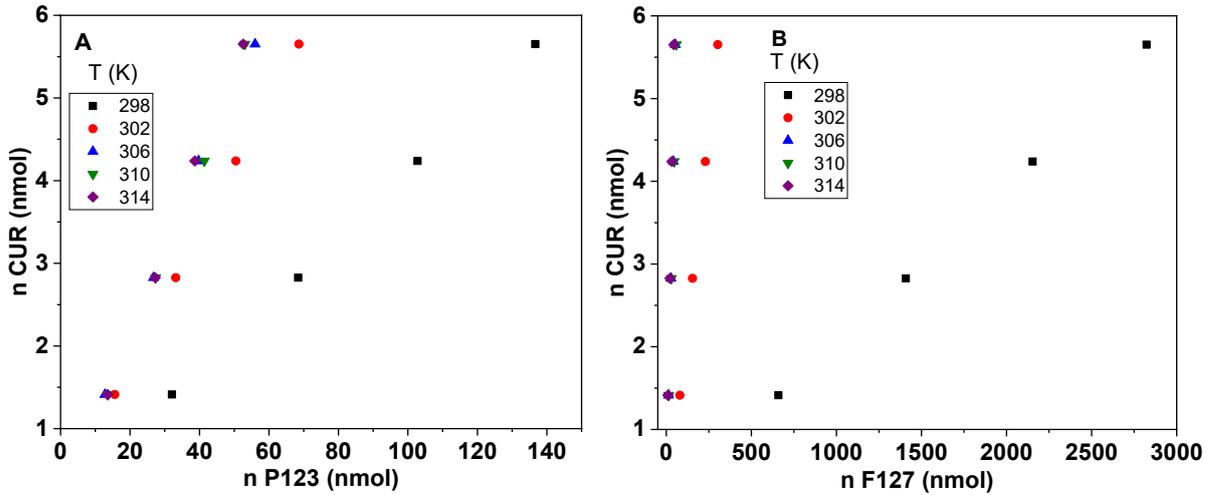
Figura 18 - Variação da intensidade de emissão da CUR (2,08 – 0,52  $\mu\text{g}$ ) em meio aquoso monitorada em 497 nm com o aumento da concentração de (A e C) P123 e (B e D) F127. São mostrados os resultados referentes às temperaturas de (A e B) 25 °C e (C e D) 37 °C.  $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$ . As massas de CUR indicadas são obtidas sabendo o volume da alíquota retirada da solução estoque de CUR em EtOH e transferida para a cubeta contendo 2,0 mL de água.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

As curvas experimentais mostram um comportamento usualmente observado em isotermas de ligação, sendo uma etapa inicial de associação simples, seguida de tendência à saturação na interação CUR–PLU.<sup>76,93</sup> A distinção entre as curvas reside na concentração de cada copolímero necessária para atingir a região de saturação de emissão da CUR (veja os eixos X). Duas linhas foram traçadas nas etapas distintas de associação e saturação, respectivamente, fornecendo assim a solubilidade (intersecção das curvas) para cada quantidade de CUR utilizada. Os quatro pontos adquiridos com este procedimento foram graficados em função da quantidade de P123 e F127 e o coeficiente angular desses pontos forneceu a solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) da CUR em cada copolímero (Tabela 3). Esse procedimento foi executado para as diferentes temperaturas a fim de se obter a solubilidade intrínseca como função da temperatura (Figura 19).

Figura 19 - Solubilidade de cada quantidade de CUR utilizada para calcular a solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) em (A) P123 e (B) F127 a diferentes temperaturas.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 3 - Solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) da CUR em P123 e F127 em função da temperatura.

PLU	T (K)	T (°C)	$\chi \left( \frac{\mu\text{gCUR}}{\text{mgPLU}} \right)$	$\chi \left( \frac{\text{mmolCUR}}{\text{molPLU}} \right)$
P123	298,15	25,0	2,58	40,22
	302,15	29,0	5,09	79,45
	306,15	33,0	6,28	98,02
	310,15	37,0	6,77	105,63
	314,15	41,0	6,68	104,30
F127	298,15	25,0	0,05	1,95
	302,15	29,0	0,56	19,00
	306,15	33,0	1,86	63,56
	310,15	37,0	2,75	94,17
	314,15	41,0	3,54	121,11

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

Analisando a Figura 19 e a Tabela 3 nota-se, de modo geral, que a uma mesma temperatura o P123 interage e solubiliza melhor a CUR que o F127. Adicionalmente, a temperatura exerce uma influência significativa na interação da CUR com ambos os

copolímeros. Onde o aumento deste parâmetro causa um aumento da interação entre os constituintes, resultando na elevação da quantidade de curcumina ligada às micelas nos dois plurônicos.<sup>63</sup> Porém, esse efeito é sempre mais significativo para o P123 do que para o F127, no qual o F127 sempre oferece uma menor solubilidade à CUR que o P123. Por exemplo, a 25 °C a solubilidade da CUR em P123 é de 2,6  $\mu\text{g mg}^{-1}$  enquanto que a solubilidade em F127 é de apenas 0,05  $\mu\text{g mg}^{-1}$ . Elevando-se a temperatura da solução para 41°C ocorre substancial aumento da solubilidade da CUR em ambos os copolímeros, exibindo valores de 6,7 e 3,5  $\mu\text{g mg}^{-1}$  para P123 e F127, respectivamente.

Os copolímeros do tipo plurônicos possuem consideráveis diferenças nas suas características físico-químicas e no processo de organização micelar, raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), concentração micelar crítica (CMC), temperatura micelar crítica (TMC), além da interação e entrega de ativos. Essas propriedades dependem da razão PEO/PPO na estrutura do copolímero, concentração do plurônico e temperatura da solução.<sup>58,94</sup> Desta forma, essas características acabam refletindo no grau de interação e solubilidade da CUR em P123 e F127, e para auxiliar na elucidação dos comportamentos descritos anteriormente é necessário utilizar as Tabela 4 e 5 que descrevem quantitativamente alguns dos parâmetros associados ao processo de organização micelar dos copolímeros aqui trabalhados.

Tabela 4 - Temperatura micelar crítica (TMC) dos copolímeros P123 e F127 em função da concentração de copolímero.

[PLU] $\text{mg mL}^{-1}$	F127		P123	
	[PLU] $\text{mmol L}^{-1}$	TMC ( $^{\circ}\text{C}$ )	[PLU] $\text{mmol L}^{-1}$	TMC ( $^{\circ}\text{C}$ )
0,25	0,02	35,5	0,043	24,0
0,50	0,04	33,0	0,087	22,5
1,00	0,079	31,0	0,174	21,0
2,50	0,198	28,0	0,435	19,0
5,00	0,397	26,5	0,87	17,5
10,00	0,794	24,0	1,74	16,0

Fonte: tabela elaborada a partir do trabalho de Alexandridis *et al.*<sup>58</sup>

Tabela 5 - Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros P123 e F127 em função da temperatura da solução.

T (°C)	<b>F127</b> (PEO <sub>100</sub> -PPO <sub>70</sub> -PEO <sub>100</sub> )		<b>P123</b> (PEO <sub>20</sub> -PPO <sub>70</sub> -PEO <sub>20</sub> )	
	CMC (mg mL <sup>-1</sup> )	CMC (mmol L <sup>-1</sup> )	CMC (mg mL <sup>-1</sup> )	CMC (mmol L <sup>-1</sup> )
20,0	40,0	3,174	1,8	0,313
25,0	7,0	0,555	0,3	0,052
30,0	1,0	0,079	0,05	0,009
35,0	0,25	0,019	0,01	0,002
40,0	0,08	0,006	—	—

Fonte: tabela elaborada a partir do trabalho de Alexandridis *et al.*<sup>58</sup>

Apesar de ambos os copolímeros possuírem quantidades similares de unidades de PPO (~70) que formam o núcleo micelar, o número de unidades de PEO no F127 é cinco vezes maior (100) que no P123 (20), resultando num balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) maior para o F127 (22) em comparação ao P123 (8).<sup>60</sup> Neste sentido, devido sua menor cadeia de PEO e HLB o P123 proporciona um microambiente mais lipossolúvel, capaz de acomodar compostos pouco solúveis como a curcumina com maior eficiência que o plurônico F127. Essa diferença no tamanho da cadeia PEO do P123 e F127, assim como o HLB acabam influenciando a facilidade com que cada copolímero se associe em micelas quando em solução aquosa.

Como visto na Tabela 5, os valores de concentração micelar crítica (CMC) dos plurônicos dependem fortemente das características de cada copolímero e são altamente afetados pela temperatura, resultando como visto na Tabela 3, numa diferença de solubilidade da CUR pelos dois copolímeros, sendo também função da temperatura. Por exemplo, a 25 °C a CMC do P123 é de 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto para o F127 a CMC é consideravelmente maior (7,0 mg mL<sup>-1</sup>). Ou seja, a associação de unímeros de P123 em solução ocorre com uma concentração significativamente menor conferindo ao P123 melhores propriedades para a solubilização de ativos mesmo a baixas temperaturas.<sup>58,94</sup>

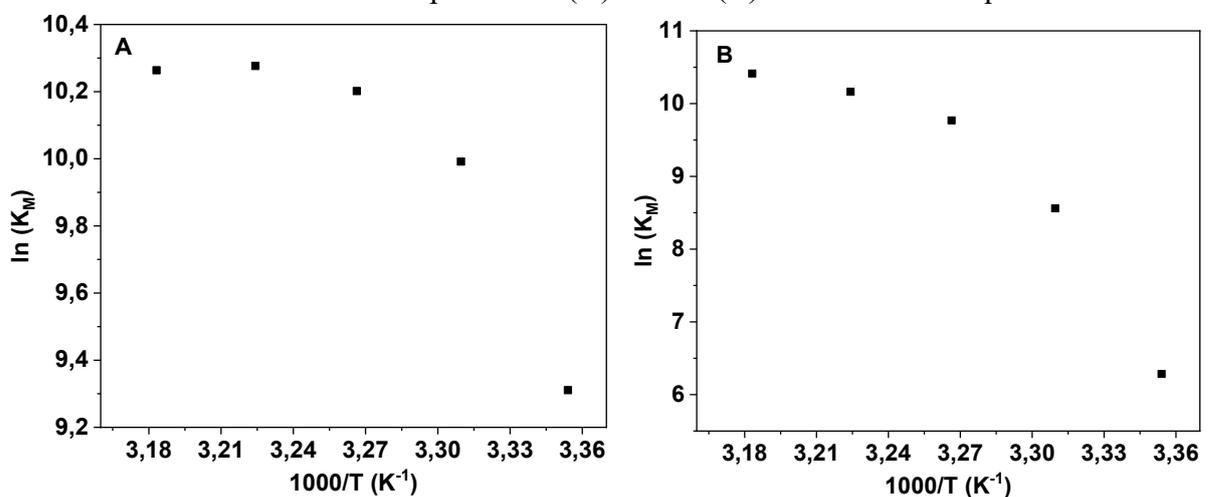
Um aumento de apenas 4 °C na temperatura (29 °C) foi suficiente para quase dobrar a solubilidade da CUR (5,1 µg mg<sup>-1</sup>) em P123, enquanto que para o F127 um aumento considerável da solubilidade da curcumina (1,9 µg mg<sup>-1</sup>) foi obtida apenas a 33 °C. Tal comportamento é resultante das mudanças estruturais que ocorrem nas micelas com o aumento da temperatura, principalmente próximas a TMC. A diferença de TMC do P123 e do F127 numa mesma concentração é de aproximadamente 10 °C, vide Tabela 4, o que condiz com os resultados obtidos da interação CUR-PLU. Enquanto que para temperaturas acima das supra

mencionadas variações de interação/solubilidade menores foram observadas, resultado de menores variações estruturais das micelas ocorrerem em temperaturas mais elevadas.<sup>58,94</sup>

Sabe-se que o aumento da temperatura de soluções contendo os copolímeros causa desidratação das cadeias poliméricas, aumentando a hidrofobicidade das cadeias de PEO e PPO. O aumento da hidrofobicidade e desidratação das cadeias leva a formação de micelas com um núcleo mais denso, ampliando a capacidade de solubilizar a CUR na forma monomérica. O efeito da temperatura também eleva a vibração térmica das cadeias poliméricas, aumentando a distância intermolecular entre as cadeias e, assim, o espaço disponível para solubilizar uma maior quantidade de curcumina por micela polimérica.<sup>58,94</sup> Entretanto a menor interação CUR–F127 em comparação com a interação CUR–P123 não deprecia a efetividade do sistema com F127 para o encapsulamento e liberação da CUR, isso porque existe uma competitividade entre a ligação e a liberação do composto pelos copolímeros.<sup>95</sup>

Dados termodinâmicos são importantes para avaliar quais parâmetros são dominantes na interação ativo-plurônico. Normalmente a equação de van't Hoff é empregada para calcular os parâmetros termodinâmicos de processos simples quando os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  não dependem da temperatura ( $\Delta H$  e  $\Delta S$  são constantes na faixa de temperatura utilizada). Entretanto, o processo associado a solubilização da CUR pelos PLUs é muito complexo devido ao processo de formação micelar dos plurônicos, que são altamente dependentes da temperatura.<sup>62,79</sup> Neste caso,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  variam com a temperatura, produzindo um comportamento não linear quando é construído o gráfico de  $\ln(K_M)$  versus  $1/T$  (Figura 20). Onde o coeficiente de partição molar micela-água ( $K_M$ ) é obtido a partir de  $\chi$  usando a Equação 7.

Figura 20 – Gráfico de van't Hoff ( $\ln(K_M)$  versus  $1/T$ ) para o processo de interação da curcumina com os copolímeros (A) P123 e (B) F127 em meio aquoso.

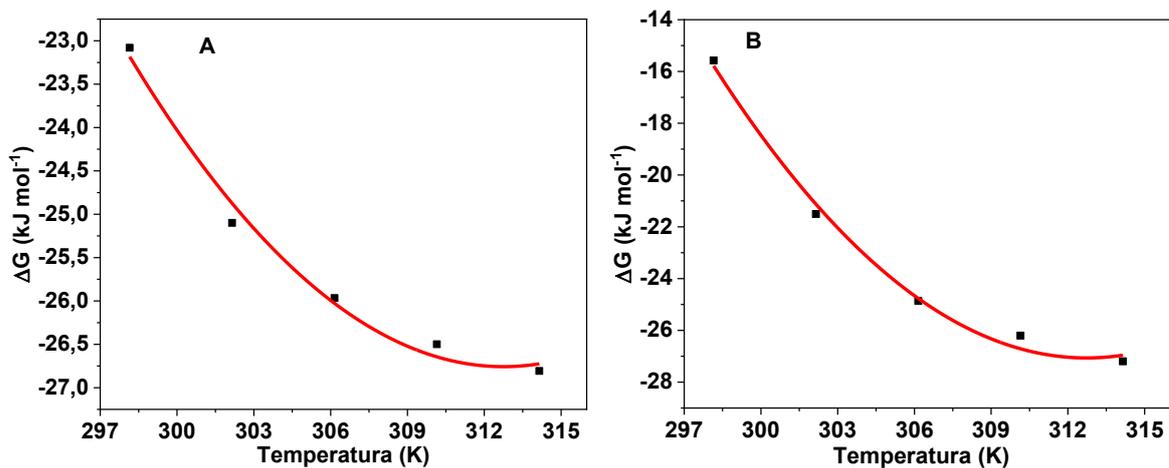


Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Desta maneira, os parâmetros termodinâmicos devem ser obtidos a partir de um método mais acurado de cálculo. Para processos que ocorrem com uma dependência não linear de  $\Delta G$  versus  $T$ , uma equação polinomial de segunda ordem (curva parabólica) consegue descrever melhor o comportamento termodinâmico de sistemas mais complexos como é o caso da interação CUR–PLU.<sup>78,79</sup>

Os valores de  $\Delta H$  em cada temperatura trabalhada pode ser calculada a partir dos coeficientes polinomiais  $a$  e  $c$  da Equação 10, obtidas pelo ajuste da curva aos dados experimentais do gráfico de  $\Delta G$  versus  $T$  (Figura 21), como descritos no item 2.2.5.

Figura 21 - Ajuste dos pontos experimentais de  $\Delta G$  em função de  $T$  relacionados a interação entre CUR e (A) P123 e (B) F127 em meio aquoso utilizando um polinômio de segunda ordem.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Como pode ser visto na Figura 21, a curva experimental ajustou-se significativamente aos pontos experimentais obtidos pelo polinômio de segunda ordem, fornecendo os valores dos coeficientes polinomiais para o P123 ( $a = 1613,9 \text{ J mol}^{-1}$ ;  $c = 0,0168 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-2}$ ) e F127 ( $a = 5163,23 \text{ J mol}^{-1}$ ;  $c = 0,05307 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-2}$ ). Substituindo esses valores na Equação 10, os valores de  $\Delta H$  relacionado ao processo de solubilização da CUR nos PLUs em cada temperatura foram obtidos, conforme mostrado na Tabela 6.<sup>78,79</sup> Os valores de  $\Delta S$  foram adquiridos empregando-se a Equação 11 (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficiente de partição molar micela-água ( $K_M$ ) e parâmetros termodinâmicos relacionados a interação da CUR com P123 e F127 em função da temperatura.

PLU	T (K)	T (°C)	$K_M$	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (J mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
P123	298,15	25,0	11.056,4	-23,08	123,14	23,20
	302,15	29,0	21.841,5	-25,10	82,87	25,18
	306,15	33,0	26.947,0	-26,00	42,06	26,01
	310,15	37,0	29.039,2	-26,50	0,72	26,50
	314,15	41,0	28.673,5	-26,81	-41,16	26,77
F127	298,15	25,0	535,8	-15,58	445,66	16,02
	302,15	29,0	5.222,4	-21,50	318,22	21,82
	306,15	33,0	17.472,9	-24,86	189,09	25,05
	310,15	37,0	25.888,3	-26,20	58,27	26,26
	314,15	41,0	33.294,69	-27,20	-74,26	27,12

Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

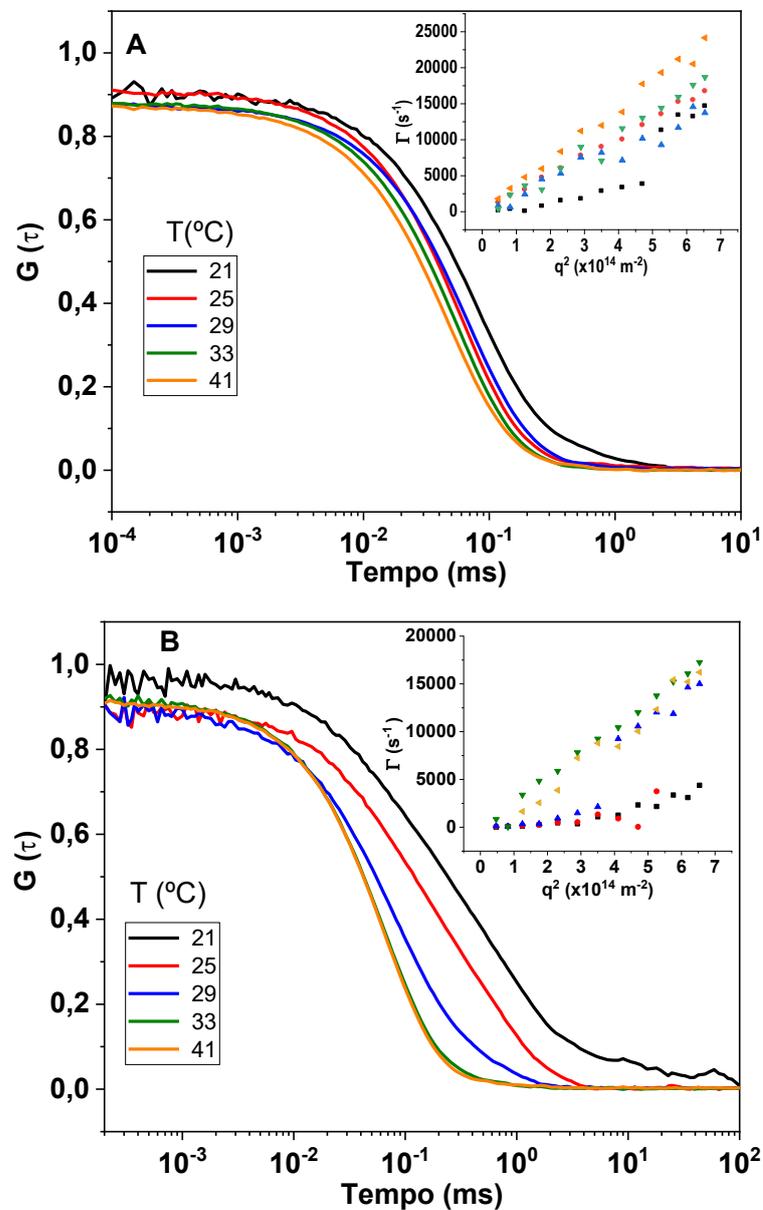
A incorporação da CUR nos copolímeros é um processo espontâneo em toda a faixa de temperatura trabalhada. O  $\Delta G$  de interação CUR-P123 permanece entre valores de -23,1 e -26,8 kJ mol<sup>-1</sup>, quando a temperatura aumenta de 25 para 41 °C. Enquanto que para a interação CUR-F127 o  $\Delta G$  exibe uma faixa maior de valores (-15,6 a -27,2 kJ mol<sup>-1</sup>) no mesmo intervalo de temperatura. Os resultados estão em concordância com os fatores de micelização discutidos acima.<sup>58</sup> É importante salientar que nas temperaturas de trabalho mais elevadas os valores de  $\Delta G$  tendem a se convergirem, ou seja, a energia associada ao processo de micelização/interação CUR-PLU se tornam próximas para P123 e F127.

De acordo com a Tabela 6 a interação CUR-PLU se torna menos endotérmica ( $\Delta H$  diminui) com o aumento da temperatura, inclusive tornando-se exotérmica à 41 °C em ambos os copolímeros. Já a entropia segue uma tendência oposta à entalpia: aumenta com o aumento da temperatura. A contribuição do termo entrópico ( $-T\Delta S$ ) para a espontaneidade da interação ( $\Delta G < 0$ ) prevalece em toda a faixa de temperatura empregada. Portanto, a energia requerida para o processo de incorporação da CUR no interior do microambiente micelar fornecido pelo núcleo se torna menor com o aumento da temperatura do sistema.<sup>96</sup>

### 3.6 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) DO SISTEMA PLU–CUR

Medidas de DLS de soluções de PLU ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contendo CUR ( $0,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram realizadas em diferentes temperaturas na faixa de 21 a  $41^\circ\text{C}$ . Nessas medidas, a intensidade normalizada da função de autocorrelação  $G(\tau)$  foi obtida em 13 ângulos de espalhamento em cada temperatura. As curvas de autocorrelação obtidas a  $90^\circ$  são mostradas na Figura 22.

Figura 22 - Curvas de autocorrelação  $G(\tau)$  das formulações de (A) P123 e (B) F127 ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contendo CUR ( $0,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como função da temperatura. No canto direito superior está o gráfico de  $\Gamma$  versus  $q^2$ .



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A Figura 22 mostra que ocorre um deslocamento nos tempos de decaimentos da função de correlação para tempos mais curtos com o aumento da temperatura para ambos os sistemas de copolímeros contendo CUR estudados. Além disso, nas temperaturas mais altas as curvas de  $G(\tau)$  tendem a se ajustar a uma função exponencial de primeira ordem, e como consequência,  $\Gamma$  tende a variar linearmente com  $q^2$  a temperaturas mais elevadas, indicando um movimento difusional quase esférico das micelas. A diminuição da temperatura para valores iguais ou abaixo de 25 °C para CUR–P123 e de 29 °C para CUR–F127, faz com que  $\Gamma$  deixe de variar linearmente com  $q^2$  e  $G(\tau)$  não tenha a tendência a se ajustar a uma equação exponencial de primeira ordem. Como mostrado por Basak e Bandyopadhyay (2013), isso estabelece indiretamente que a TMC dos PLUs estão na faixa de 21–25 °C para CUR–P123 e 25–29 °C para CUR–F127, indicando que em baixas temperaturas ocorre uma quebra ou dissociação das micelas copoliméricas em unímeros livres em solução ou de pequenos agregados interagindo fracamente com as moléculas de CUR.<sup>63</sup>

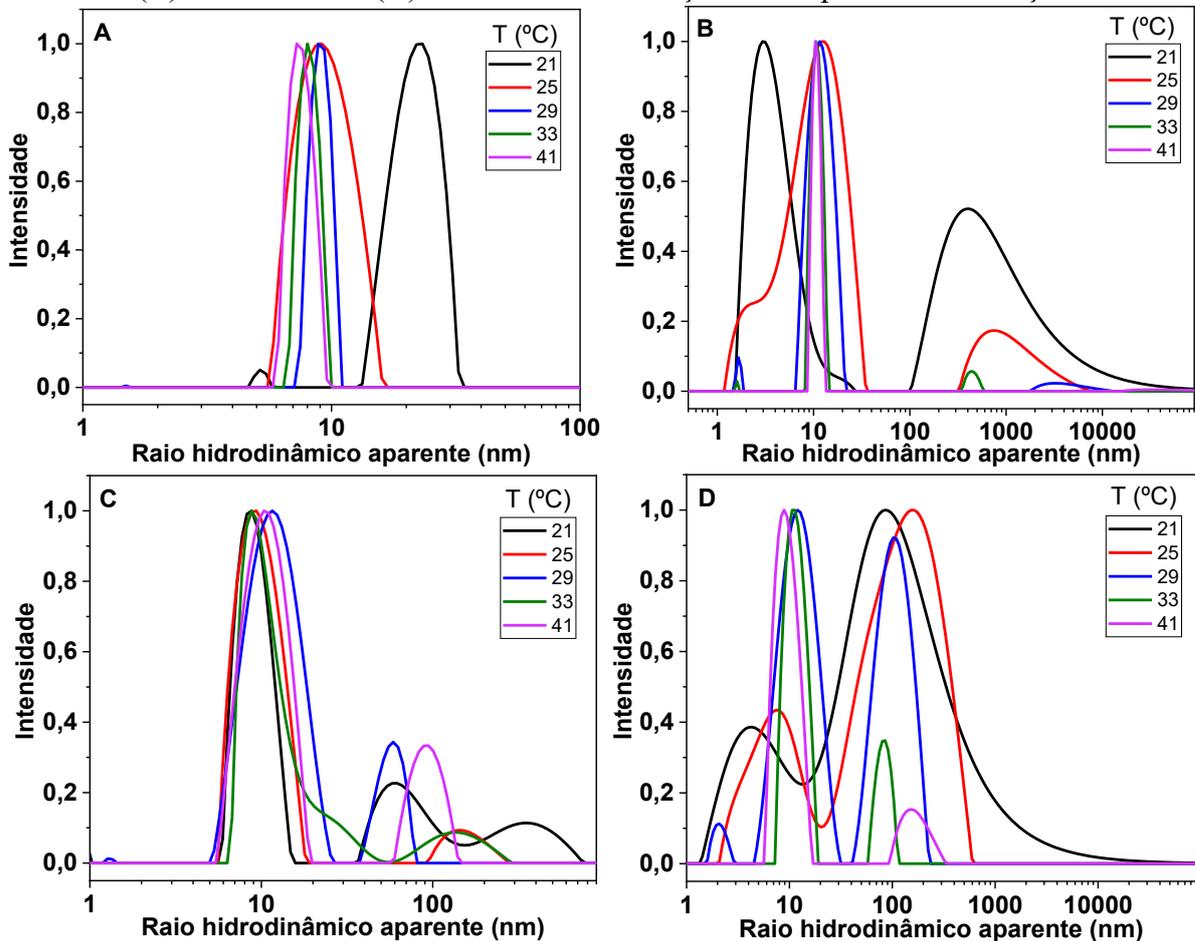
Como discutido na sessão anterior, a diferença de TMC entre os copolímeros surgem dos distintos tamanhos do bloco hidrofílico PEO e HBL dos plurônicos. O F127 possui cinco vezes mais unidades de repetição EO do que o P123, fornecendo uma micela maior e menos compacta em comparação com o P123.<sup>97</sup> Como efeito, o tamanho obtido através do coeficiente angular do gráfico de  $\Gamma$  vs  $q^2$  aplicada a Equação 13 diminui de 32 para 11 nm para o P123 e de 101 para 12 nm para o F127 quando a temperatura é aumentada de 21 para 33 °C.

Basak e Bandyopadhyay (2013) verificaram que quando compostos hidrofóbicos são incorporados em copolímeros, os valores de CMC e TMC dos plurônicos diminuem devido à presença dessas moléculas. Eles notaram que compostos hidrofóbicos atuam como uma espécie de nucleadores, fazendo com que a hidrofobicidade do núcleo formado por PPO também seja significativamente aumentada. De acordo com eles, isso favorece a agregação micelar em temperaturas mais baixas comparadas as apresentadas pelos copolímeros puros. Em contraste, o tamanho médio se torna maior, provavelmente devido ao aumento do espaço entre as cadeias PPO do núcleo micelar. Os autores também observaram que a redução dos valores de CMC e TMC estão intimamente relacionados com o coeficiente de partição dos compostos incorporados, onde um aumento do coeficiente de partição reduz tanto a CMC quanto a TMC dos copolímeros, e assim, favorecendo a formação das micelas a concentrações e temperaturas mais baixas.<sup>63</sup>

Entretanto, esse comportamento não foi observado para os sistemas descrito neste trabalho (Figura 22 e 23), isso pode estar associado a diferença de concentração de copolímeros e os solutos usados em cada estudo. Outra possibilidade é ser devido a mudança da TMC

causada pela presença da CUR ser muito pequena em relação as soluções de PLU puras, dificultado sua observação no *gap* de temperatura utilizado (4 °C).

Figura 23 - Variação do raio hidrodinâmico aparente ( $R_h$ ) dos sistemas (A) P123, (B) F127, (C) CUR–P123 e (D) CUR–F127 em função da temperatura da solução.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A Figura 23 mostra o raio hidrodinâmico aparente ( $R_h$ ) para os sistemas formados por P123, F127, CUR–P123 e CUR–F127 a diferentes temperaturas. Pode-se observar que mudanças relativamente pequenas ocorrem nos valores  $R_h$  para as amostras de P123 e F127 puras (sem a presença de CUR), devido ao aumento da temperatura da solução, principalmente acima da TMC. No entanto, quando a CUR é incorporada as formulações, drásticas mudanças nos  $R_h$  ocorrem, apresentando ao menos duas regiões distintas. As regiões com raio maior que 100 nm provavelmente consistem em agregados de CUR associados a unímeros ou *clusters* de copolímeros, uma vez que essas distribuições de tamanho são encontradas principalmente em baixas temperaturas. A outra região próxima a 10 e 20 nm está relacionada às micelas de CUR–PLU ou PLU (quando sem a presença de CUR na formulação), essa distribuição de

tamanho é observada predominantemente em temperaturas acima da TMC dos copolímeros. Uma terceira distribuição de tamanho aleatória às vezes pode ser percebida em algumas temperaturas para alguns dos sistemas estudados, estas podem estar associadas a presença de unímeros individuais na solução. Resultados similares foram observados por Raval *et al.* (2017)<sup>95</sup> e Ghosh *et al.* (2014).<sup>98</sup>

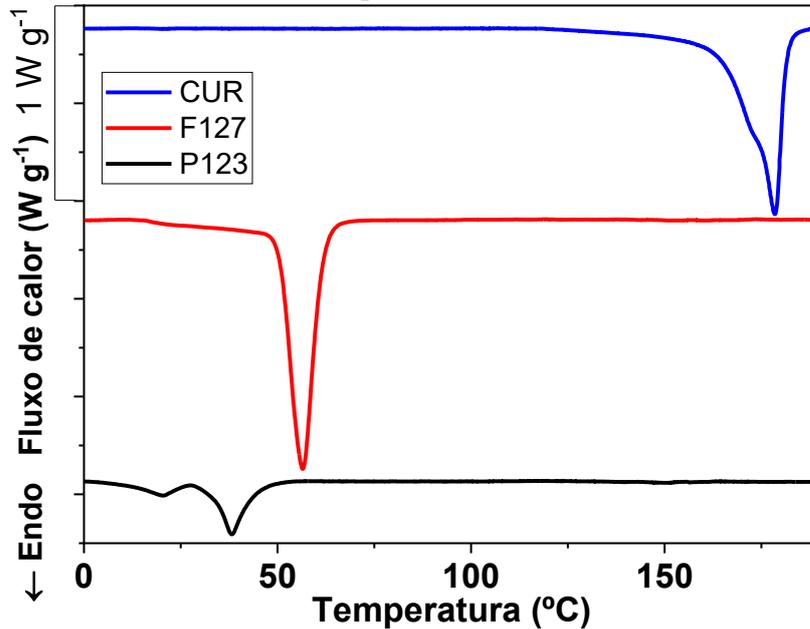
Adicionalmente, as polidispersidades de ambos os copolímeros aumentam substancialmente quando a temperatura é diminuída ou quando curcumina é incorporada no interior do núcleo micelar. Funções de distribuições mais largas indicam maior polidispersidade (Figura 23). Basak e Bandyopadhyay (2013) também observaram que a incorporação de compostos hidrofílicos formam micelas maiores e mais polidispersas, enquanto que solutos hidrofóbicos tendem a formar micelas menores e mais compactas.<sup>63</sup> A mesma tendência foi encontrada por Chat *et al.* (2018) em sua pesquisa envolvendo a incorporação de óleo de lavanda em micelas de P123.<sup>99</sup>

Apesar de quando solubilizados em sistemas aquosos, ou em meios que contenha uma fração considerável de água, como é o caso do exsudato, os copolímeros formarem micelas e encapsularem e protegerem as moléculas de CUR, o material de partida pretendido para a liberação desses sistemas são membranas sólidas.<sup>95</sup> Assim, o estudo da interação da CUR com o P123 e o F127 no estado sólido também se mostra de grande importância.

### 3.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA DO SISTEMA PLU–CUR

O estudo da interação da CUR com os copolímeros no estado sólido foi realizado por calorimetria diferencial de varredura (DSC). Inicialmente avaliou-se os componentes puros e posteriormente a mistura da CUR com os PLU em diferentes proporções mássicas a fim de encontrar se existe uma proporção ótima de mistura entre os componentes no estado sólido. A Figura 24 exhibe as curvas de DSC para os componentes puros.

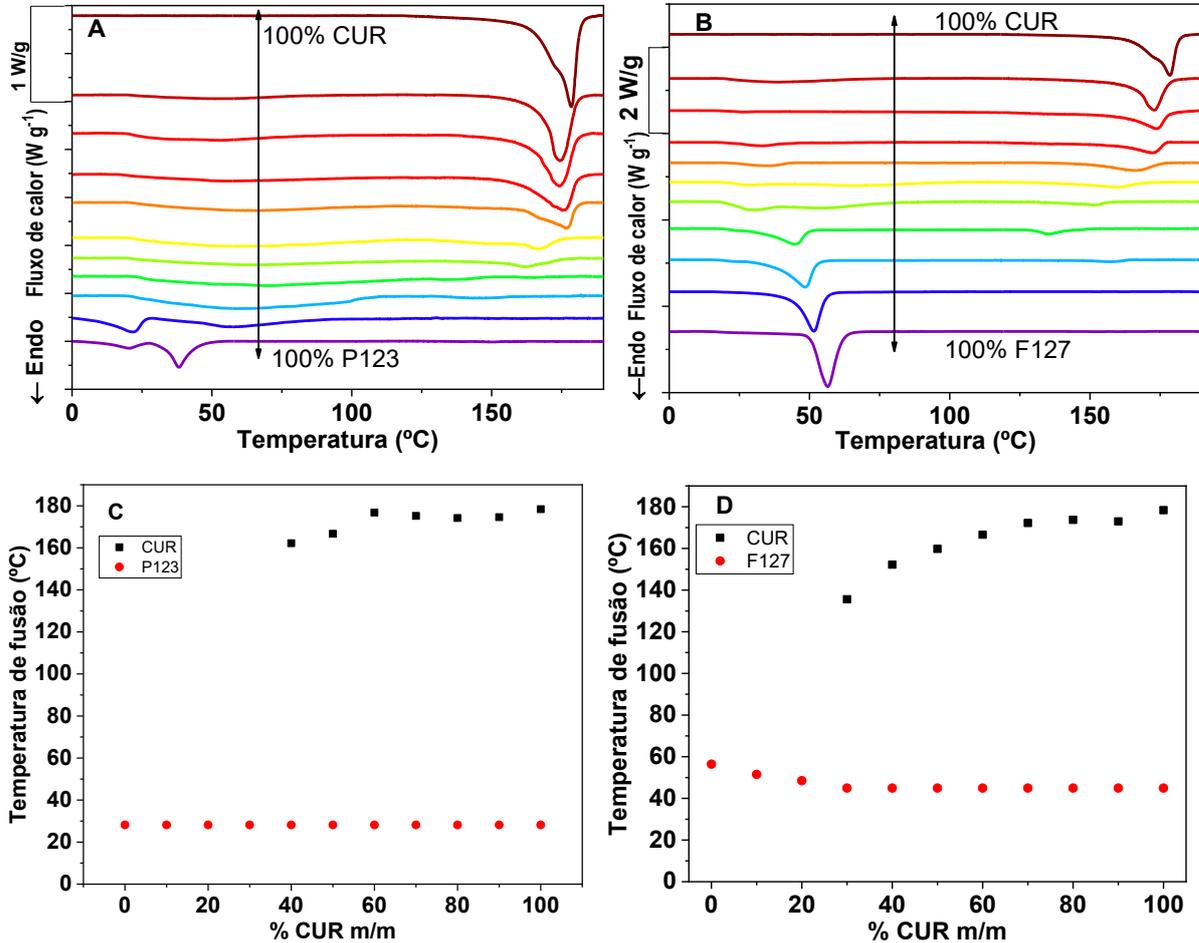
Figura 24 - Curvas de DSC da CUR, P123 e F127 puros realizados a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 0 a 190 °C.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

As curvas de DSC da CUR e do F127 puros exibem apenas um evento endotérmico estreito ( $\Delta_{\text{fus}}H = 131,0$  e  $108,3 \text{ J g}^{-1}$ , respectivamente) correspondentes aos pontos de fusão a  $178,4$  e  $56,4$  °C, respectivamente. O plurônico P123 apresenta dois picos endotérmicos largos e pequenos entre  $0$  e  $56,0$  °C com uma entalpia total de  $29,7 \text{ J g}^{-1}$  em que o pico principal ocorre a  $38,2$  °C, indicando que esse copolímero deve possuir duas fases cristalinas distintas.<sup>82,100</sup> Confirmando que nessas condições os componentes são estáveis e não se decompõem. A Figura 25 mostra as curvas de DSC de várias proporções mássicas de CUR–PLU e a variação da temperatura de fusão dos componentes em função do aumento da massa de CUR no sistema.

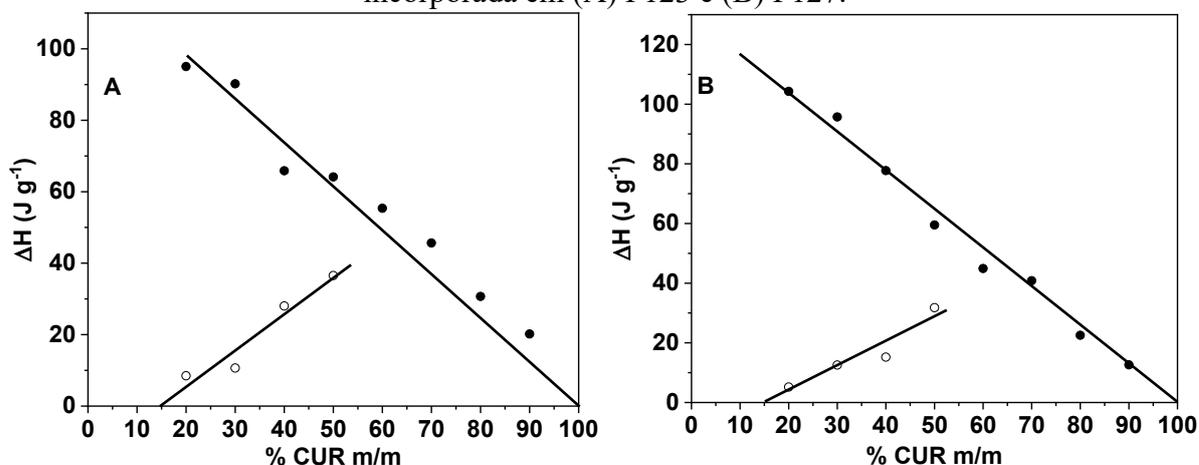
Figura 25 - Curvas de DSC dos plurônicos (A) P123 e (B) F127 com o aumento da quantidade de CUR (%m/m) na dispersão sólida. (C) e (D) apresentam a variação da temperatura de fusão dos componentes nos sistemas CUR–P123 e CUR–F127, respectivamente.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A temperatura de fusão de todos os componentes puros (CUR: 178,4; F127: 56,4 e P123: 38,2 °C) diminuíram com a formação da mistura pela dispersão sólida, como mostrado na Figura 25(C e D). Esse comportamento indica que um componente interfere significativamente na estrutura cristalina do outro através de interações fracas (Van der Waals) em arranjos organizados não aleatórios com maior entropia.<sup>101</sup> Os valores da entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) obtidos pela área dos picos de fusão da curcumina e dos plurônicos são mostrados na Figura 26.

Figura 26 - Diagrama de triângulo de Tamman mostrando a entalpia de fusão dos plurônicos (círculos fechados) e da curcumina (círculos abertos) *versus* a porcentagem em massa da CUR incorporada em (A) P123 e (B) F127.



De acordo com a Figura 26, o efeito térmico ( $\Delta H$ ) de fusão dos plurônicos tende a zero para a composição correspondente a CUR pura. Isso está de acordo, uma vez que é a presença de copolímero que proporciona amorfização da CUR. Os valores de  $\Delta H$  de fusão dos PLUs (círculos fechados) aumenta linearmente com o aumento da quantidade de P123 e/ou F127 no sistema. Desta forma, a solubilidade máxima da CUR é determinada pela extrapolação da entalpia de fusão deste componente (círculos abertos) em função da sua composição mássica.<sup>82</sup> A solubilidade da CUR em estado sólido foi de 15,2 e 14,4 % m/m em P123 e F127, respectivamente.

Karolewicz *et al.* (2017) encontraram resultados similares quando avaliaram a interação entre imatinibe (IMA) e F127 preparados pelo método da dispersão sólida. Eles estabeleceram que solubilidade máxima do composto no plurônico foi de 2,3%.<sup>82</sup>

A fim de avaliar quais grupos funcionais são responsáveis pela interação da CUR com os PLUs, foram realizadas medidas de FTIR das amostras de CUR/PLU nas razões mássicas de: 25/75, 50/50 e 75/50. Porém nenhum deslocamento conclusivo do número de onda relativo às bandas características dos grupos hidroxil e diceto/ceto-enólico ( $3700-3000\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) da CUR pôde ser observado. Medidas de FTIR são boas para verificar mudanças de grupos funcionais na estrutura de compostos quando ocorre adição ou eliminação de grupos característicos, mas é relativamente inadequada para avaliar interações fracas como interações polímero-curcumina. Entretanto, como visto acima, devido as mudanças das temperaturas e entalpias de fusão obtidas nos estudos de DSC, a interação entre CUR e os copolímeros no estado sólido realmente ocorrem.<sup>102,103</sup>

#### 4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo investigou-se as propriedades espectroscópicas da CUR em solventes orgânicos e solução aquosa. Em água avaliou-se o processo de autoagregação em dímeros da CUR assim como o equilíbrio diceto/ceto-enólico deste composto e como a temperatura influencia nesses processos. No intuito de aumentar a solubilidade do ativo, explorou-se a interação da CUR com os copolímeros micelares P123 e F127 em solução aquosa e o efeito da temperatura nesses fatores. Por fim, obteve-se resultados acerca do comportamento térmico de misturas entre CUR e os PLUs por DSC no intuito de encontrar uma proporção ideal dos componentes no estado sólido.

A CUR exibe espectro de absorção e emissão similares para solventes orgânicos próticos e apróticos, no entanto sua fluorescência é completamente extinta devido aos processos de supressão pela água e agregação da CUR em dímeros do tipo H. O espectro de absorção do composto neste solvente apresenta duas bandas, uma de maior intensidade que está associado a espécie ceto-enol e outra de menor intensidade e comprimento de onda referente a espécie diceto da curcumina. O equilíbrio entre essas espécies é afetado pela temperatura, onde o aumento deste parâmetro desloca o equilíbrio para a espécie 1,3 diceto, aumentando também a velocidade com que o processo ocorre.

A interação da CUR com os PLUs foi avaliada por método fluorimétrico, demonstrando que a solubilidade do princípio ativo no P123 e no F127 aumentam com o aumento da temperatura no sistema. O  $\Delta G$  de interação dos componentes variou de  $-15,6$  a  $-27,2$  kJ mol<sup>-1</sup>. Tanto a solubilidade da CUR quanto o  $\Delta G$  de interação dela com os plurônicos são resultados da diferença de CMC, TMC e razão PEO/PPO dos copolímeros e dependem da temperatura.

Medidas de DLS mostraram um aumento do  $R_h$  e polidispersidade com a inserção da CUR hidrofóbica na formulação.

A diminuição da temperatura de fusão ocorreu tanto para a CUR quanto para ambos os copolímeros, indicando que um componente interfere significativamente na estrutura cristalina do outro por meio de interações fracas. A solubilidade máxima da CUR no estado sólido para ambos os PLUs é de aproximadamente 15% m/m para ambos os sistemas CUR–F127 e CUR–P123.

Os estudos conduzidos até aqui serviram de base para o desenvolvimento do próximo capítulo, que está centrado no desenvolvimento das membranas QTS/PLUs contendo CUR para aplicação em feridas cutâneas.

# **CAPÍTULO III**

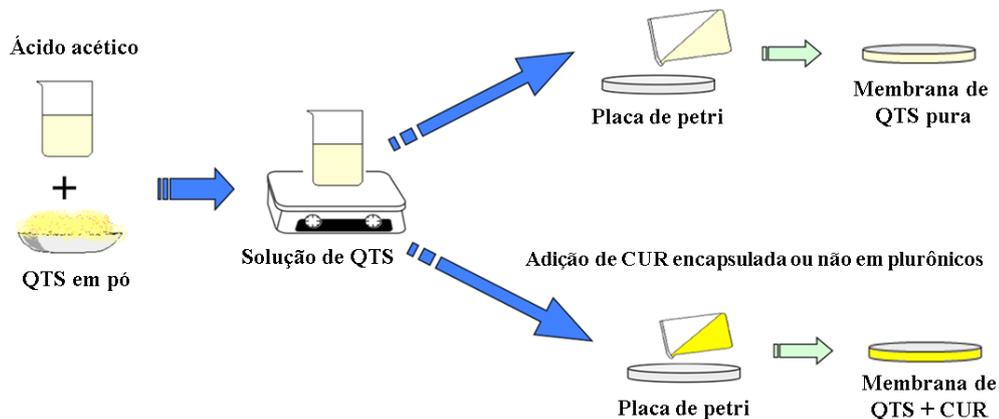
**Desenvolvimento e caracterização das membranas  
de quitosana/plurônico contendo curcumina**

## 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Muitos métodos foram desenvolvidos para preparar formulações de quitosana, incluindo emulsão, secagem por pulverização, técnica de coalescência de gotículas emulsificadas, gelificação iônica, dentre outras. Para formar partículas de diferentes formas: microesferas, tabletes, nanopartículas, fibras, filmes, hidrogéis, esponjas, etc.<sup>18,22</sup> Esse polissacarídeo exibe excelente capacidade de formação de membrana e encontra muitas aplicações como dispositivo para administração de ativos, sendo aplicados na mucosa oral, entrega bucal, transdérmica, sublingual e periodontal, fornecendo uma proteção externa ao ativo, melhorando a estabilidade do ativo em ambientes complexos.<sup>18,22</sup>

Diferentes técnicas de processamento podem ser aplicadas para produzir membranas de QTS, tais como: secagem de solvente, moldagem com o polímero fundido, utilização de não solvente, dentre outras. A técnica de secagem de solvente (Figura 27) é a mais fácil experimentalmente, uma vez que não há a necessidade de utilização de temperaturas elevadas e nem de solventes secundários. Membranas a base de quitosana possuem uma ampla gama de aplicações biomédicas, como entrega controlada de medicamentos, curativos para feridas e enxertos vasculares.<sup>18,22,104</sup>

Figura 27 - Esquema de preparação de membranas a base de quitosana por secagem de solvente (*casting*).



Fonte: figura elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

Em relação a utilização da quitosana como material curativo de feridas e queimaduras, tem-se mostrado que, durante as fases iniciais de cicatrização, a QTS atua como componente hemostático e promove a infiltração e migração de neutrófilos e macrófagos em direção aos tecidos epiteliais. Estudos indicam que a QTS, principalmente a de alta massa molar, promove a proliferação de células queratinócitos. Estudos *in vitro* demonstram que esse polímero não exerce citotoxicidade quando testada com fibroblastos dérmicos, resultados *in vivo* também

indicam que QTS não apresenta toxicidade aguda significativa.<sup>105</sup> Além disso, relata-se que esse polissacarídeo estimula a secreção de interleucina 8 (IL-8) dos fibroblastos, resultando em angiogênese e migração de neutrófilos, quando testada em cachorros. Verificou-se também ausência de efeitos pirogênicos (febre, calafrios, etc.) e irritação da pele causada pela QTS aplicada em camundongos. Assim como a curcumina, a QTS aumenta a expressão de fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ 1) e produção de colágeno na fase pós-lesão inicial.<sup>14</sup>

O cerne do presente capítulo reside no desenvolvimento (por secagem de solvente) e caracterização de membranas à base de quitosana/plurônico contendo curcumina para aplicação cutânea. As amostras produzidas foram caracterizadas por diferentes técnicas microscópicas, analisou-se também o grau de intumescimento, ângulo de contato e permeabilidade ao vapor de água das membranas. As características físico-químicas foram obtidas por infravermelho, análise termogravimétrica, calorimetria diferencial de varredura e ensaios mecânicos. Avaliou-se a taxa de liberação *in vitro* da CUR contida nas membranas e a permeação *ex vivo* do composto em pele humana. Por fim, investigou-se os valores de concentração inibitória mínima das amostras contra cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa pelo método da microdiluição.

## 2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS

Quitosana de média massa molar (Lote #STBG8451) (com grau de desacetilação 87% calculado de acordo com Brugnerotto *et al.*, (2001) e massa molar viscosimétrica  $M_v = 10,6 \times 10^4$  calculada de acordo com Tanasale *et al.* (2019)),<sup>106,107</sup> curcumina (contendo > 65% de curcumina e < 35% de demetóxi e bisdemetóxi-curcumina), Pluronic P123 ( $M_n = 5.750 \text{ g mol}^{-1}$ ), F127 ( $M_n = 12.600 \text{ g mol}^{-1}$ ), Tween 80, dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, ácido acético (HAc), etanol e propileno glicol (PG) foram comprados da NEON. Meio de congelamento de tecidos (TissueTec) foi obtido da Leica. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), obtidas da Microbiologics®. Todos os reagentes foram usados sem purificação prévia. Água deionizada foi utilizada em todos os ensaios.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Preparo das membranas a base de quitosana

##### 2.2.1.1 Preparo das membranas de QTS pura

As membranas de quitosana foram preparadas usando a técnica de secagem de solvente, também conhecida como *casting*. Preparou-se uma solução padrão viscosa de quitosana (2,0% m/V) em ácido acético (1,0% V/V) sob agitação mecânica com rotação de 600 rpm durante 24 h, parâmetros definidos a partir de revisão.<sup>108</sup> A solução resultante foi filtrada em peneira metálica com 170 *mesh* e abertura de 90  $\mu\text{m}$  com auxílio de bomba de vácuo, essa etapa foi realizada para extrair a quitina residual não solubilizada pela solução ácida.

A solução foi vertida em placa de petri de poliestireno e deixada em repouso em superfície plana para que a secagem do solvente fosse realizada de forma uniforme, à temperatura ambiente e sem o auxílio de exaustão.

##### 2.2.1.2 Preparo das membranas contendo CUR e PLU

A partir da solução descrita no item anterior, preparou-se seis membranas com diferentes formulações: QTS pura, QTS–F127, QTS–P123, QTS–CUR, QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR. As membranas constituídas de QTS–CUR, QTS–F127 e QTS–P123 foram preparadas na razão mássica de 90:10, enquanto aquelas de composição QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR foram preparadas na proporção 80:10:10. Todas as amostras foram submetidas a aquecimento a 50 °C e agitação magnética vigorosa e constante

durante 24 h para garantir dispersão uniforme e homogênea das soluções filmogênicas. As soluções foram vertidas em placas de petri e deixadas em repouso para secagem do solvente. Por fim, as amostras foram condicionadas em estufa para posterior caracterização e aplicação. Em todas as etapas de preparo e armazenamento as amostras foram protegidas da luz. A Tabela 7 descreve a proporção de cada formulação.

As condições de trabalho descritas acima foram definidas a partir de diferentes metodologias para a preparação das soluções filmogênicas e da secagem do solvente e verificadas por via visual. Dentre as variáveis podemos destacar o método de adição da CUR e dos copolímeros (adição direta e pré dissolvidos em acetona), dissolução conduzida com e sem aquecimento, variando-se o tempo de agitação (2, 6, 12 e 24 h) por meio de agitação magnética. Por fim avaliou-se a influência da utilização ou não de fluxo de ar (capela de exaustão) durante o processo de secagem das soluções nas placas de petri. A melhor condição escolhida foi aquela que apresentou maior homogeneidade da solução e nenhum cristal visível. O aquecimento auxiliou no aumento de solubilidade da CUR e velocidade de solubilização dos copolímeros.

Tabela 7 - Proporção de cada constituinte utilizado no preparo das membranas.

Formulações	QTS (% m/m)	PLU (% m/m)	CUR (% m/m)
QTS	100	–	–
QTS–F127	90	10	–
QTS–P123	90	10	–
QTS–CUR	90	–	10
QTS–F127–CUR	80	10	10
QTS–P123–CUR	80	10	10

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

As membranas obtidas a partir da Tabela 7 foram caracterizadas como se segue:

### 2.2.2 Microscopia óptica de luz polarizada (PLOM)

A microscopia óptica de luz polarizada é um ensaio para rápida observação de domínios cristalinos nos materiais produzidos, as diferenças dos domínios cristalinos são observadas a partir da presença ou ausência de partículas luminosas causadas por birrefringência (diferentes índices de refração para diferentes direções de propagação da luz). Esse ensaio foi realizado depositando um pedaço de cada amostra no suporte de um microscópio ótico da marca Motic Microscopes, modelo SMZ-168-BL contendo uma lente polarizadora acoplada a um sistema de aquisição TCS pro500 e software VMS 3.6. A ampliação foi escolhida e a imagem capturada por fotografia digital.<sup>109</sup>

### 2.2.3 Espectrofotometria de ultravioleta-visível das membranas

As análises de espectrofotometria UV-Vis foram realizadas para averiguar o comportamento espectral das membranas com e sem a presença da curcumina e dos plurônicos. As leituras foram realizadas diretamente nas membranas, com auxílio de um equipamento UV-Vis da marca Kasuabi B-500 com fibra ótica, na faixa de comprimento de onda de 200–650 nm com 1 nm de intervalo de leitura. É importante frisar que a concentração da curcumina presente na membrana não pôde ser determinada por essa técnica, uma vez que as membranas não possuem a mesma espessura em toda sua extensão, podendo variar ainda de amostra para amostra.

### 2.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das membranas

Os espectros de infravermelho (FTIR) foram realizados em um equipamento da marca Shimadzu modelo IR-PRESTIGE 21 na faixa de número de onda de 4000–750  $\text{cm}^{-1}$  em modo absorvância com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 25 acumulações. Os componentes puros foram misturados em KBr, macerados em gral de ágata e, com uso de uma prensa hidráulica, preparados na forma de discos para análise. As membranas de quitosana pura e das formulações foram analisadas através da técnica de refletância total atenuada (ATR–FTIR) usando ZnSe como material óptico. Ambos os lados das membranas foram examinados.<sup>110</sup>

### 2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A perda de massa dos componentes puros e das membranas produzidas foram analisadas por termogravimetria usando um TGA da marca Shimadzu modelo TA-50. Aproximadamente 10–15 mg de cada amostra foi colocada em um cadinho de platina e aquecida da temperatura ambiente até 600 °C a uma taxa de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  sob fluxo dinâmico de nitrogênio de 50  $\text{mL min}^{-1}$ .<sup>111</sup>

### 2.2.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram conduzidas usando um calorímetro Shimadzu modelo DSC-50 sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de 50  $\text{mL min}^{-1}$ . Entre 5–10 mg dos componentes puros, exceto para a QTS, foram colocados em cadinhos de alumínio, refrigerados até –30 °C e então submetidas a aquecimento a uma taxa de 5 °C  $\text{min}^{-1}$  até 220 °C. As amostras contendo QTS foram submetidas a duas corridas. A primeira foi realizada a uma taxa de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  partindo-se da temperatura ambiente e aquecendo até

145 °C e mantido isotérmico na temperatura final por 15 min a fim de remover a água residual e apagar a história térmica. Após a primeira corrida, o cadinho foi submerso em nitrogênio líquido e resfriado a -30 °C, em seguida foi novamente aquecido conforme procedimento descrito para os componentes puros.<sup>111</sup>

### 2.2.7 Ensaios de tração *versus* deformação para as membranas a base de quitosana

Para a determinação das propriedades mecânicas das membranas utilizou-se uma máquina universal de ensaio (EMIC, modelo DL2000) em modo de tração com a célula de carga TRD21 com capacidade máxima de 50 kgf, segundo norma ASTM D882 (2002).<sup>112</sup> Os corpos de prova ficaram fixos entre duas garras móveis, inicialmente a uma distância de 50 mm e a velocidade de afastamento das garras constante em 12,5 mm min<sup>-1</sup>.

As membranas obtidas por secagem de solvente foram cortadas em corpos de prova retangulares com 90 mm de comprimento, 12,3 mm de largura e a espessura medida em três pontos a fim de se tomar a média. Os corpos de prova foram então condicionados em uma câmara com umidade relativa controlada de 58 ± 5% (solução saturada de brometo de sódio) por, 40 h antes da realização dos ensaios. Os ensaios foram realizados com ao menos 5 corpos de prova de cada amostra.

A resistência a tração (T) e a porcentagem de alongação (E%) foram calculadas pelas Equações 14 e 15, respectivamente.

$$T = \frac{F_m}{A} \quad (14)$$

em que T é a tensão obtida quando as amostras são expostas à tração (MPa), F<sub>m</sub> corresponde a força máxima no momento da ruptura da membrana (N) e A é a área da secção transversal da membrana (m<sup>2</sup>).

$$E\% = \frac{d_r - d_{inicial}}{d_{inicial}} \times 100 \quad (15)$$

onde, E% é a alongação (%), d<sub>r</sub> a distância no momento da ruptura (mm) e d<sub>inicial</sub> é a distância inicial de separação das garras (50 mm).<sup>112</sup>

### 2.2.8 Grau de intumescimento das membranas a base de quitosana (%GI)

O comportamento de ganho de massa por intumescimento das membranas foi estudado adicionando um recorte pré-pesado de  $2,5 \times 2,5$  cm das diferentes membranas em 25 mL de soluções tampão fosfato com pH 5,5 e 9,0, a temperatura ( $37,0 \pm 0,5$  °C) e agitação foram controlados com banho Dubnof (QUIMIS). As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, secas superficialmente com papel absorvente para remoção da água extra superficial, pesada com precisão em balança analítica e depois colocada novamente na solução. O tempo total de análise foi de 24 h e o intervalo entre as medidas foi de 15 min durante as 2 primeiras horas e a cada 1 h após esse período. Medindo-se, assim, o ganho de massa em função do tempo pela Equação 16. O procedimento descrito foi realizado em triplicata.<sup>113</sup>

$$\%GI = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (16)$$

onde, GI é o grau de intumescimento,  $W_0$  refere-se a massa inicial da amostra e  $W_t$  a massa da amostra no tempo t.

### 2.2.9 Microscopia eletrônica de varredura das membranas a base de quitosana

As análises morfológicas das membranas foram obtidas antes e após o ensaio de intumescimento por meio de um microscópio eletrônico (SEM) da marca JEOL, modelo JSM-6390LV aplicando uma voltagem de aceleração de 10 kV. Devido à baixa condutividade elétrica das membranas produzidas, as amostras foram recobertas com uma camada delgada de ouro utilizando um aparelho metalizador. As amostras secas recobertas foram submetidas ao SEM sem preparo anterior além do recobrimento. As amostras após intumescidas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para manter as características do material inchado o mais íntegro possível.<sup>110</sup>

### 2.2.10 Propriedade superficial por ângulo de contato das membranas a base de quitosana

A determinação do ângulo das membranas foi realizada aplicando uma gota ( $\sim 3$   $\mu$ L) de água com auxílio de uma seringa em cima da superfície do material, a câmera do goniômetro (Ramé-Hart Inst. Co – 250-F1) captou a imagem e o software (DropImage versão 3.54) analisou automaticamente o ângulo de contato que a gota apresenta. Foram realizadas 10 medidas a cada 1 segundo de exposição.<sup>110</sup>

### 2.2.11 Permeabilidade ao vapor de água das membranas a base de quitosana

A permeabilidade ao vapor de água ( $K_w$ ) das membranas a base de quitosana foram determinadas em células de difusão específicas utilizando-se um gradiente de umidade relativa de 2% (sílica) e 75% (solução saturada de NaCl) de acordo com a norma ASTM E96-00 (2000).<sup>114</sup> O estudo foi realizado em triplicata.

As membranas foram cortadas em moldes circulares de 0,005 m<sup>2</sup>, medindo-se em 5 pontos diferentes a espessura das membranas com auxílio de um micrômetro digital e tomado a média aritmética. Em seguida, as amostras foram colocadas em cápsulas de teflon com gradiente de umidade relativa descrita acima.

A passagem de vapor de água através da área da membrana foi medida pelo ganho de massa da cápsula em função do tempo, durante 24 h, sendo a permeabilidade determinada pela Equação 17. Onde  $W = G/t$  (m<sub>água</sub>/horas), sendo calculado pela regressão linear através dos dados de ganho de massa da célula de difusão em função do tempo em estado estacionário;  $\delta$  é a espessura média das membranas analisados (mm) determinadas com auxílio de um micrômetro;  $A$  a área de permeação (0,005 m<sup>2</sup>);  $p_s$  = pressão de saturação do vapor de água à temperatura do ensaio, 25 °C (3167 kPa);  $\alpha_{w1}$  corresponde a umidade relativa dentro da cuba e  $\alpha_{w2}$  é a umidade relativa dentro da célula de difusão.

$$K_w = \frac{W \cdot \delta}{A \cdot p_s \cdot (\alpha_{w1} - \alpha_{w2})} \quad (17)$$

### 2.2.12 Quantificação da CUR pela técnica de espectroscopia de fluorescência

As concentrações da CUR nas amostras foram determinadas via espectroscopia de fluorescência utilizando o fluorímetro Hitachi F-4500, tendo por base os estudos de Mazzarino *et al.* (2010), com algumas modificações.<sup>115</sup> Ambas as fendas de excitação e emissão foram ajustadas em 10 nm de abertura para todas as análises. Os comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) característicos para a quantificação da CUR foram: 425, 426, 416 e 430 nm quando em Tween 80 (1,0% m/V), SDS (1,0% m/V), acetonitrila (ACN) e mistura H<sub>2</sub>O/EtOH (70/30 V/V), respectivamente. Esses comprimentos de onda estão associados ao  $\lambda_{abs}$  máxima da CUR nos solventes descritos. As leituras dos espectros de emissão foram realizadas na faixa de  $\lambda_{exc} + 20$  nm a 700 nm para cada meio. A quantificação da CUR foi determinada a partir de curva de calibração previamente obtida no intervalo de 2,5 a 119,0 ng mL<sup>-1</sup> no comprimento de onda de máxima intensidade de emissão para todos os sistemas.

### 2.2.13 Teste de uniformidade de conteúdo das membranas a base de QTS contendo CUR

Neste estudo, uma membrana inteira (~1 g) de cada formulação foi cortada em 4 partes, pesada e adicionada em 50,0 mL de solução de ácido acético (1,0 mol L<sup>-1</sup>) para total dissolução da membrana. Após isso, 200 µL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e completado com acetona. A medida da intensidade de emissão da CUR relaciona-se com a concentração, e assim, pode-se estimar se há uma distribuição uniforme da curcumina nas membranas de quitosana.<sup>116</sup>

### 2.2.14 Liberação *in vitro* da CUR a partir das membranas a base de quitosana

A liberação cumulativa *in vitro* da CUR a partir das diferentes membranas preparadas foi realizada em tampão fosfato (PBS) com pH simulado de pele (5,5), com adição de 1,0% m/V de Tween 80 ou dodecil sulfato de sódio (SDS) a fim de manter a condição *sink* do meio de dissolução. Uma amostra circular com diâmetro de 2,5 cm de cada formulação de membrana foi colocada em um Erlenmeyer contendo 25,0 mL da solução tampão termostaticada a 37,0 ± 0,5 °C em banho Dubnoff e mantida sob agitação constante. Alíquotas de 500 µL foram retiradas da solução em tempos pré-determinados, transferidos para tubos contendo 2,0 mL do meio de liberação (branco) e quantificadas por fluorescência. Para cada alíquota retirada do Erlenmeyer, um volume igual de meio de liberação foi repostado ao frasco, sendo realizado cálculo do fator de diluição durante a determinação da concentração da CUR durante o experimento de liberação. Esses experimentos foram realizados durante o período de 3 semanas e em triplicata. Os pontos experimentais foram ajustados aos seguintes modelos cinéticos: ordem zero (Equação 18), primeira ordem (Equação 19), Higuchi (Equação 20), Korsmeyer-Peppas (Equação 21) e Peppas-Sahlin (Equação 22), usando o programa Excel contendo o suplemento DDSolver.

$$F = k_0 \cdot t \quad (18)$$

$$F = F_{max}(1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (19)$$

$$F = k_H \cdot t^{0.5} \quad (20)$$

$$F = k_{KP} \cdot t^n \quad (21)$$

$$F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m} \quad (22)$$

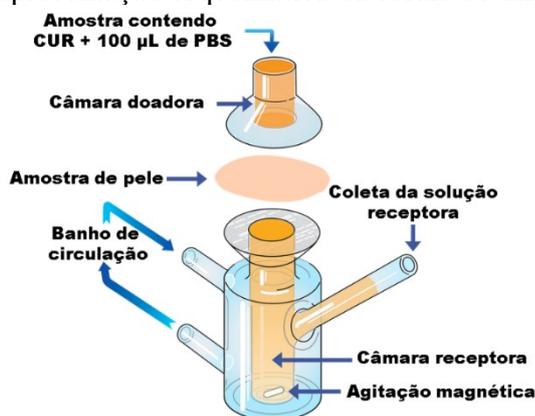
onde  $F$  é a fração do composto liberado no tempo  $t$ ;  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_H$  e  $k_{KP}$  são as constantes de liberação de cada modelo cinético;  $F_{max}$  está relacionado à fração máxima liberada e os expoentes  $n$  e  $m$  são parâmetros relacionados com o mecanismo de liberação proposto por Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, respectivamente.

### 2.2.15 Permeação *ex vivo* da CUR a partir das diferentes membranas de quitosana

Os estudos de permeação *ex vivo* foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Farmácia da UFSC.

Pele abdominal humana (espessura total), obtida de um hospital de Florianópolis por doação espontânea e anônima de pacientes durante casos de cirurgia abdominal, foi empregada para os ensaios de permeação *ex vivo* da CUR a partir das membranas formuladas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (número CAE: 87349418.7.0000.0121). As amostras de pele foram colocadas entre as duas câmaras de vidro da célula de difusão de Franz (Figura 28). Solução tampão PBS de pH igual a 7,4 contendo 30% V/V de etanol foi utilizada como fluido receptor a fim de manter a condição *sink* durante o experimento. 1,0 mL de solução de CUR ( $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em propileno glicol (PG) recém preparada foi usada como controle positivo.<sup>117</sup> A solução controle e as membranas a base de quitosana (em um lado específico) foram acomodadas em cima do estrato córneo da pele em cada câmara doadora. 100  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão de PBS foi depositada na superfície de cada amostra a fim de pré intumescer as membranas. Em intervalos fixos de 1 h durante 7 h, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram retiradas da câmara receptora, sendo repostas com solução do meio acceptor e quantificada por técnica fluorimétrica utilizando uma curva de calibração como descrito no item 2.2.12 deste capítulo.<sup>117,118</sup>

Figura 28 - Representação esquemática da célula de difusão de Franz.



Fonte: figura adaptada de Patel *et al.* (2016).<sup>119</sup>

Ao final do experimento de permeação, amostras da epiderme foram separadas da derme empregando um bisturi a fim de determinar a quantidade de CUR nesses tecidos. A CUR foi extraída das camadas da pele utilizando 5,0 mL de acetonitrila, deixando a solução com as peles no freezer durante a noite, sonificando por 15 min e, por fim, centrifugando a 14 kg durante 12 min. A quantidade de CUR retida nos tecidos foram então calculados pela leitura da solução de ACN em fluorímetro. Pele não tratada foi usada como controle negativo (branco), uma vez que partículas tais como proteínas ou similares presentes na pele podem interferir ou sobrepor ao espectro de fluorescência da CUR por possuírem fluorescência própria.

#### **2.2.16 Microscopia confocal das membranas e da pele**

A técnica de microscopia confocal foi empregada para monitorar a distribuição da curcumina nas membranas e na pele, esta última após o ensaio de permeação *ex vivo*. No primeiro caso, um pedaço de cada membrana a base de QTS contendo curcumina foi analisada diretamente no microscópio. No segundo caso, uma fatia de pele de cada célula de Franz foi cortada ao final no experimento de permeação, embebida em meio de congelamento de tecido (Tissue Tec), sendo congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e então seccionada ( $20\text{ }\mu\text{m}$ ) usando um micrótomo criostato (Leica). As secções dos tecidos foram observadas sem aplicação de qualquer sonda adicional ou outro tratamento prévio em um microscópio Leica DMI6000 B acoplado com um scanner confocal TCS SP5. As amostras foram excitadas em 488 nm com 40% de intensidade de luz e observadas na região entre 500–580 nm.

#### **2.2.17 Morfologia da superfície das membranas pós permeação**

Após os experimentos de permeação, as membranas que estavam sobre a pele foram removidas e colocadas em *stub*, revestidas com ouro e observadas por meio de SEM seguindo o procedimento descrito no item 2.2.9 deste capítulo. Ambos os lados das membranas (em contato ou não com a pele) foram avaliados.<sup>110</sup>

#### **2.2.18 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) através do método de microdiluição**

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da UFSC.

##### *2.2.18.1 Reativação das cepas e preparo do inóculo*

Foram empregadas cepas-padrão dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), obtidas da Microbiologics®

(Minessota, USA). As culturas bacterianas mantidas em estoque foram repicadas para placas de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA) (para *S. aureus*) ou ágar cetrimida (para *P. aeruginosa*) e incubadas durante 24 h a 37 °C, para verificar a viabilidade dos micro-organismos e a pureza das cepas. Em seguida, uma colônia de cada meio foi transferida para caldo Müller-Hinton (MH), seguido de incubação durante 24 h a 37 °C. A concentração de cada inóculo foi ajustada com salina estéril, tendo como base o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 1,0 mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 9,0 mL de salina estéril, resultando em uma suspensão com aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, a qual foi empregada nos ensaios posteriores.

#### 2.2.18.2 Ensaio de microdiluição

Para determinação da MIC, pesou-se 1,0 g de cada amostra de gel à base de QTS e adicionou-se 10,0 mL de salina estéril, obtendo-se uma solução na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>. A partir desta, foram preparadas diluições seriadas, nos próprios poços da placa de microdiluição, nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 mg mL<sup>-1</sup>, em duplicata. Para a realização do ensaio adicionou-se, a cada poço da microplaca, 100 µL de cada diluição, 80 µL de caldo MH e 20 µL da suspensão do micro-organismo. Controles de esterilidade do meio de cultivo e do diluente foram conduzidos em cada ensaio, assim como controles de crescimento bacteriano e de ausência de contaminação nas amostras (diluições). As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C e o crescimento bacteriano evidenciado através de turvação e pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 2 h, à mesma temperatura. Poços com crescimento celular adquirem a coloração rosa, enquanto que os poços sem crescimento permanecem incolores. A MIC foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento microbiano.

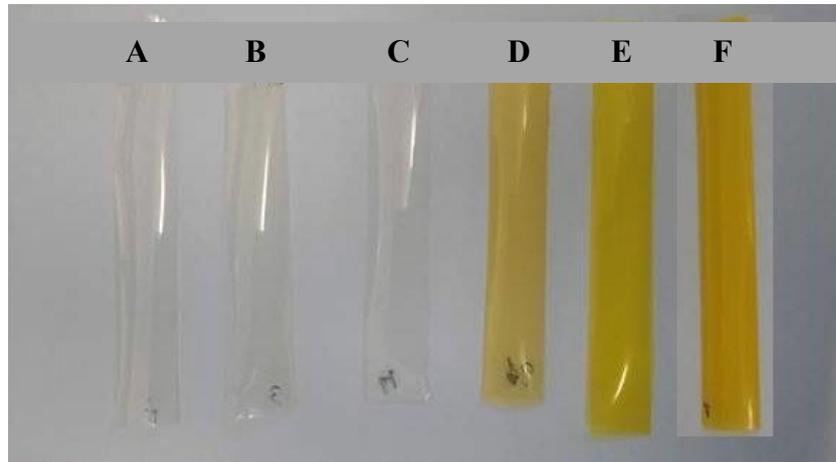
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS E ANÁLISE VISUAL DAS MEMBRANAS

Antes de iniciar a discussão dos resultados obtidos, se mostra pertinente discorrer sobre o desenvolvimento e preparo das amostras de membranas a base de quitosana contendo curcumina. Inicialmente foi pensado e desenvolvido a metodologia de preparo das soluções para terem aproximadamente 1% de curcumina e 1% dos copolímeros em relação à massa total de quitosana.<sup>120</sup> Vários procedimentos foram executados para verificar quais as melhores condições de preparo das soluções. Dentre elas estão a adição direta da CUR e dos copolímeros na solução de QTS (2% m/V), adição desses componentes pré-solubilizados em solvente orgânico (acetona) à solução de QTS. Utilização de diferentes tempos de agitação (2, 6, 12 e 24 h) em temperatura ambiente e aquecimento brando (~50 °C) e secagem com e sem ajuda de circulação de ar.<sup>120</sup>

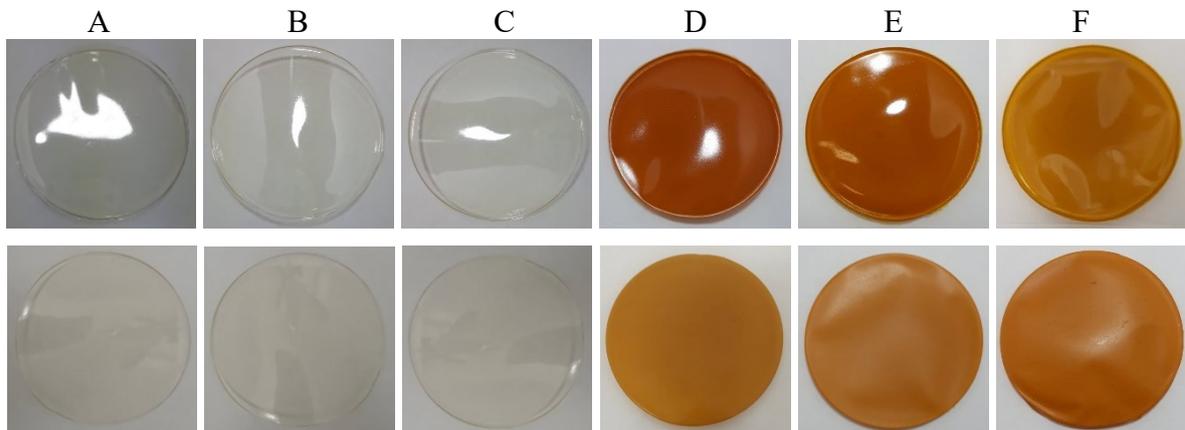
Foi verificado nesse estudo qualitativo que as melhores condições de preparo de solução foram: adição direta dos componentes em solução de quitosana, com aquecimento brando, tempo de agitação de 24h e sem auxílio de circulação de ar durante a secagem (Figura 29). A maioria das caracterizações e ensaios realizados abaixo foram primeiramente feitas com essas amostras, no entanto quando partiu-se para as aplicações relacionadas à permeação *ex vivo* em pele humana verificou-se que as formulações contendo essa concentração de CUR não apresentaria boa permeação na pele, uma vez que o tempo de contato utilizado no ensaio (7 h) não é suficiente para que haja liberação de quantidade efetiva minimamente necessária para posterior quantificação. Isso ocorreu porque a liberação da CUR se mostrou lenta (como será visto no decorrer do trabalho). Por conta disso, foi retomado o estudo desde o início a fim de se obter amostras com concentração de CUR suficiente para quantificação nos ensaios de permeação.

Figura 29 - Características macroscópicas das membranas de (A) QTS pura, (B) QTS-F127, (C) QTS-P123, (D) QTS-CUR, (E) QTS-F127-CUR e (F) QTS-P123-CUR contendo 1% m/m de CUR e PLU.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 30 - Características macroscópicas das membranas de (A) QTS pura, (B) QTS-F127, (C) QTS-P123, (D) QTS-CUR, (E) QTS-F127-CUR e (F) QTS-P123-CUR contendo 10% m/m de CUR e/ou PLU. As figuras de cima exibem as fotos da parte de cima das membranas, enquanto que as figuras de baixo exibem as fotos da parte de baixo das membranas.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A nova concentração utilizada contemplou uma porcentagem de 10% m/m do princípio ativo em comparação a QTS, quantidade adequada para os ensaios de permeação. As concentrações dos copolímeros acompanharam a quantidade adicionada de CUR à matriz polimérica, tendo como base os estudos realizados no Capítulo II da tese. A relação CUR/PLU utilizada acabou sendo (50/50), ou seja, acima da solubilidade máxima da CUR nos PLUs. Entretanto estudos anteriores sugerem que a QTS auxilia na solubilização da CUR contida na matriz, fazendo com que uma quantidade menor de PLU em relação a sugerida pelos dados de DSC pudesse ser utilizada na produção das membranas.<sup>121</sup> Em geral, análise visual

macroscópica das membranas, como mostrado na Figura 30, pode fornecer informações iniciais sobre os materiais produzidos, tais como cor, brilho/opacidade e translucidez.

As membranas sem curcumina apresentam característica e coloração semelhantes (Figura 29 e 30 A–C), manifestando brilho quando expostos à luz, não exibindo domínios visíveis de material insolúvel. Já as membranas contendo CUR (Figura 29 e 30 D–F) exibem diferenças na coloração. A membrana composta por QTS–CUR (Figura 29D e 30D) exibe coloração alaranjada opaca (sem brilho) mas relativamente translúcida quando em menor concentração (Figura 29D), provavelmente devido a menor solubilização e dispersão da CUR na membrana. Contudo, em maior concentração a membrana (Figura 30D) se apresenta brilhosa em um dos lados (cima) e fosca no outro (baixo), além de não ser translúcida como a menos concentrada.

Por outro lado, as membranas contendo CUR e os copolímeros F127 e P123 (Figura 29E–F) exibem um aspecto amarelo límpido, homogêneo e relativamente mais translúcido que a amostra de QTS–CUR, o que pode indicar melhor dispersão, e provavelmente, melhor solubilização do ativo na forma amorfa frente a formulação sem os PLUs. As membranas mais concentradas não mostram mudanças significativas em relação àquela sem os copolímeros, sendo também brilhantes em um dos lados e foscas no outro. Porém não exibem coloração mais amarelada como ocorre com a formulação menos concentrada, provavelmente devido à alta quantidade de ativo disperso.

É importante frisar que houve pouca diferença de espessura entre as membranas preparadas (55–65  $\mu\text{m}$ ), uma vez que tomou-se o cuidado de preparar amostras com espessuras semelhantes, adicionando sempre a mesma quantidade de mistura filmogênica, sendo medidas após secas por meio de um micrômetro. Desta maneira, a variação de espessura não deve ser um fator significativo para a maioria das análises aqui apresentadas e discutidas. Além disso, todas as amostras exibiram uniformidade de conteúdo acima de 90% ( $95 \pm 3\%$ ).

Estudos realizados por Bueno *et al.* (2014) mostraram que a presença de plurônico influenciou a opacidade da membrana de quitosana/alginato, aumentando a opacidade com o aumento da concentração do copolímero. Eles atribuíram esse comportamento ao aprisionamento de ar à matriz polimérica, resultando num material com maior porosidade. As propriedades mecânicas também foram afetadas pela presença de plurônico na matriz, tornando-se menos maleável com o aumento da quantidade de copolímero.<sup>122</sup>

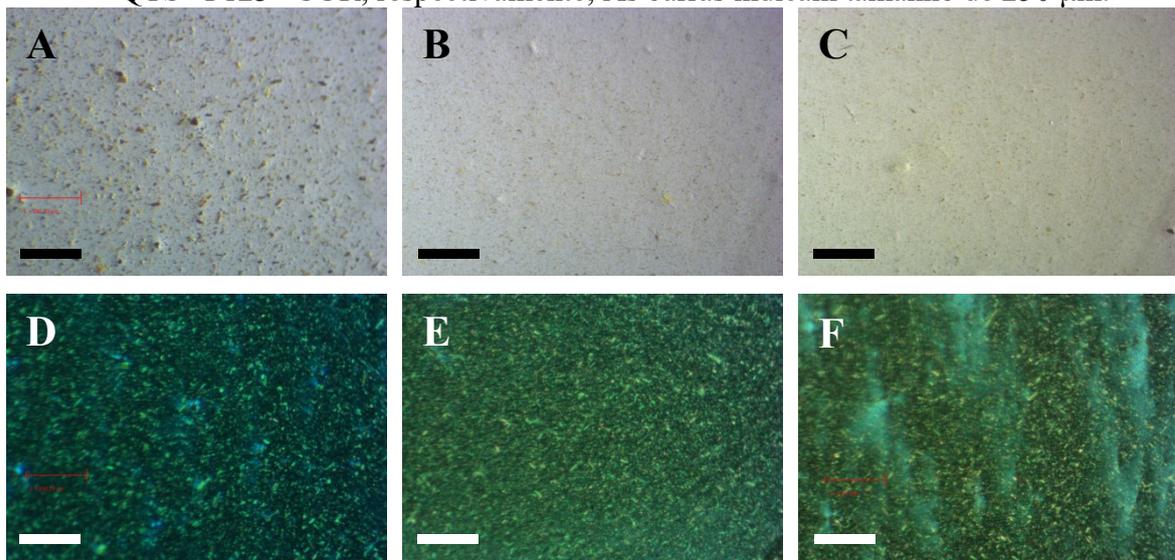
Uma análise visual macroscópica não nos proporciona informações precisas a respeito da dispersão e solubilidade da curcumina nas diferentes membranas com matriz de quitosana.

Uma forma de avaliar a boa dispersão da curcumina nas membranas é utilizando a microscopia óptica de luz polarizada, microscopia confocal e espectrofotometria UV-Vis.

### 3.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA E CONFOCAL

Esta técnica nos fornece informações em relação a dispersão da curcumina e se o composto está presente na forma cristalina ou amorfa após a obtenção das membranas. As imagens (A), (B) e (C) da Figura 31 mostram microscopias óticas convencionais, e as imagens (D), (E) e (F) apresentam as microscopias de luz polarizada (PLOM) das membranas de quitosana contendo curcumina (A e D) e curcumina incorporada nos copolímeros F127 (B e E) e P123 (C e F).

Figura 31 - Microscopia ótica convencional (A, B e C) e microscopia de luz polarizada (D, E e F) das membranas de (A e D) QTS-CUR, (B e E) QTS-F127-CUR e (C e F) QTS-P123-CUR, respectivamente; As barras indicam tamanho de 250  $\mu\text{m}$ .



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

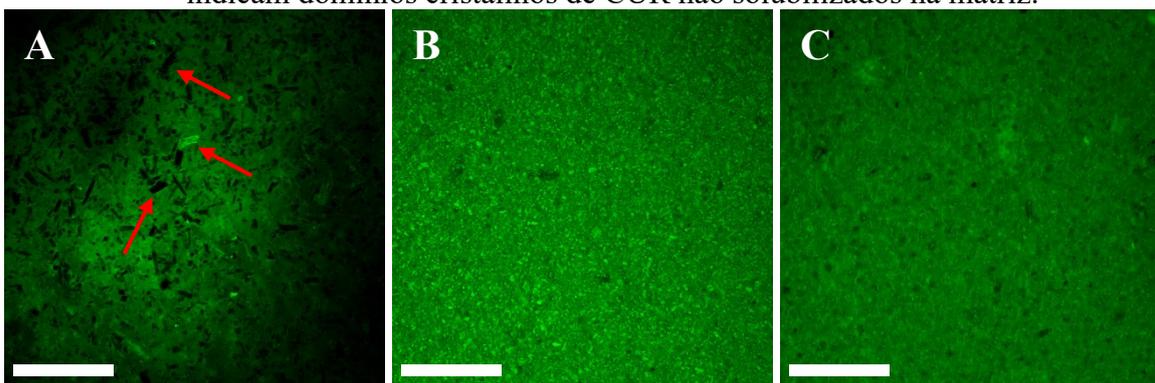
As três imagens de microscopia ótica convencional (A, B, C) apresentadas na Figura 31 exibem características superficiais semelhantes. Enquanto que nas imagens de PLOM (D, E e F) existem regiões escuras e claras, ou seja, que exibem birrefringência (diferentes índices de refração para diferentes direções de propagação da luz, resultando nas regiões claras), possivelmente devido aos cristais de curcumina não solubilizados e as regiões escuras devem ser da porção de matriz polimérica e da CUR amorfos. A birrefringência das figuras (D), (E) e (F) (Figura 31) ocorrem devido orientação da luz que passa pela porção cristalina, sendo que o polarizador deixa passar luz numa orientação específica, já os pontos escuros se devem a falta de orientação proporcionada por estruturas não organizadas ou amorfas. Assim sendo, observa-

se que mesmo na presença dos copolímeros a curcumina ainda exibe certo grau de cristalinidade nas membranas de quitosana, pelo menos nas concentrações de copolímeros utilizadas no presente trabalho. No entanto não é possível afirmar que a birrefringência é ocasionada apenas pela CUR, uma vez que os copolímeros também exibem certo grau de cristalinidade, principalmente o F127, como será visto mais adiante.

A técnica de microscopia de luz polarizada foi utilizada por Crucitti *et al.* (2018) para avaliar o grau de cristalinidade do ácido abiético (AAB) em matriz de quitosana. Verificando que o ativo na forma cristalina mostra birrefringência grande devido ao tamanho dos cristais do ácido abiético, a mistura física do AAB com a quitosana não mostrou mudanças significativa no grau de cristalinidade do ativo. Entretanto, a mistura por dispersão sólida (secagem de solução contendo ambos componentes) levou a completa amorfização do AAB no formulado, eliminando a birrefringência da amostra. Desta maneira, mantendo o AAB na forma solúvel em matriz de quitosana, sugerindo uma boa interação AAB–polímero.<sup>109</sup> No caso da curcumina, aparentemente, a presença apenas da quitosana não é suficiente para garantir a amorfização da CUR, sendo necessária a adição dos copolímeros para auxiliar na dispersão e solubilização do ativo.<sup>123</sup>

No propósito de comparar os dados obtidos pelo PLOM, foram realizadas microscopias confocal das membranas a base de quitosana (Figura 32).

Figura 32 - Microscopia confocal das membranas de composição (A) QTS–CUR, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR. As barras indicam a escala de 200  $\mu\text{m}$ . As setas indicam domínios cristalinos de CUR não solubilizados na matriz.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

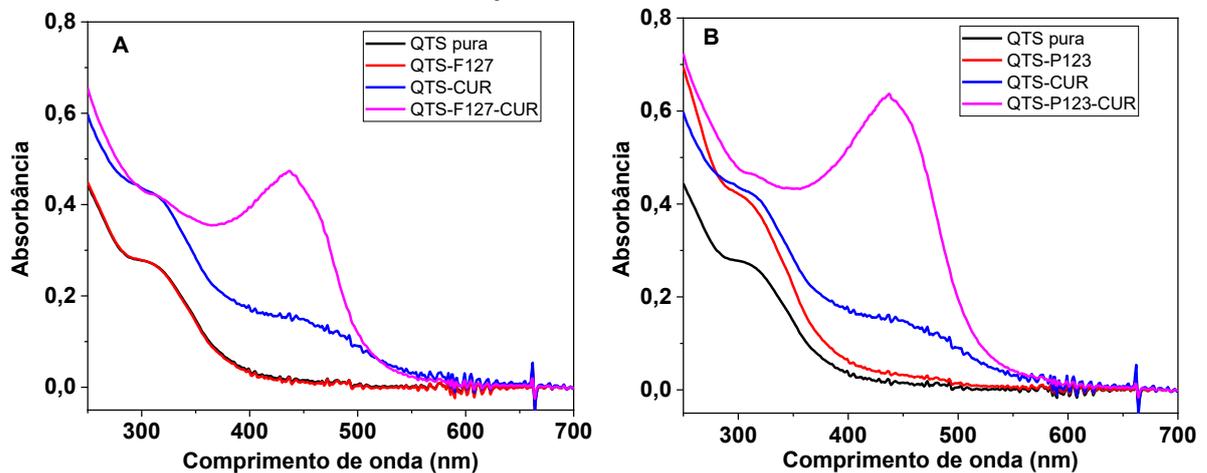
As imagens de microscopia confocal reforçam os achados dos experimentos de PLOM. Onde a membrana composta apenas por QTS–CUR exibe fluorescência (verde) característica da curcumina em praticamente todo o filme, porém mostra sinais cristalinos não fluorescentes associados à CUR não solubilizada na membrana de QTS (setas em vermelho). Por outro lado,

as membranas contendo os copolímeros exibem fluorescência homogênea em praticamente toda a extensão do material analisado. A amostra com F127 (Figura 32B) contém alguns pontos que parecem pequenos cristais fluorescentes que, provavelmente, está relacionado a cristais de copolímero contendo curcumina solubilizada dispersos na matriz de quitosana. A membrana contendo P123 aparentemente apresenta a melhor dispersão de CUR dentre as composições preparadas no presente trabalho, não sendo possível visualizar formação significativa de cristais na matriz polimérica. Corroborando com os dados do Capítulo II.

### 3.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS DAS MEMBRANAS

Para verificar a polaridade do ambiente onde a CUR está situada, a interação entre os constituintes e o comprimento de onda de absorção característico da CUR, empregou-se a técnica de espectroscopia de UV-Vis. A Figura 33 mostra os espectros das membranas de quitosana com e sem curcumina. Nota: os espectros foram obtidos para as primeiras membranas (menor concentração de CUR) pois essas ainda são translúcidas, enquanto que as mais concentradas não deixariam o feixe de luz chegar ao detector.

Figura 33 - Espectros UV-Vis do conjunto de membranas (A) QTS pura, QTS-F127, QTS-CUR e QTS-F127-CUR e (B) QTS pura, QTS-P123, QTS-CUR e QTS-P123-CUR.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Figura 33 observa-se que a quitosana e os plurônicos não absorvem na região do visível, possuindo apenas uma banda próxima a 310 nm referente à transição  $n \rightarrow \pi^*$  dos pares eletrônicos dos átomos de O e N presentes na estrutura sacarídea da quitosana. As membranas contendo curcumina exibem absorção na região do visível, onde o comprimento de onda de máxima absorção e a intensidade da banda dependem do microambiente onde a CUR

está inserida.<sup>124</sup> A curva em azul, de ambas as figuras, mostra o espectro da membrana de QTS contendo apenas o ativo, sendo possível observar uma banda próxima a 450 nm referente à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  da CUR, a baixa intensidade de absorção indica que a curcumina está pouco dissolvida e provavelmente contém agregados cristalinos (como visto na microscopia confocal). No entanto para as membranas contendo copolímeros, curva rosa em ambas as figuras, o perfil espectral é notoriamente diferente, apresentando banda bem definida próxima a 437 nm podendo indicar melhor solubilidade da CUR nas membranas de quitosana contendo os copolímeros.<sup>84,125</sup>

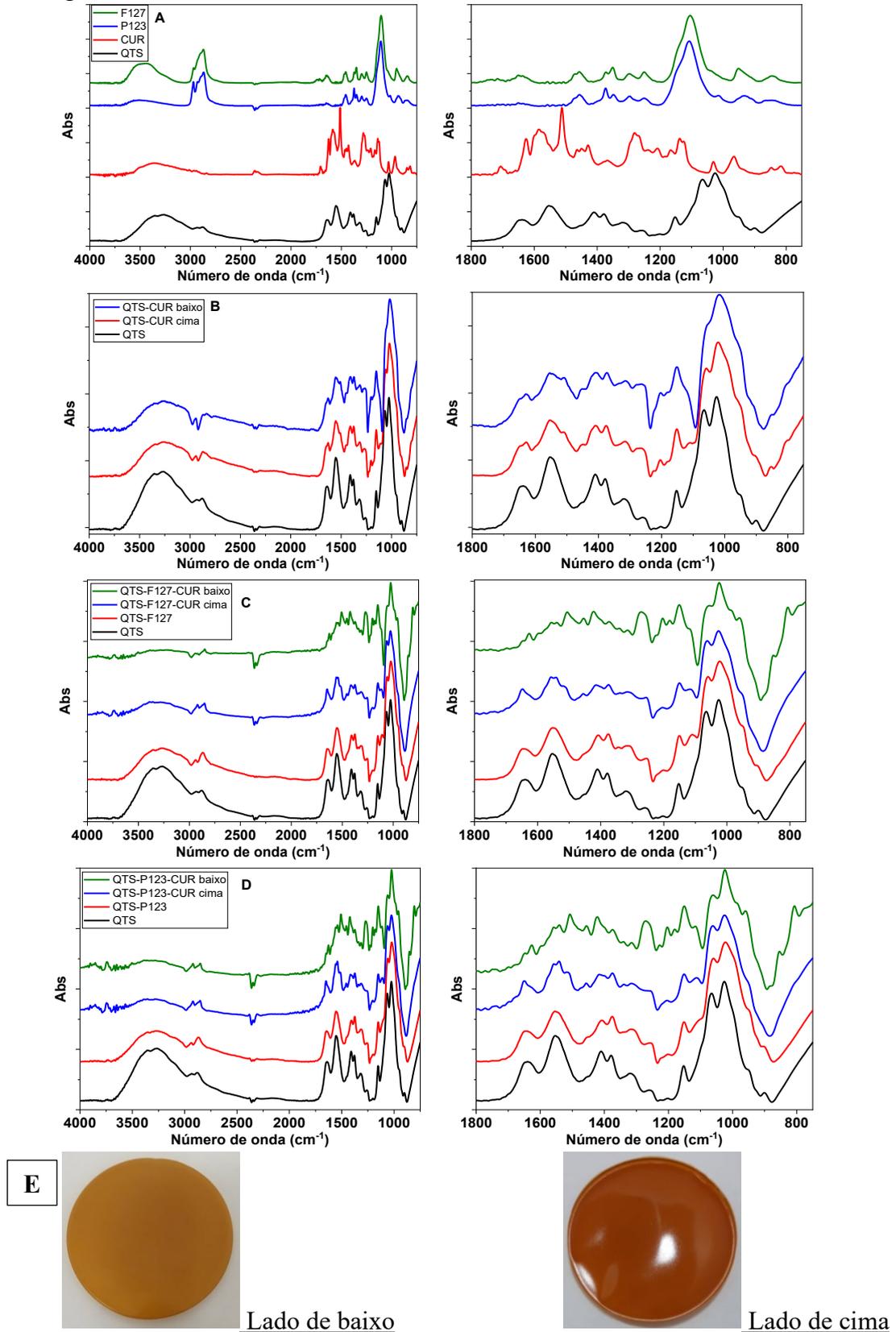
A diferença entre as intensidades das bandas de absorção devem estar associadas a maior interação da CUR com o P123 (Figura 33B) frente ao F127 (Figura 33A), como visto no Capítulo II, uma vez que o P123 é relativamente mais lipofílico (menor HLB) que o F127, proporcionando maior solubilidade da CUR no sistema contendo P123, corroborando com os dados de microscopia confocal.<sup>84,125</sup>

Espectros UV–Vis podem fornecer informações sobre o microambiente onde a CUR pode estar na matriz polimérica, entretanto não fornece qualquer indicação de como, ou quais grupos funcionais dos constituintes podem estar interagindo para estabilizar o ativo na membrana polimérica. Espectros de infravermelho podem fornecer informações sobre quais grupos funcionais podem estar interagindo.

### 3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Medidas de infravermelho (Figura 34) dos componentes puros foram realizadas em KBr e as membranas preparadas foram feitas em modo ATR, os espectros foram obtidos por acúmulo de 25 *scans*. Essa técnica foi empregada no intuito de obter informações relacionadas às interações entre os constituintes das formulações e sobre possíveis micro e macro-características das membranas produzidas.

Figura 34 - Espectros de FTIR obtidos via KBr para (A) componentes puros e modo ATR para as membranas de (B) QTS-CUR, (C) QTS-F127-CUR, (D) QTS-P123-CUR. As imagens da direita mostram o zoom (1800–800  $\text{cm}^{-1}$ ) das imagens da esquerda. (E) Imagem fotográfica de uma membrana contendo CUR analisada no lado de baixo e cima.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Na Figura 34A é mostrado os espectros de infravermelho da quitosana, curcumina e dos copolímeros P123 e F127. Para a QTS nota-se uma banda larga na região de 3675–2984  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a sobreposição espectral dos estiramentos N–H e O–H, assim como das ligações hidrogênio intramoleculares. As bandas de absorção ao redor de 2937 e 2875  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento C–H simétrico e assimétrico, respectivamente. Grupos residuais N–acetil foram confirmados pelas bandas em torno de 1641  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=O de amida I) e 1320  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C–N de amida III), respectivamente. A banda em torno de 1550  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao dobramento N–H de amins primárias. O dobramento de deformação simétrico dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  foram confirmados pela presença das bandas ao redor de 1410 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda de absorção característica em 1152  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento assimétrico da ponte ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 4) C–O–C. As bandas em 1067 e 1026  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C–O.<sup>126</sup>

O espectro da curcumina exhibe uma banda larga entre 3594 e 3065  $\text{cm}^{-1}$  devido aos grupos O–H presentes na molécula. A banda em 1626  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída predominantemente a sobreposição das vibrações de estiramento de alcenos (C=C) e aos grupos carbonila (C=O). A outra banda em 1580  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída aos estiramentos simétricos dos anéis aromáticos (C=C). A banda intensa em 1512  $\text{cm}^{-1}$  é relacionada ao C=O, enquanto a banda de enol (C–O) é encontrada em 1281  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1031  $\text{cm}^{-1}$  é devido aos grupos metoxi (C–O–C), enquanto as vibrações trans–CH do benzoato aparecem perto de 966  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>102</sup> Normalmente os estiramentos de grupos C=O ocorrem acima de 1600  $\text{cm}^{-1}$ , no entanto, devido tanto a conjugação quanto ao equilíbrio D/CE da CUR, o estiramento C=O ocorre em menor número de onda para esse composto.

Ambos os copolímeros exibem quase os mesmos perfis espectrais na região do infravermelho, uma vez que eles possuem as mesmas unidades de repetição (PEO e PPO) sendo a diferença entre eles apenas na quantidade de repetição dessas cadeias, O F127 têm cinco vezes mais unidades de repetição PEO que o P123. Esses copolímeros possuem uma banda larga entre 3715–3089  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento O–H das hidroxilas terminais das unidades PEO. As bandas em 2970 e 2868  $\text{cm}^{-1}$  são devidas aos estiramentos C–H assimétrico e simétrico dos grupos metil e metileno. Existe uma diferença de intensidade da banda em 2970  $\text{cm}^{-1}$  para o P123 e F127 devido a razão PEO/PPO em cada copolímero. A banda de absorção intensa em 1106  $\text{cm}^{-1}$  e 936  $\text{cm}^{-1}$  correspondem as vibrações simétricas e assimétricas do estiramento C–O referentes aos éteres dialquílicos presentes na estrutura de ambas as unidades PEO e PPO dos

dois copolímeros. As bandas em 1456 e 1373  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao dobramento dos grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ .<sup>127</sup>

Para as membranas compostas por QTS–P123 e QTS–F127 pode-se observar um pequeno aumento na intensidade das bandas referentes aos grupos metil e metileno (2970–2868  $\text{cm}^{-1}$ ) em comparação à QTS pura, bem como o surgimento de um pequeno ombro próximo a 1108  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionado ao estiramento C–O das ligações éteres dos PLUs.

As características espectrais das membranas contendo CUR em sua constituição dependeram de qual lado da amostra os espectros de FTIR foram obtidos. Na parte de cima, não foi possível observar alterações significativas quando comparado com a membrana de QTS pura. Enquanto que no lado de baixo ocorreram mudanças significativas no perfil espectral dos materiais, verificando-se uma diminuição da intensidade das bandas N–H próximas a 1641 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  ou uma sobreposição com outros sinais entre 1650 e 1360  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, há o aumento e o surgimento de duas bandas em 1273 e 1154  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, relacionadas à vibração C–O da CUR. Uma diminuição significativa na intensidade da banda em 1067  $\text{cm}^{-1}$  da QTS também pôde ser observada. Essas importantes observações são resultado da interação entre os grupos O–H e N–H da CUR e QTS, respectivamente, como sugerido nos resultados de DSC e mecânicos mais à frente.

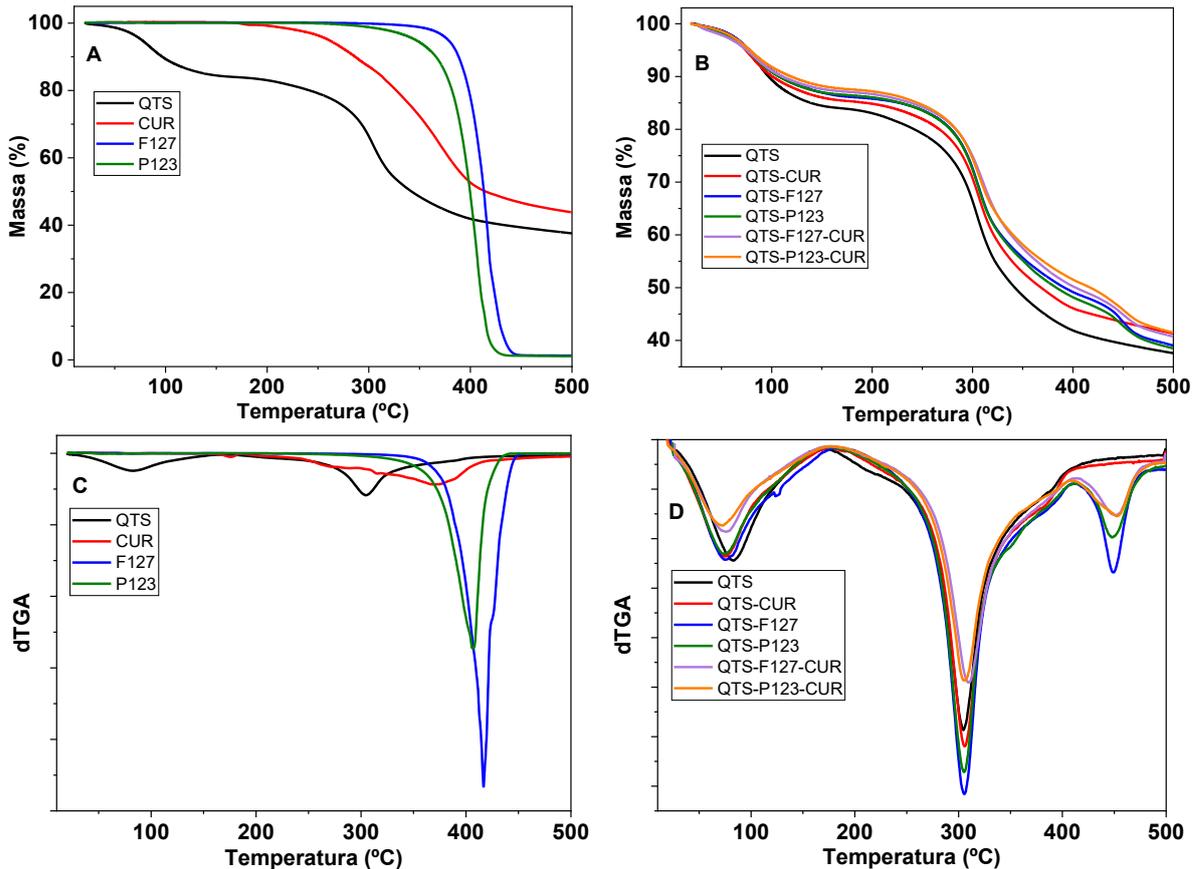
Resultados similares foram encontrados em trabalhos anteriores, sendo verificado deslocamento do número de onda e decaimento da intensidade de absorção relacionada a banda de amina primária da quitosana quando esse polímero interage com os grupos fenólicos da curcumina.<sup>128</sup>

Desta maneira, nota-se que existe uma deposição ou concentração preferencial da CUR em um dos lados quando as membranas produzidas estão em processo de secagem. O lado preferencial de deposição parece ser o de baixo, uma vez que as bandas de FTIR características da CUR aparecem apenas quando o lado de baixo das amostras é analisado. Pode-se sugerir que a diferença observada durante as análises macroscópicas entre o lado brilhoso (cima) e o lado opaco (baixo) das membranas (Figura 34) se deva à diferença de concentração da CUR nas membranas vistas pelos resultados de FTIR (Figura 34). Seguindo essa linha de raciocínio conclui-se que para possíveis aplicações das membranas de QTS contendo CUR aqui preparadas em feridas ou queimaduras de pele devem ser depositadas preferencialmente em um lado específico do curativo (baixo; opaco). Dado que o lado mais concentrado deve fornecer ao ambiente do tecido maior quantidade de curcumina e tornar o processo de cicatrização mais significativo que o lado menos concentrado das membranas.

### 3.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A estabilidade térmica até 500 °C dos componentes puros e das diferentes membranas preparadas foram determinadas por análises de TGA e as curvas estão apresentadas na Figura 35.

Figura 35 - TGA e DTGA (A e C) dos componentes puros e (B e D) diferentes formulações a base de QTS.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Pode ser visto nos gráficos de TGA e DTGA que a quitosana apresenta ao menos duas regiões de perda de massa com taxas máximas próximas a 83 (~15%) e 305 °C (~45%) relacionadas a evaporação de água residual e a degradação da QTS, respectivamente. A curcumina exibe perda de massa de aproximadamente 55% perto de 370 °C devido sua decomposição parcial.<sup>111</sup> Não obstante, ambos os copolímeros se mostram os componentes mais estáveis e se decompõem em uma única etapa a 408 e 417 °C para o P123 e F127, respectivamente.<sup>129</sup>

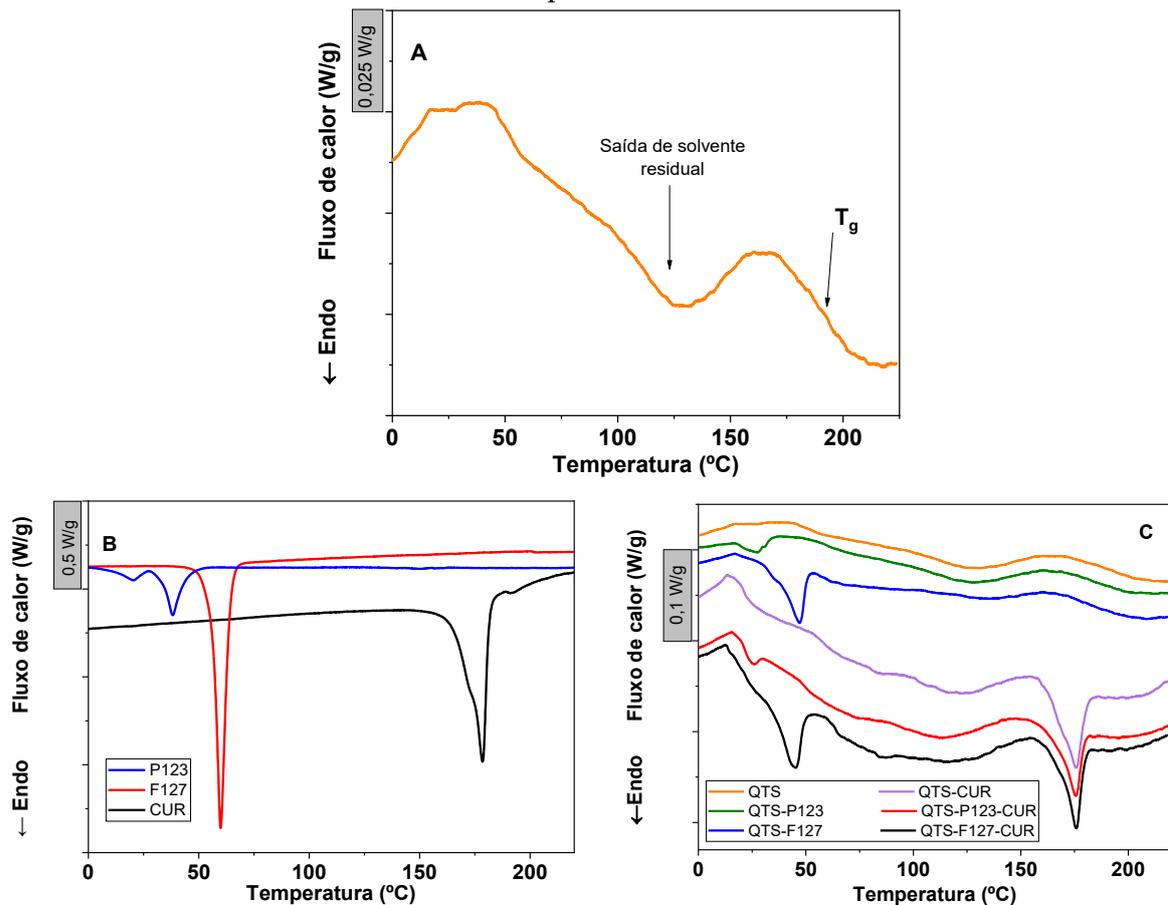
Destá forma, a presença desses componentes de maior estabilidade na formulação das membranas de QTS faz com que a estabilidade térmica da formulação também aumente, em comparação à QTS pura, como mostrado na Figura 35B. A estabilidade aumenta com a adição

de 10% m/m desses aditivos, onde a formulação QTS–CUR é a menos estável dentre elas e a formulação contendo QTS–P123–CUR é mais estável dentre todas.

### 3.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Os resultados de DSC dos componentes puros e das diferentes membranas preparadas são mostrados na Figura 36. As Figura 36A e B mostram as temperaturas de fusão ( $T_m$ ) do P123, F127, CUR e a  $T_g$  da QTS. Como discutido no capítulo anterior, o P123 exibe dois eventos endotérmicos de baixa entalpia ( $29,7 \text{ J g}^{-1}$ ) entre 0 e 56 °C, sendo o que o principal ocorre em 38,2 °C. O F127 e a CUR exibem apenas um único evento endotérmico agudo correspondente a fusão desses compostos que ocorrem em 56,4 °C ( $\Delta_{\text{fus}}H = 108,3 \text{ J g}^{-1}$ ) e 178,4 °C ( $\Delta_{\text{fus}}H = 131,0 \text{ J g}^{-1}$ ), respectivamente.<sup>82,100</sup>

Figura 36 - DSC (A) da QTS, (B) da CUR e dos PLUs e (C) das membranas a base de quitosana.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Em contra partida, a QTS é um biopolímero amorfo e não exibe eventos térmicos relacionados a fusão, ao menos na temperatura de trabalho, mostrando apenas transição vítrea

( $T_g$ ) em 190,3 °C seguida por início de decomposição (vide gráficos de TGA na Figura 35). É sabido que a  $T_g$  da quitosana dependem da massa molar, grau de desacetilação (GD) além da presença de impurezas ou aditivos plastificantes.<sup>130</sup> Existem estudos indicando que esses valores de  $T_g$  podem variar de 160 a 203 °C dependendo das condições acima descritas.<sup>131</sup> Em virtude disso, estudos relacionados à  $T_g$  da quitosana são difíceis de serem comparados com a literatura.

A Figura 36B mostra as curvas de DSC para as diferentes formulações a base de quitosana. A adição de 10% m/m de F127 ou P123 diminui a  $T_g$  da QTS para 183,3 e 184,2 °C, respectivamente. Esse comportamento ocorre devido interações entre a QTS e as cadeias poliméricas dos PLUs, resultando na diminuição das ligações hidrogênio entre QTS–QTS presentes no enovelamento nas cadeias sacarídicas, aumentando o volume livre e, como consequência, sua mobilidade molecular.<sup>132,133</sup> A  $T_m$  de ambos os copolímeros também sofre alteração quando adicionados à matriz polimérica, a  $T_m$  do F127 diminui para 47,0 °C e o pico principal do P123 para 27,9 °C. Indicando que as estruturas cristalinas de ambos os copolímeros são afetadas pela presença da QTS.

Infelizmente não foi possível observar com clareza ou avaliar a variação da  $T_g$  das membranas contendo CUR em sua composição, uma vez que o processo de fusão da CUR se sobrepõe ao evento de transição vítrea da QTS, o que torna difícil a análise do comportamento térmicos de ambos os componentes. Todavia é perceptível a ocorrência da diminuição da  $T_m$  da CUR para 175,9 °C quando esse composto é incorporado à formulação da matriz de QTS.<sup>111</sup> Entretanto esse valor sofre pouca ou nenhuma mudança na presença de qualquer um dos copolímeros na formulação, enquanto as temperaturas de fusão tanto do F127 quanto do P123 diminuem ainda mais com a presença da CUR, exibindo  $T_m$  de 45,2 e 25,9 °C, respectivamente, nas formulações QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR. Assim, é possível concluir que a CUR interfere significativamente na estrutura cristalina dos copolímeros, e provavelmente na da matriz de quitosana também.<sup>121,134</sup> Estando de acordo com os dados observados nos ensaios de DSC das misturas CUR–PLU apresentados no Capítulo II, com as microscopias PLOM e com os espectros de UV-Vis das membranas.

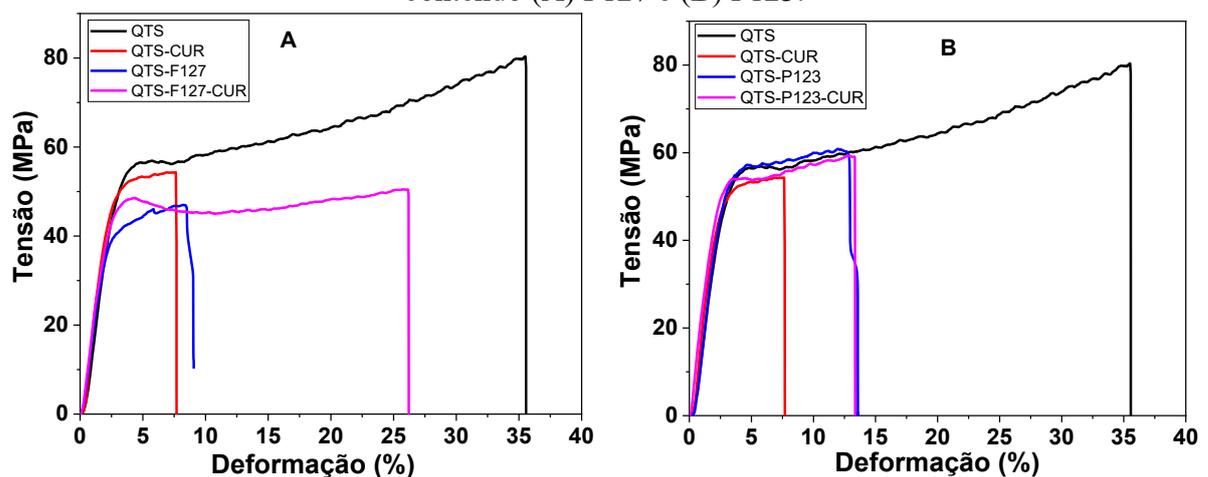
John e George (2014) obtiveram perfil de diminuição da  $T_m$  da curcumina semelhante ao obtido no presente trabalho ao incorporar CUR em matriz de alginato/P123, diminuindo também a intensidade da energia absorvida durante o evento de fusão, indicando que a curcumina permaneceu majoritariamente na forma amorfa quando incorporada à esse sistema.<sup>134</sup>

### 3.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MEMBRANAS

Materiais emergentes como curativos modelos devem apresentar propriedades mecânicas adequadas. Durante a aplicação da membrana no local da lesão é essencial que ela permaneça intacta, não rompa facilmente e apresente boa maleabilidade, facilitando assim sua manutenção periódica.<sup>104</sup>

Comumente mudanças na  $T_g$  de matrizes poliméricas resultam em variação nas propriedades mecânicas do material. A Tabela 8 apresenta o módulo de elasticidade, tensão máxima e alongação máxima para as diferentes membranas formuladas obtidos a partir dos ensaios de tensão-deformação conforme Figura 37. O módulo de elasticidade é calculado pela inclinação das curvas dentro do limite elástico (reversível).

Figura 37 - Ensaio de tensão-deformação das membranas com diferentes composições contendo (A) F127 e (B) P123.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 8 - Propriedades mecânicas das membranas de quitosana com diferentes composições obtidas pela análise da Figura 37.

Formulação (n = 5)	Módulo de elasticidade (MPa)	Tensão máxima (MPa)	Elongação máxima (%)
QTS	2128 ± 108 <sup>a, b, d</sup>	78,2 ± 5,0 <sup>k</sup>	34,63 ± 4,6 <sup>c</sup>
QTS-F127	2276 ± 91 <sup>a, c, e</sup>	46,4 ± 0,7 <sup>a, b, d, g</sup>	8,51 ± 1,4 <sup>a, b, d</sup>
QTS-P123	1815 ± 71 <sup>g</sup>	46,0 ± 15,4 <sup>a, c, e, h</sup>	13,52 ± 1,8 <sup>a, e</sup>
QTS-CUR	2790 ± 105 <sup>h</sup>	53,7 ± 2,5 <sup>b, c, f, i</sup>	6,88 ± 1,7 <sup>b, f</sup>
QTS-F127-CUR	2112 ± 121 <sup>b, c, f</sup>	47,5 ± 4,1 <sup>d, e, f, j</sup>	30,18 ± 5,9 <sup>c</sup>
QTS-P123-CUR	2223 ± 141 <sup>d, e, f</sup>	57,4 ± 2,3 <sup>g, h, i, j</sup>	13,27 ± 3,6 <sup>d, e, f</sup>

\* Valores médios com mesmas letras sobrescritas em uma determinada coluna não exibem diferença superior a 5% de significância, de acordo com o teste Tukey (ANOVA).

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

De acordo com a Figura 37 e a Tabela 8, a adição de CUR à matriz polimérica de QTS torna a membrana mais rígida em comparação a membrana pura, aumentando o módulo de elasticidade e a tensão máxima enquanto diminui a alongação máxima.<sup>135</sup> Como mencionado acima, o efeito da presença da CUR sobre a  $T_g$  da matriz não pôde ser avaliada, embora seja razoável afirmar que a CUR atue restringindo a relaxação das cadeias da matriz de QTS, favorecendo a rigidez, mesmo que a presença do polifenol ocasione aumento do volume livre das cadeias poliméricas da membrana de QTS. Pode-se sugerir que interações entre cargas ou dipolos opostos provenientes da quitosana e da curcumina podem estar ocorrendo para ocasionar esses efeitos, além disso, os cristais de CUR não solubilizados podem fornecer pontos de armazenamento de tensões. Durante o ensaio surgem gradualmente pontos de ruptura nas membranas, ocasionando a diminuição da alongação máxima das membranas.

As membranas contendo os copolímeros exibem maior elasticidade que aquelas que contém apenas CUR em sua composição. Esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos no DSC, em que uma diminuição na  $T_g$  da matriz polimérica é associada a um aumento na mobilidade molecular e, como consequência, no aumento da plasticidade do material. Adicionalmente, as membranas constituídas por QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR apresentam menores valores de módulo de elasticidade (2112 e 2223 MPa) e maiores alongações na ruptura (30,2 e 13,3%) que aquela composta apenas por QTS–CUR (2790 MPa; 6,9%).<sup>135</sup>

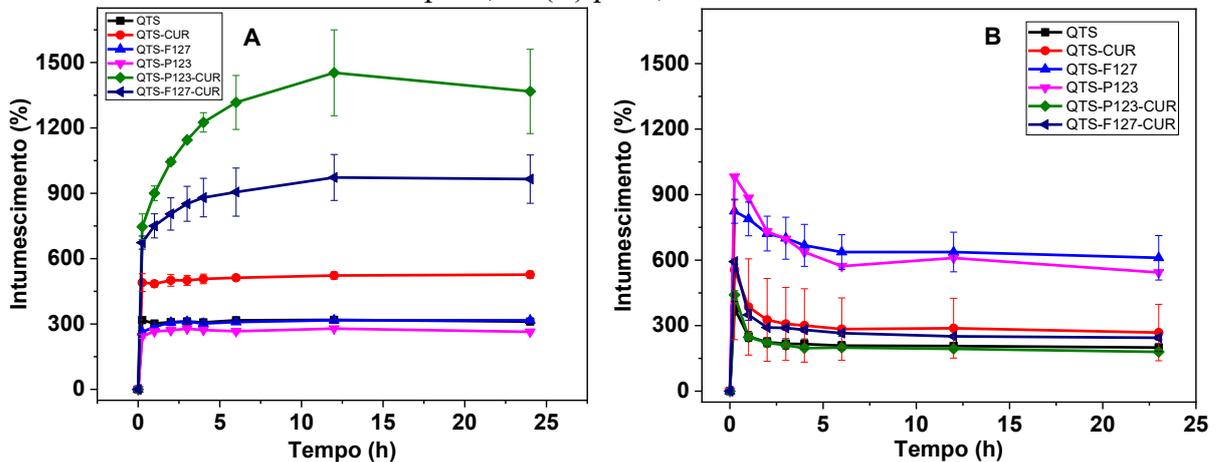
Tsai *et al.* (2001) estudaram o efeito da adição dos surfactantes Tween-20 e Span-80 nas propriedades mecânicas de membranas de polisulfona. Verificando que a adição de 5% de Tween-20 aumenta a alongação na ruptura de 8% para 11% e o módulo de Young diminui de 33 MPa para 19 Mpa. Similarmente a adição de Span-80 muda a alongação na ruptura da polisulfona para 15,5%, porém ao contrário do Tween-20, o módulo de Young da polisulfona aumenta para 39 Mpa, em comparação com o valor de 33 Mpa apresentado pelo polímero puro. Adicionalmente, estes autores verificaram que a  $T_g$  do polímero diminui com o aumento da quantidade desses surfactantes no polímero puro, atuando assim, como plastificantes.<sup>136</sup> O mesmo efeito foi encontrado no presente trabalho, onde a adição dos copolímeros resultou numa diminuição da  $T_g$  das membranas em comparação com a QTS pura.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO DAS MEMBRANAS

Feridas ou queimaduras de pele produzem diferentes quantidades de exsudatos ricos em células mortas, fragmentos de tecidos, sujeiras e fluidos. Se o exsudato permanecer na pele por um longo período, a recuperação da área afetada é atrasada ou diminuída e o risco de

possíveis infecções aumenta consideravelmente. Por esse motivo, o exsudato deve ser retirado do seio da ferida pela absorção da membrana curativo ou, em caso de tecidos queimados, o local afetado deve ser umedecido com solução salina de soro fisiológico ou outro fluido aquoso adicionado previamente no curativo produzido a partir de novos biomateriais.<sup>137,138</sup> Neste sentido, a habilidade de intumescimento (inchamento por retenção de líquido) de membranas com potencial para serem usadas como curativos é uma propriedade indispensável. A Figura 38 apresenta a capacidade de intumescimento das diferentes membranas a base de quitosana produzidas no presente trabalho realizadas em dois pHs (5,5 e 9,0). Sendo o pH do suor, feridas e tecidos lesionados próximo a 5,5.<sup>139</sup>

Figura 38 - Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em (A) pH 5,5 e (B) pH 9,0 a 25 °C.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Na Figura 38 nota-se comportamentos diferentes durante o processo de intumescimento das membranas nos distintos valores de pH. Em pH 5,5 os materiais estudados exibem rápida absorção de água nos primeiros 15 min, seguido por ganho gradual de massa por absorção até atingir o equilíbrio. A carga positiva dos grupos amina da QTS nesse pH causa repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas do polissacarídeo, aumentando o volume livre no qual as moléculas de água podem adentrar ou ocupar.<sup>140,141</sup>

Embora tenha havido um aumento acentuado na absorção de água nos primeiros minutos de todas as amostras submetidas à intumescimento em pH 9,0, após 15 min foi observado diminuição gradual na massa das amostras até que o equilíbrio fosse estabelecido. O comportamento demonstrado pelas amostras intumescidas em pH 9,0 pode ser explicado pela neutralização das cargas da QTS em meios básicos ao passar do tempo, e a diminuição da interação por ligações de hidrogênio entre os grupos  $-OH$  e  $-NH_2$  provenientes da quitosana

e as moléculas de água, devido a diminuição da repulsão eletrostática e perda da carga da amina quando em pHs elevados.<sup>140,141</sup>

Em relação às diferentes formulações de membranas em ambos os pHs é possível notar que as membranas compostas de QTS pura, QTS–F127 e QTS–P123 possuem perfis de intumescimento similares, com uma absorção de água máxima perto de 300%, estando de acordo com o reportado na literatura.<sup>142</sup> A adição de CUR na formulação das membranas aumenta consideravelmente o grau de intumescimento, provavelmente devido a ação cooperativa dos copolímeros e da CUR. É bem conhecido que o poli(óxido de etileno) (PEO) apresenta elevada absorção de água, e como consequência, ótima capacidade de intumescimento.<sup>142</sup> Tanto o F127 quanto o P123 possuem cadeias laterais formadas por unidades de repetição EO, o que ajuda a explicar a maior capacidade de intumescimento dessas formulações contendo esses copolímeros, acompanhado do aumento do volume livre causado pelas moléculas de curcumina.

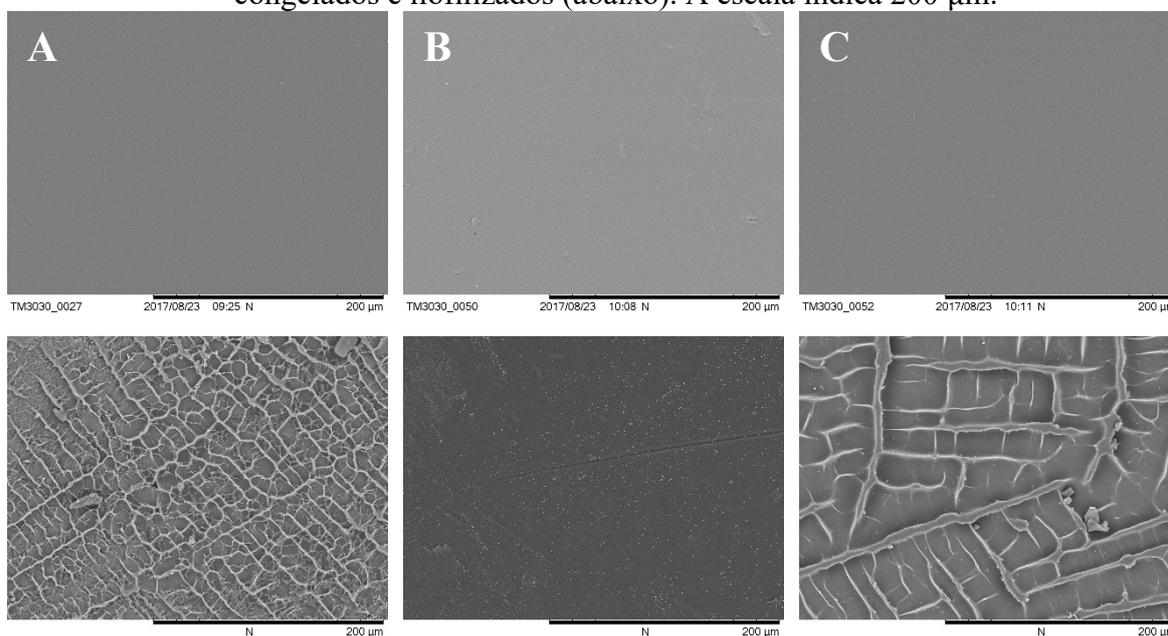
Yap e Yang (2016) produziram uma QTS modificada e a formularam com F127 e avaliaram a capacidade de absorção de água pelas amostras preparadas em meio modificado tipo Dulbecco's. As formulações preparadas pelos pesquisadores apresentaram um grau de intumescimento próximo de 800%, sendo desta forma, compatível com os resultados encontrados no presente trabalho.<sup>143</sup>

As membranas de QTS contendo a CUR e os PLUs em sua constituição devem exibir alta capacidade de absorção de exsudatos ou outros meios fisiológicos devido sua boa interação com água e, conseqüentemente, fornecer melhores propriedades para o desenvolvimento de uma bandagem comercial emergente. Dessa maneira, menores pHs favorecem a absorção de líquidos frente a pHs elevados.

### 3.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS APÓS INTUMESCIMENTO

No intuito de avaliar a morfologia dos sistemas secos e após os ensaios de intumescimento, seguido de congelamento e liofilização, foram realizadas microscopia eletrônica de varredura (SEM) (Figura 39).

Figura 39 - SEM das membranas contendo (A) QTS, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR secas (acima) e depois de intumescidos numa solução de pH 5,5, congelados e liofilizados (abaixo). A escala indica 200  $\mu\text{m}$ .



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

É visível a diferença de rugosidade apresentada pelas membranas após processo de intumescimento e liofilização das formulações. Esta propriedade pode auxiliar na adesão e aumentar a superfície de contato entre membrana e pele. O intumescimento ocasiona a separação entre as cadeias de QTS originada pela difusão de moléculas de água para o interior da matriz polimérica, como visto nos ensaios de intumescimento. Quando as membranas, depois de intumescidos, passam pelo processo de congelamento rápido, a água presente entre as cadeias não dispõe de tempo suficiente para difundirem para fora do bulk polimérico ou se reorganizarem estruturalmente (matriz e água). Uma vez sublimada pela técnica de liofilização, a água deixa a matriz polimérica, fazendo com que a separação entre as cadeias de QTS ocasionadas pelas moléculas de água provoquem rugosidade na superfície das membranas durante o processo de sublimação, assim como visto na Figura 39.<sup>144</sup>

As membranas de formulação QTS–CUR exibem superfície lisa quando seca e extremamente rugosa após intumescida. A amostra contendo F127 não mostrou alterações significativas após intumescimento, continuando lisa após o ensaio, esse comportamento pode estar associado a boa interação deste copolímero com a matriz polimérica, fazendo com que a membrana sofra menos alterações quando submetida a resfriamento rápido, já que o F127 possui boa capacidade de absorção de água. A formulação contendo P123 exibiu perfil morfológico intermediário entre as membranas de QTS–CUR e QTS–F127–CUR, indicando

que a menor capacidade de retenção de líquido pelo P123 frente ao F127 faz com que a membrana ainda exiba certa rugosidade.

O processo de liofilização é amplamente utilizado no preparo de diferentes formulações poliméricas, principalmente aquelas que são estocadas como pó sólido e hidratadas apenas antes do uso ou aplicação. Essa técnica é empregada porque a hidratação da formulação sólida ocorre muito mais rapidamente quando é submetida anteriormente ao procedimento de liofilização, fazendo com que a aplicação em um possível paciente se torne mais rápida, além de aumentar consideravelmente o tempo de prateleira de formulações diversas, sendo assim uma importante ferramenta procedimental para a farmacologia.<sup>145</sup> No entanto, para o presente estudo, apesar de formar rugosidades na membrana as quais poderiam aumentar a rapidez de absorção de água, o congelamento e liofilização das amostras fez com que as membranas ficassem extremamente frágeis e quebradiças, em alguns casos se desintegrando durante a primeira etapa do processo.

Resultados similares foram obtidos por Qin *et al.* (2017) ao prepararem um material gelificado a base de quitosana por resfriamento ultrarrápido (*quenching cooling*) seguido de liofilização, obtendo porosidade e área superficial elevada.<sup>146</sup> Bueno *et al.* (2014) verificaram que o aumento da quantidade de copolímero Pluronic F68 em membranas de quitosana e alginato resultou num aumento da porosidade do material, porém com diminuição da tensão máxima e da elongação na ruptura.<sup>122</sup>

### 3.10 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DAS MEMBRANAS A BASE DE QTS

A permeabilidade ao vapor de água é uma característica muito dependente da composição e se mostra muito importante na aplicabilidade de membranas poliméricas, tanto no campo da indústria de filtração como na área médica. Nesta última, a capacidade do vapor de água permear a membrana polimérica está intimamente associada a manutenção dos fluidos dermatológicos, como pus e transpiração em feridas na pele, oxigenação da epiderme, barreira para fungos, bactérias e outros agentes externos e transporte ou transferência de água para/pela pele em casos de lesão ou, principalmente, queimaduras.<sup>10,104,113</sup> De maneira geral, um bom curativo deve manter o ambiente da ferida úmido. Os resultados do teste de permeação ao vapor de água obtidos para as diferentes membranas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Permeabilidade ao vapor de água ( $K_w$ ) para as membranas com diferentes formulações utilizando atmosfera saturada com NaCl (UR ~70%).

Formulação (n = 3)	$K_w$ ( $10^{-7}$ g m <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )
QTS pura	3,27 ± 0,46
QTS-F127	3,56 ± 0,16
QTS-P123	3,46 ± 0,51
QTS-CUR	4,02 ± 0,05
QTS-F127-CUR	4,32 ± 0,12
QTS-P123-CUR	4,23 ± 0,17

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

O  $K_w$  depende tanto da difusividade quanto da solubilidade das moléculas de água na matriz da membrana, sendo dependente da estrutura e morfologia desta, tornando-se geralmente maior quanto maior for a porosidade do material.<sup>104,147</sup>

Os dados obtidos pelo ensaio de permeabilidade ao vapor de água corroboram com dados dos experimentos de intumescimento, onde as formulações que apresentam valores maiores de  $K_w$  são as mesmas que obtiveram maior ganho de massa durante o intumescimento em pH 5,5: os formulados contendo PLU e CUR ( $K_w$  entre  $4,20 \times 10^{-7}$  e  $4,30 \times 10^{-7}$  g m<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) foram os que exibiram maiores permeabilidades, seguidos da formulação contendo apenas CUR ( $\sim 4,00 \times 10^{-7}$  g m<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) e as formulações sem o ativo ( $< 3,60 \times 10^{-7}$  g m<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>). Isso pode ser atribuído a presença dos copolímeros e da curcumina, que podem estar aumentando a porosidade e o espaçamento inter-cadeias das membranas, favorecendo a permeação de moléculas de água.<sup>148</sup> Indicando que a capacidade de intumescimento do material está intimamente ligada a habilidade de permear água.

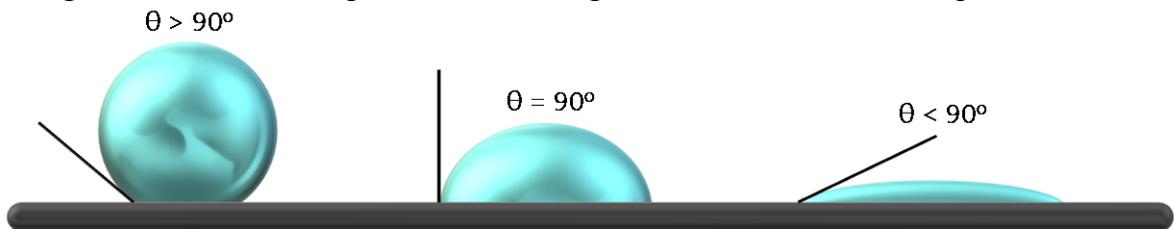
Assim, as moléculas de água se difundem através da membrana e ao mesmo tempo, os copolímeros atuam como umectantes e aumentam a capacidade de retenção de água na matriz polimérica. Como a quitosana possui boa absorção de umidade, a absorção e evaporação de água através da membrana para o ambiente ocorre continuamente.<sup>148</sup>

Pesquisas indicam que o modo de preparo, espessura, massa molar do polímero, solvente e grau de desacetilação podem influenciar na capacidade de permeação ao vapor de água na membrana polimérica.<sup>108,147</sup> Portanto é natural esperar que a capacidade de permeação do material produzido no presente trabalho possa apresentar valores relativamente diferentes dos encontrados na literatura. Park *et al.* (2002), por exemplo encontraram valores de  $K_w$  de aproximadamente  $1,15 \times 10^{-6}$  g m<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>.<sup>108</sup> Já Ghelejlu *et al.* (2016) encontraram valor próximo a  $1,01 \times 10^{-7}$  g m<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>, estando assim, mais de acordo com o encontrado no presente trabalho.<sup>147</sup>

### 3.11 MOLHABILIDADE POR ÂNGULO DE CONTATO

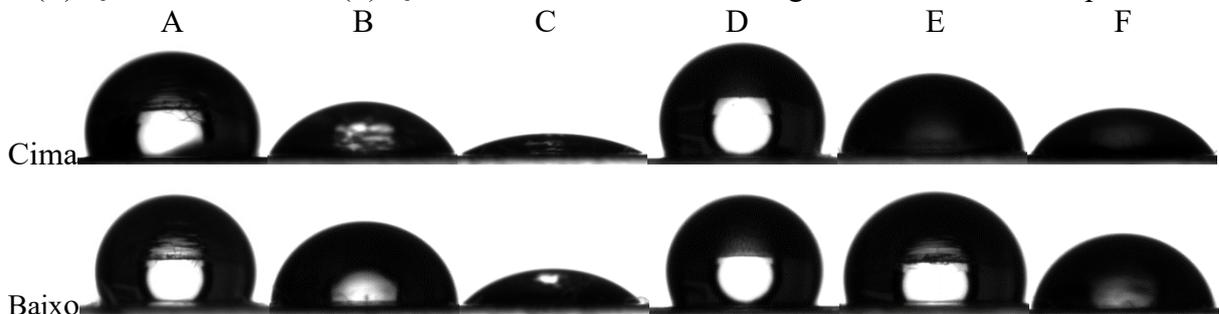
O ângulo de contato ocasionado pela deposição de uma gota de água na superfície de um material é uma boa medida da molhabilidade, e assim, da hidrofobicidade do material. Um ângulo de contato menor que  $90^\circ$  indica que a superfície é molhável, enquanto ângulos de contato maiores que  $90^\circ$  é indicativo de superfície hidrofóbica (Figura 40).<sup>104</sup> Durante o processo de cicatrização de tecidos avariados, as etapas de adesão celular, proliferação e biossíntese dependem muito da propriedade superficial do curativo. As células são mais propensas a se aderirem e proliferarem em curativos de pele mais hidrofílicos, onde o ângulo de contato esteja entre  $40$  e  $70^\circ$ .<sup>149</sup> A relação entre o ângulo de contato apresentado pela água e a propriedade de absorção dependem da rugosidade da superfície e da composição química da amostra. As medidas de ângulo de contato (Figura 41 e Tabela 10) realizadas no presente estudo foram feitas em ambos os lados das membranas, seguindo as evidências dos experimentos de FTIR.

Figura 40 - Formas e ângulo de contato de gotas de solvente em uma superfície sólida.



Fonte: figura elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 41 - Fotografias digitais das gotas adquiridas durante os ensaios de ângulo de contato das membranas de composição (A) QTS, (B) QTS-F127, (C) QTS-P123, (D) QTS-CUR, (E) QTS-F127-CUR, (F) QTS-P123-CUR utilizando água como solvente em pH  $\sim 7,0$ .



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 10 - Valores dos ângulos de contato das membranas a base de quitosana obtidas através da Figura 41.

Formulação (n = 5)	Ângulo de contato	
	Lado de cima	Lado de baixo
QTS	107,4 ± 1,3	110,4 ± 5,3
QTS–F127	54,9 ± 1,7	90,4 ± 1,1
QTS–P123	29,4 ± 0,3	50,8 ± 1,0
QTS–CUR	111,6 ± 2,4	115,4 ± 1,9
QTS–F127–CUR	79,4 ± 0,8	104,0 ± 3,1
QTS–P123–CUR	47,8 ± 1,1	58,3 ± 1,9

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

Os resultados dos experimentos das membranas a base de quitosana determinadas pelo ângulo de contato usando água como solvente são mostrados na Tabela 10. A amostra de QTS pura possui superfície levemente hidrofóbica, com valores muito semelhantes nos dois lados avaliados. A adição dos copolímeros à formulação resulta numa melhora considerável da molhabilidade das membranas, diminuindo significativamente o ângulo de contato da gota de solvente, principalmente para o lado de cima das membranas, podendo indicar uma concentração preferencial nesse lado do material durante o processo de secagem. A diminuição do ângulo de contato nas membranas contendo os plurônicos é devido a redução da tensão interfacial que compostos anfifílicos em geral ocasionam e, principalmente, por causa da presença das unidade PEO hidrofílicas na cadeia polimérica dos copolímeros P123 e F127, no qual possui elevada atração por moléculas de água.<sup>142</sup>

Trinca *et al.* (2017) fizeram uma série de formulações eletrofiadas contendo poli( $\epsilon$ -caprolactona), acetato de celulose, quitosana e poli(óxido de etileno), observando que a presença de PEO diminui o ângulo de contato de gotas de água, e portanto aumenta a molhabilidade superficial das fibras.<sup>104</sup> Efeitos análogos ocorreram nos estudos de Mirhosseini *et al.* (2016) ao eletrofiar uma mistura de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e P123, notando uma diminuição de mais de 120° para quase 0° com 5% em massa de P123 na formulação.<sup>150</sup>

Quando curcumina é adicionada às membranas de quitosana verifica-se um aumento do ângulo de contato em ambos os lados do material, principalmente no lado de baixo, sugerindo que a CUR deva estar se acumulando neste lado específico da membrana, confirmando os achados nas análises de FTIR. QTS–CUR exibe o maior ângulo de contato dentre as formulações preparadas em razão da maior hidrofobicidade apresentada pela curcumina, e portanto, menor interação com moléculas de água.<sup>120</sup> Aquelas membranas contendo CUR e PLUs em suas composições revelam maior molhabilidade que a formulação de QTS–CUR, porém menores que aquelas de composição QTS–PLU sozinhas, dado que

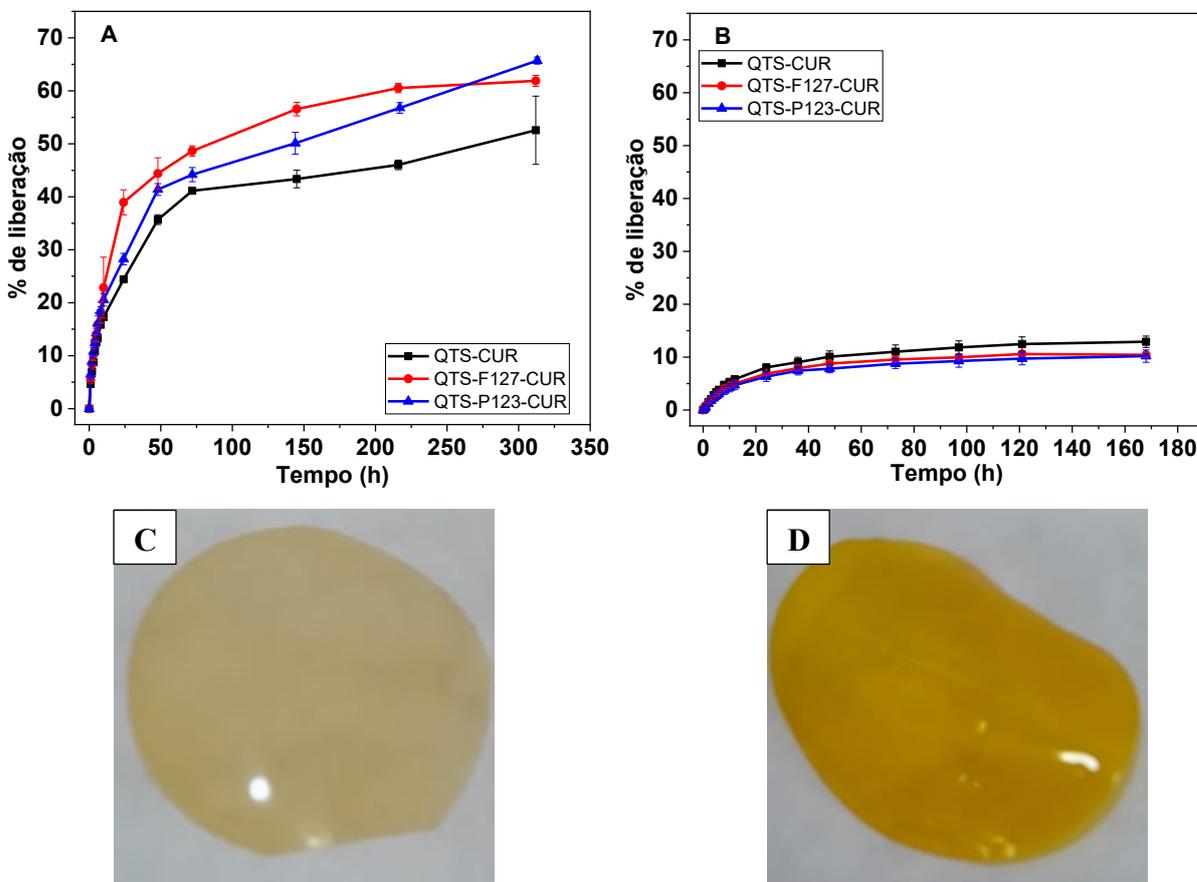
existe uma cooperação desses componentes para a propriedade físico-química superficial final das membranas a base de quitosana formuladas.

Embora o F127 tenha maior comprimento de cadeias PEO, fazendo com que aumente a absorção de água do filme, o P123 exibe menor CMC e TMC, resultando numa diminuição mais significativa da tensão interfacial (superficial) das membranas contendo esse copolímero.<sup>58,94,142</sup> Os dados de ângulo de contato não corroboram completamente com os resultados obtidos de permeabilidade, onde a adição de CUR às membranas aumentam tanto o ângulo de contato quanto a permeabilidade ao vapor de água. Isso ocorre em virtude de a primeira medida estar relacionada com a hidrofobicidade da superfície, enquanto a segunda estar associada a porosidade e arranjo das cadeias poliméricas do material como um todo.<sup>151</sup> Por fim, as membranas de composição QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR exibem ângulos de próximos ao ideal, que são entre 40 e 70°, sugerindo uma superfície com hidrofiliidade apropriada para o desenvolvimento de novos curativos para cicatrização de feridas e queimaduras.<sup>149</sup>

### 3.12 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA CUR A PARTIR DAS MEMBRANAS A BASE DE QTS

Os experimentos de liberação da CUR foram efetuados em meio PBS pH 5,5 contendo dois surfactantes diferentes: Tween 80 não iônico e surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) a fim de garantir a condição *sink* do meio de liberação. A condição *sink* impede que a concentração do ativo no meio de dissolução se aproxime da concentração de saturação. Os perfis de liberação da CUR a partir das membranas a base de QTS em ambos os meios são mostrados na Figura 42.

Figura 42 - Perfil de liberação da CUR a partir das diferentes formulações de membranas em tampão PBS (pH 5,5) contendo (A) Tween 80 (1,0% m/V) e (B) SDS (1,0% m/V). Imagens de uma das membranas após liberação em (C) Tween 80 e (D) SDS.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A Figura 42 evidencia que todas as amostras exibem melhor eficiência de liberação quando o meio de dissolução possui em sua composição Tween 80 (não iônico) que aquelas possuindo SDS (aniônico). As formulações submetidas a liberação em solução contendo Tween 80 apresentam eficiência de liberação entre 50 e 65%, enquanto aquelas submetidas à solução com SDS mostram liberação máxima de 13%. O Tween 80 não iônico não interfere no balanço de carga da QTS ou da CUR, preservando as características eletrostáticas dos componentes.<sup>152</sup> Por outro lado, o SDS aniônico (carregado negativamente) pode interferir na carga das aminas protonadas da QTS, diminuindo a repulsão eletrostática da cadeia emaranhada das membranas, compactando-as, diminuindo sua mobilidade molecular e restringindo a relaxação das cadeias poliméricas. Isso resulta na diminuição do espaçamento entre as cadeias e assim diminuindo a tendência ou capacidade de liberação da CUR para o meio de dissolução.<sup>153</sup> Desta forma, meios de dissolução contendo surfactantes aniônicos não se revelam bons sistemas para avaliar a liberação da CUR a partir de membranas ou outros sistemas a base de quitosana.

Em relação à liberação da CUR no meio contendo Tween 80 para as três formulações estudadas aqui, observou-se que a presença dos PLUs em suas composições fornece maior liberação cumulativa de CUR (~60%) comparados com sua formulação análoga sem os copolímeros (~50%). Isso reforça os resultados obtidos nas análises de intumescimento dos materiais, onde aquelas membranas contendo PLU em sua composição (QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR) exibem maior capacidade de intumescimento e, por conta disso, maior eficiência de liberação em comparação com aquela sem os copolímeros na formulação. Portanto, eficiência de liberação do ativo e capacidade de intumescimento das membranas a base de QTS estão intimamente relacionadas.<sup>154</sup>

A Tabela 11 traz o ajuste dos pontos experimentais de liberação da CUR para cinco diferentes equações cinéticas, mostrando as constantes cinéticas ( $k$ ),  $R^2$  e os parâmetros extras que dependem de cada equação.

Conforme mostra a Tabela, o mecanismo que melhor descreve a liberação da CUR para quase todos os sistemas é o modelo de Peppas-Sahlin, ainda que as curvas também se ajustem bem ao modelo de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas. Para o modelo de Korsmeyer-Peppas o expoente  $n$  está relacionado ao tipo de mecanismo de liberação seguido pelos materiais. Se  $n = 0,5$  a liberação é governada pela difusão (modelo Fickiano), neste caso a taxa de transporte do solvente é muito maior que o processo de relaxação da cadeia polimérica. Quando  $n = 1$  o modelo seguido é o não Fickiano, onde a taxa de liberação corresponde a equação de ordem zero e o mecanismo de liberação é dirigido pelos processos de intumescimento e relaxação das cadeias poliméricas. Esse é o outro extremo de comportamento. A difusão do solvente através do sistema é muito rápida em comparação ao processo de relaxamento da interface polimérica, que marca o limite interno de penetração ou dispersão do solvente em um determinado tempo. O terceiro caso (transporte anômalo) ocorre quando  $0,5 < n < 1$  e o mecanismo de liberação acontece com a sobreposição dos dois modelos anteriores, possuindo simultaneamente as etapas de difusão e intumescimento. O rearranjo das cadeias poliméricas, que ocorre lentamente, e o processo de difusão causam, simultaneamente, efeitos anômalos que dependem do tempo.<sup>155</sup>

Tabela 11 - Ajuste dos pontos experimentais de liberação da CUR a diferentes modelos cinéticos.

	Modelo cinético	Tween 80			
		k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	R <sup>2</sup>	Parâmetro extra*
QTS-CUR	Zero	0,22 ± 0,01	—	0,2655	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,016 ± 0,003	—	0,8297	55,2 ± 6,8
	Higuchi	3,6 ± 0,1	—	0,8522	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	5,9 ± 0,3	—	0,9187	0,41 ± 0,01
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	7,0 ± 0,2	-0,23 ± 0,04	0,9818	0,45
QTS-F127-CUR	Zero	0,276 ± 0,003	—	0,2244	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,017 ± 0,001	—	0,8435	65,2 ± 0,7
	Higuchi	4,47 ± 0,09	—	0,8282	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	8,6 ± 2,0	—	0,8857	0,37 ± 0,07
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	9,1 ± 0,7	-0,33 ± 0,06	0,9760	0,45
QTS-P123-CUR	Zero	0,268 ± 0,002	—	0,3614	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,014 ± 0,001	—	0,8294	69,0 ± 0,7
	Higuchi	4,26 ± 0,07	—	0,8986	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	8,7 ± 1,8	—	0,9690	0,36 ± 0,05
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	7,7 ± 0,5	-0,22 ± 0,04	0,9912	0,45
	Modelo cinético	SDS			
		k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	R <sup>2</sup>	Parâmetro extra*
QTS-CUR	Zero	0,110 ± 0,001	—	0,3987	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,003 ± 0,002	—	0,9393	13,5 ± 1,1
	Higuchi	1,3 ± 0,1	—	0,9162	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	1,0 ± 0,2	—	0,6769	0,60 ± 0,02
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	2,0 ± 0,2	-0,07 ± 0,01	0,9743	0,45
QTS-F127-CUR	Zero	0,093 ± 0,003	—	0,3309	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,033 ± 0,001	—	0,9400	11,1 ± 0,3
	Higuchi	1,04 ± 0,03	—	0,8920	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	0,90 ± 0,04	—	0,7116	0,57 ± 0,02
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	1,78 ± 0,09	-0,07 ± 0,01	0,9107	0,45
QTS-P123-CUR	Zero	0,087 ± 0,010	—	0,3564	—
	Primeira+F <sub>max</sub> <sup>a</sup>	0,031 ± 0,001	—	0,9167	10,7 ± 1,2
	Higuchi	1,0 ± 0,1	—	0,8953	—
	Korsmeyer-Peppas <sup>c</sup>	0,8 ± 0,3	—	0,6561	0,60 ± 0,07
	Peppas-Sahlin <sup>e</sup>	1,6 ± 0,3	-0,05 ± 0,03	0,9710	0,45

\*Parâmetro extra = <sup>a</sup> F<sub>max</sub>; <sup>b</sup> F<sub>0</sub>; <sup>c</sup> n; <sup>d</sup> n; <sup>e</sup> m.

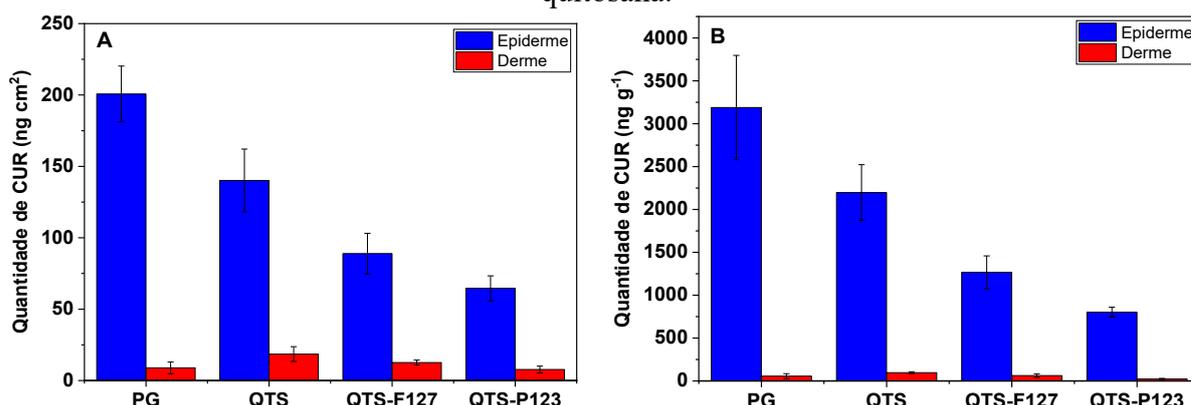
Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

Os valores de  $n$  para boa parte dos sistemas preparados e estudados no presente trabalho foram  $0,5 < n < 1,0$ , indicando comportamento de transporte anômalo onde a liberação da CUR envolve a contribuição simultânea da difusão e do intumescimento da amostra. Ou seja, a velocidade da difusão do solvente e a relaxação das cadeias poliméricas possuem magnitudes similares. O bom coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o modelo de Peppas-Sahlin confirma com o mecanismo proposto, uma vez que os dois mecanismos possuem correlação. O coeficiente exponencial  $m$  está relacionado com a difusão puramente Fickiana. Se o mecanismo de relaxação é negligenciável, o valor de  $n$  e  $m$  das Equações 21 e 22 devem ser iguais. A diferença desses expoentes sugere que o mecanismo de liberação da CUR depende da difusão e do intumescimento, como discutido acima.<sup>155</sup>

### 3.13 ENSAIO DE PERMEACÃO *EX VIVO* DA CUR EM PELE HUMANA

Os experimentos de permeação *ex vivo* tiveram como objetivo verificar e quantificar a permeação da curcumina em pele abdominal humana a partir das membranas a base de quitosana formuladas. Baseando-se nos resultados obtidos nas análises de FTIR e ângulo de contato, os ensaios de permeação (Figura 43) foram realizados tomando-se o cuidado de adicionar o lado de baixo (fosco) das membranas em contato com as peles acomodadas às câmaras de Franz (Figura 28).

Figura 43 - Quantidade de CUR (A) em área e (B) em massa permeada através da pele humana a partir da solução controle em propileno glicol (PG) e das membranas a base de quitosana.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A baixa absorção da CUR pela pele e a baixa solubilidade deste composto em meio aquoso acabam limitando os ensaios de permeação com a CUR livre em solução fisiológica. Por esse motivo, solubilizadores farmacêuticos foram empregados para manter a condição *sink* do sistema. A solução controle positiva utilizada foi em propileno glicol (PG) e o meio utilizado na câmara coletora foi uma mistura de tampão PBS/etanol 70:30 com pH 7,4.<sup>117,118</sup>

A partir da Figura 43 observa-se que em todos os casos a CUR é retida em uma quantidade significativamente maior na epiderme do que na derme, mesmo a derme possuindo massa consideravelmente maior em relação a epiderme. Indicando que a CUR, ou interage mais com as células da epiderme ou o composto não exibe capacidade de difusão elevada nas camadas da pele, causando baixa penetração nas camadas mais profundas do tecido epitelial.<sup>118</sup>

Em relação às diferentes membranas a base de quitosana formuladas e o controle positivo (CUR em PG), verifica-se que o controle positivo exibe retenção consideravelmente maior na epiderme ( $\sim 200 \text{ ng cm}^2$ ) em comparação com todas as membranas de QTS, incluindo aquelas contendo os copolímeros. A capacidade de permeação e retenção na epiderme é seguida pelas membranas compostas por QTS–CUR, QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR, sendo essa última retida apenas na quantidade de  $\sim 75 \text{ ng cm}^2$ . Esse comportamento pode ser explicado com base na diferença de potencial químico e solubilidade da CUR na matriz de QTS, nos PLUs e na pele. A maior permeação da CUR quando em propileno glicol é coerente, uma vez que o composto se encontra na sua forma livre em meio líquido, facilitando sua difusão para dentro do tecido humano. Enquanto que nos formulados, as membranas precisam primeiro intumescer para depois ocorrer a difusão do ativo para a pele.<sup>117</sup> A solubilidade da CUR na QTS não é muito significativa, fazendo com que a CUR experimente um potencial químico elevado, resultando na sua maior permeação na epiderme. Em contrapartida, nas membranas que contém os copolímeros a solubilidade da CUR é consideravelmente maior em relação àquela sem os PLUs, diminuindo a diferença de potencial químico sofrido pela CUR entre as membranas de QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR e a epiderme, promovendo menor grau de permeação no tecido frente à membrana de QTS–CUR. Como a interação entre CUR–P123 é maior que entre CUR–F127, como visto nos experimentos descritos no item 3.5 do Capítulo II, isso faz com que a permeação da curcumina na membrana contendo o P123 seja a mais baixa dentre as formulações.

Além disso, estudos indicam que as micelas apesar de aumentarem a solubilidade e a disponibilidade de compostos hidrofóbicos, diminuem a capacidade de permeação desses compostos. Como visto na Tabela 4 e 5 (item 3.5 do Capítulo II) a CMC e TMC do P123 é consideravelmente menor que o F127, desta forma, a probabilidade a curcumina estar encapsuladas em micelas de P123 é consideravelmente maior. Adicionalmente, durante o experimento o F127 pode estar na sua forma não associada (unímeros), já que a difusão desse copolímero à partir da membrana é lenta, exibindo interação fraca com a CUR e favorecendo a permeabilidade deste composto no tecido estudado.<sup>58,94</sup> Outra informação relevante é que o volume de PBS adicionado nas membranas para que ocorra o pré intumescimento é pequeno

(100  $\mu\text{L}$ ), ocasionando a evaporação desta solução em tempo curto. Assim, a umidade utilizada pelas amostras para ocorrer o intumescimento das membranas e liberação da CUR é toda proveniente da pele.

No que se refere a retenção do ativo na camada da derme, verifica-se que todas as amostras exibem valores abaixo de 20  $\text{ng cm}^2$ . A retenção apresentada pelo controle positivo é menor que as membranas, com exceção daquela que contém P123 em sua formulação.

Embora a CUR possa ser absorvida pela pele, como mostrado na Figura 43, ela não pôde ser detectada na câmara receptora no decorrer e ao final do estudo para todas as amostras.<sup>118</sup> Duas possibilidades para explicar esse fenômeno foram levantadas, (i) a baixa liberação *in vitro* da CUR a partir das membranas de QTS, o que levaria a uma detecção limitada pelo fluorímetro, (ii) ou a forte interação da CUR com os componentes (proteínas, gordura, organelas, etc) das camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme) que acaba impedindo a difusão do composto através das camadas até a câmara receptora contendo a mistura PBS/etanol. Apesar de não ser possível dizer com rigor qual dos dois fatores é o responsável pelo comportamento descrito acima, pode-se propor de forma coerente que a segunda possibilidade é a mais plausível, uma vez que, como visto na Figura 43, a CUR permanece retida em uma proporção expressivamente maior na epiderme em comparação com a derme.

Devido a diferença de complexidade entre os meios de dissolução e permeação, foi verificado baixa correlação entre os experimentos *ex vivo*–*in vitro*. A liberação *in vitro* foi realizada em solução tampão contendo surfactante, o que auxilia no processo de liberação do ativo, sendo uma matriz pouco complexa. Enquanto que em pele humana as membranas intumescem pouco e a matriz celular é muito mais complexa, dificultando a correlação entre os dois experimentos.

A carga positiva das cadeias da QTS podem promover os fenômenos de interação eletrostática, aumentando as interações com o estrato córneo carregado negativamente, devido a presença de resíduos –OH de ceramidas e ácidos carboxílicos das proteínas e lipídeos da pele.<sup>156</sup> Um comportamento oposto deve ser observado para a CUR devido as cargas parciais negativas fornecidas pelos átomos de oxigênios em sua estrutura química, no qual reduz as interações com as camadas superficiais e, assim, contribuindo na justificativa da sua baixa permeação e concentração através da pele. Resultados semelhantes foram verificados nos experimentos de liberação *in vitro* quando utilizado SDS como agente solubilizador no propósito de manter a condição *sink* do meio de dissolução.<sup>152</sup>

Estudos de permeação da CUR efetuados em pele de orelha de porco conduzidos por Caon *et al.* (2017) mostrou que partículas não iônicas podem reduzir a repulsão eletrostática,

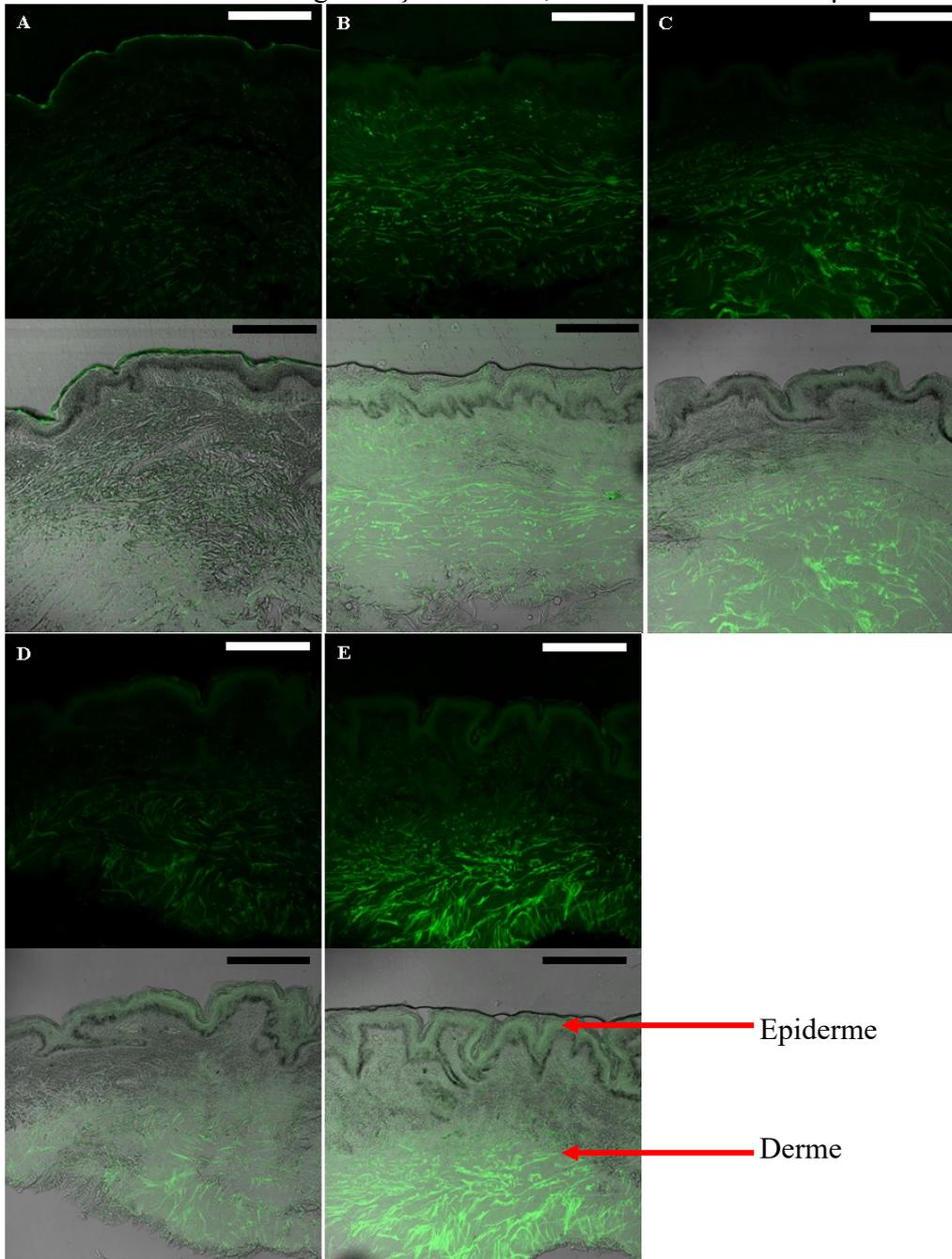
contribuindo para níveis mais altos de interações químicas entre partículas e os componentes da superfície da pele, aumentando a retenção do composto nesse tecido. Os autores também observaram que a retenção das partículas poliméricas não iônicas carregadas com CUR reduziram a permeação do composto nas camadas mais profundas, estando de acordo com nossos resultados. Nesse mesmo estudo, eles obtiveram uma quantidade retida de CUR na ordem de  $\mu\text{g}$ , muito maior que nossos ensaios. No entanto, a complexidade cutânea e o emprego de tratamento na pele anterior ao experimento, como por exemplo, escaaldamento ou retirada de camadas superficiais da pele podem ajudar a explicar a discrepância dos resultados obtidos entre os estudos de Caon *et al.* (2017) e os deste trabalho.<sup>118</sup>

### 3.14 MICROSCOPIA CONFOCAL DAS AMOSTRAS DE PELE SUBMETIDAS À PERMEACÃO

As amostras de pele sujeitas ao ensaio de permeação da CUR a partir das membranas de quitosana e controle positivo (CUR em PG) foram submetidas à microscopia confocal com o objetivo de avaliar qualitativamente como a CUR está retida em cada camada da pele. As amostras foram excitadas em 488 nm com 40% de intensidade de luz e observadas na região entre 500–580 nm, como mostrado Figura 44. As imagens superiores mostram apenas as microscopias das amostras de pele obtidas por fluorescência e as imagens inferiores mostram a sobreposição das microscopias obtidas em campo claro e por fluorescência.

As análises de microscopia confocal confirmaram os resultados relacionados a distribuição da CUR na pele humana. A pele pura exibe fluorescência modesta na região da derme, com sinais ligeiramente mais pronunciados na região da epiderme, resultantes da fluorescência natural das proteínas encontradas nesse tecido, uma vez que não há CUR nessa amostra. Todas as amostras contendo CUR exibem fluorescência significativa em ambas as regiões (derme e epiderme), contudo, os sistemas exibem níveis mais altos de intensidade de fluorescência na epiderme do que na derme.<sup>118</sup>

Figura 44 - Imagens de microscopia confocal para secções de 20  $\mu\text{m}$  de (A) pele humana pura, e pele permeada pela CUR a partir de (B) solução de propileno glicol e das membranas formuladas contendo (C) QTS-CUR, (D) QTS-F127-CUR e (E) QTS-P123-CUR; Magnificação de 200x, as barras indicam 200  $\mu\text{m}$ .



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

O sistema formado por CUR dissolvido em propileno glicol possui sinais de fluorescência em uma região mais ampla que as diferentes membranas a base de QTS, com exceção da membrana composta por QTS-P123-CUR.<sup>117</sup> A formulação de QTS-P123-CUR exibiu a menor retenção na pele, porém a maior intensidade de fluorescência em comparação com as outras membranas a base de QTS. Como visto no Capítulo II, para uma amostra

contendo a mesma quantidade de CUR e quantidades similares de F127 e P123, a formulação P123–CUR exibe intensidade de fluorescência expressivamente maior em relação ao seu correlato formado por F127, devido à polaridade do micro ambiente experimentado pela CUR ser menor no P123 do que no F127. Indicando que os dados de permeação *ex vivo* e as microscopias confocais não são diretamente correlacionáveis, uma vez que a intensidade de emissão obtida nos estudos de confocal não são diretamente proporcionais à concentração de CUR nas camadas do tecido.<sup>152</sup>

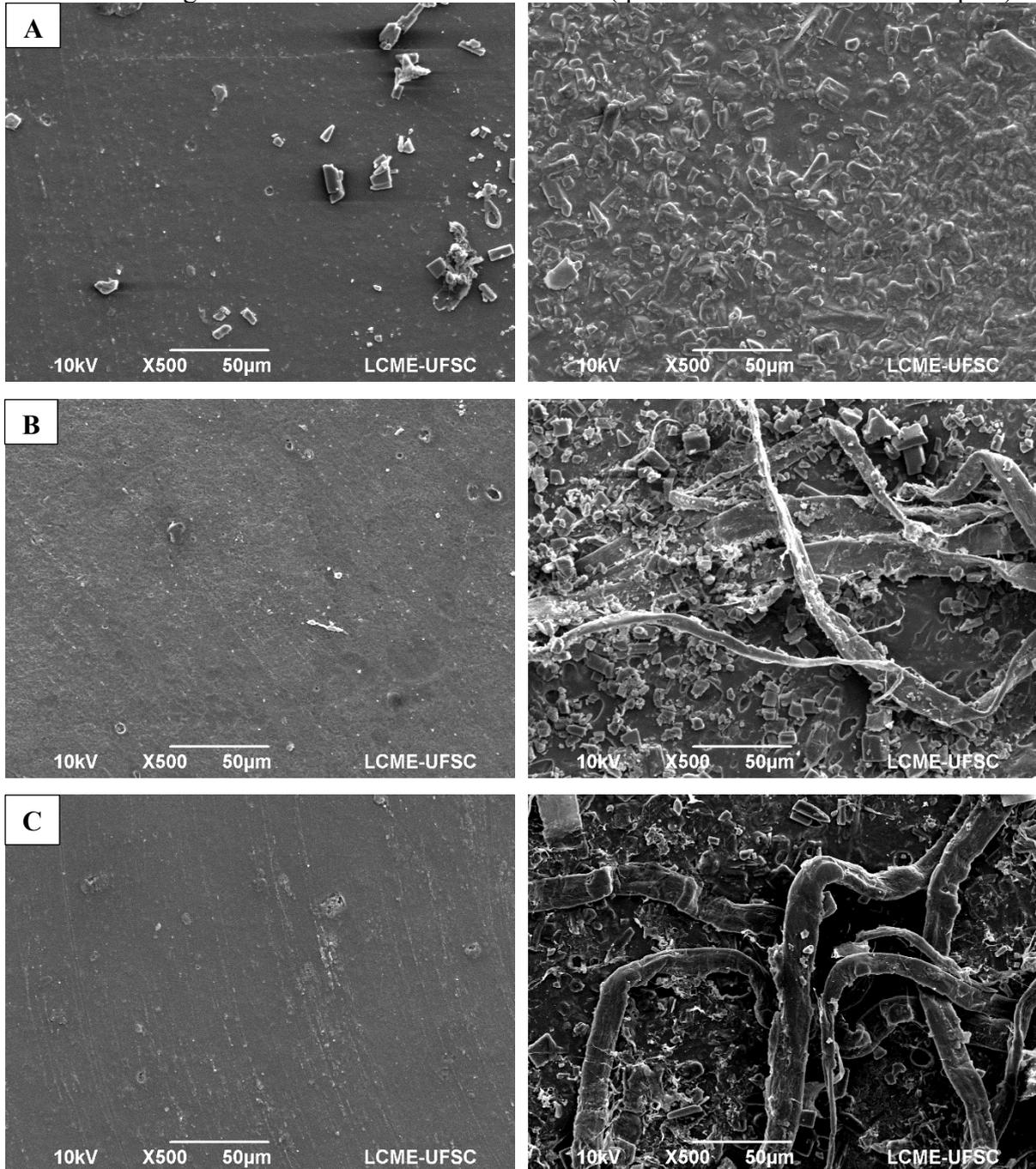
Não foram observadas alterações significativas na morfologia das amostras de pele após o experimento de permeação analisadas por microscopia, sugerindo uma baixa influência ou impacto das formulações nas diferentes camadas da pele abdominal humana.

### 3.15 MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS PÓS PERMEACÃO

As morfologias superficiais para ambos os lados (cima e baixo) das membranas a base de quitosana obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) após os ensaios de permeação em pele humana são mostradas na Figura 45.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que as morfologias das membranas sofrem alterações consideráveis quando a região que ficou em contato com a pele (direito) e a região que não ficou em contato (esquerdo) são comparadas. Aquelas que não ficaram em contato com a pele humana mostraram superfícies virtualmente lisas e sem sinais de deterioração. Apenas a amostra formada por QTS–CUR apresenta alguns cristais em sua superfície, provavelmente advindo de CUR não totalmente solubilizada na matriz.

Figura 45 - Imagens de SEM das membranas contendo (A) QTS–CUR, (B) QTS–F127–CUR e (C) QTS–P123–CUR após o experimento de permeação; à esquerda estão as imagens do lado de cima das membranas (que não ficaram em contato com a pele) e à direita as imagens do lado de baixo das membranas (que ficaram em contato com a pele).



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

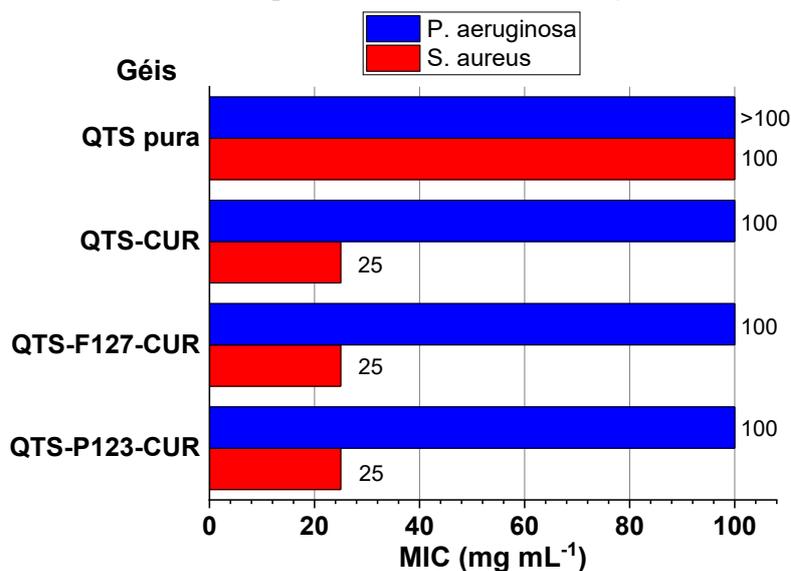
Os lados das membranas que permaneceram em contato com a pele durante os ensaios mostram transformações significativas em suas superfícies. A deterioração (ou degradação) das amostras é nitidamente visível, principalmente naquelas membranas de QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR, onde pode ser observado o surgimento ou o desprendimento de alguns

filetes da matriz polimérica. Parece que os plurônicos de alguma forma auxiliam no processo de deterioração da matriz polimérica, talvez devido a ação desses copolímeros na separação entre as cadeias da QTS, facilitando a interação e ação de enzimas presentes na pele humana e causando a erosão das membranas. É importante destacar que o fenômeno de erosão/deterioração em filetes na matriz não é observado durante a liberação *in vitro* da CUR à partir das membranas, como demonstrado na Figura 39, indicando que as enzimas presentes na pele devam ser as responsáveis por esse comportamento erosivo. Isso também pode ajudar a esclarecer o motivo de os resultados de permeação não estarem totalmente de acordo com os de liberação *in vitro*.<sup>157,158</sup>

### 3.16 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) ATRAVÉS DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

Quando ocorre uma lesão à pele tanto por queimaduras quanto por feridas, aumenta a susceptibilidade a infecção bacteriana, causando problemas secundários e aumentando o tempo de tratamento de pacientes.<sup>1,2</sup> No propósito de verificar a ação bactericida das formulações a base de quitosana contendo curcumina, escolheu-se cepas de duas bactérias modelo. As bactérias testadas foram a Gram-positiva (+) *Staphylococcus aureus* e a Gram-negativa (–) *Pseudomonas aeruginosa*. Como a metodologia selecionada para a execução do estudo *in vitro* foi a de microdiluição, não foi viável empregar as membranas diretamente, uma vez que não é possível realizar microdiluições desse tipo de material. Optou-se, portanto, pelo emprego dos géis das formulações (preparados para a secagem) como material bactericida. As proporções utilizadas para a preparação dos géis foram as mesmas que as adotadas para a preparação das membranas, conseqüentemente, as ações dos géis devem ser equivalentes às das membranas. A Figura 46 mostra os resultados de MIC para ambas as bactérias.

Figura 46 - Concentração inibitória mínima (MIC) dos géis a base de quitosana determinados *in vitro* pelo método de microdiluição.



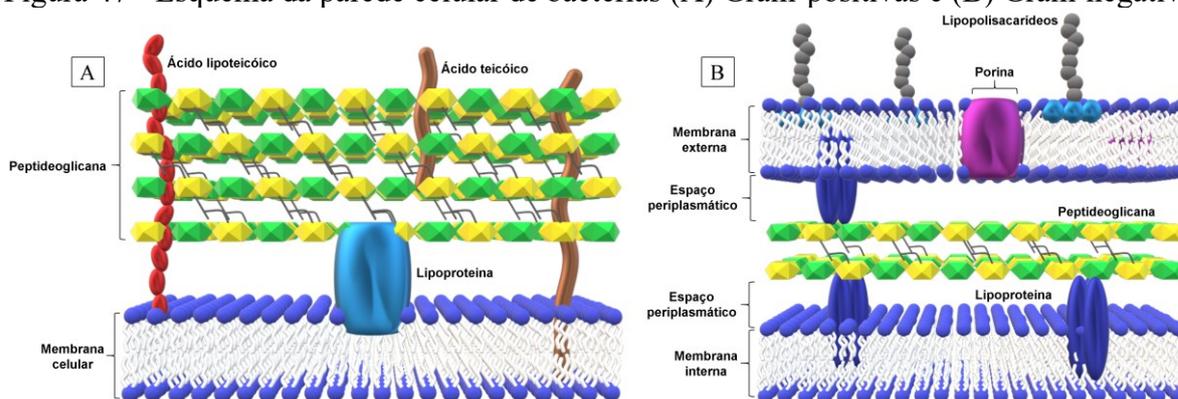
Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Nota-se que a quitosana pura (controle) não exibiu atividade, nas concentrações utilizadas, contra a bactéria Gram (-) *P. aeruginosa* e apenas na maior concentração (100 mg mL<sup>-1</sup>) contra a Gram (+) *S. aureus*. A presença de CUR aumentou a atividade dos géis contra ambas as bactérias, apresentando valores de MIC de 25 e 100 mg mL<sup>-1</sup> contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Observou-se também que a presença dos copolímeros não afetou consideravelmente a atividade dos géis a base de quitosana, mesmo os plurônicos melhorando a solubilidade da CUR, como visto no Capítulo II deste trabalho. É importante destacar que as concentrações dos componentes no gel nessas concentrações equivalem, na verdade, a QTS = 2,0 mg mL<sup>-1</sup> e CUR = 0,25 mg mL<sup>-1</sup> quando 100,0 mg mL<sup>-1</sup> de gel e QTS = 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e CUR = 62,5 µg mL<sup>-1</sup> quando 25,0 mg mL<sup>-1</sup> de gel. Os valores encontrados no presente estudo foram relativamente menores que os apresentados por Gunes *et al.* (2013)<sup>159</sup> e outros autores.<sup>160</sup>

Os diferentes resultados obtidos comparando-se os modelos de bactérias Gram (+) e Gram (-) então condizentes, já que as bactérias Gram-positivas possuem maior susceptibilidade a ativos em geral e tanto a QTS quanto a CUR apresentam maior atividade contra bactérias Gram-positivas. Em ambas as bactérias, a membrana plasmática é contornada e protegida por uma bicamada de fosfolípido (Figura 47). Nas bactérias Gram (+), esta bicamada é contornada por peptídeoglucana onde os ácidos lipoteicóico e teicóico, se ancoram por ligações covalentes. Por outro lado, as Gram (-) possuem parede celular mais complexa, onde além da camada de peptídeoglucana que contorna a bicamada fosfolípida, há uma membrana externa composta por bicamada lipídica, onde encontram-se as porinas, canais

proteicos que atuam na difusão de pequenas moléculas, e os lipopolissacarídeos que são responsáveis pelo choque septicêmico nos organismos humanos.<sup>73,161</sup> Desta maneira, os lipopolissacarídeos e as porinas presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas dificultam a permeabilidade da CUR assim como dos antibióticos

Figura 47 - Esquema da parede celular de bactérias (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas.



Fonte: Figura adaptada de Brown *et al.* (2015).<sup>73</sup>

Tentou-se realizar estudos *in vitro* da atividade bactericida das membranas a base de quitosana por meio do método do halo de inibição, entretanto não se observou atividade para nenhuma das formulações preparadas. A resposta negativa das membranas contra as bactérias testadas pela técnica do halo de inibição deve estar associada com a baixa capacidade de difusão da curcumina em meios gelatinosos como, no caso, o ágar Müller-Hinton.

De maneira geral, as membranas a base de quitosana exibem características favoráveis à interação e incorporação da curcumina. No entanto, além das interações entre os constituintes das formulações serem consideravelmente fortes, notavelmente ocorre certa demora na erosão da matriz de QTS vistas nos ensaios de liberação *in vitro* e na permeação *ex vivo*. A elevada massa molar da quitosana pode ser a responsável por esse comportamento.<sup>156</sup> O aumento da área superficial das amostras através do método de eletrofição das soluções à base de QTS ou o recobrimento de um outro polímero eletrofiado pelas soluções de QTS–PLU–CUR podem ser uma estratégia para auxiliar na liberação da CUR ou, ao menos, servir como matriz de suporte com maior alongação que a QTS, facilitando a manutenção do curativo e diminuindo o custo de produção pelo uso de uma menor camada de solução filmogênica.

#### 4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Com os dados obtidos nesta sessão verificou-se que a quitosana exibe boas propriedades para a incorporação e liberação da curcumina. As amostras sem os copolímeros mostram vestígios de cristais de CUR não solubilizados, onde puderam ser observados por microscopia confocal. Aquelas com os copolímeros se mostram bem mais fluorescentes e com matriz mais bem dispersa.

Espectros de FTIR apontam interação entre os grupos  $-OH$  da CUR e os grupos  $-NH_3^+$  da QTS protonada. Assim como visto nas fotografias digitais, o ativo tende a se acumular preferencialmente no lado de baixo das membranas, sendo comprovado tanto por FTIR quanto pela técnica de ângulo de contato de gotas de água. A presença dos copolímeros diminui significativamente o ângulo de contato das membranas a base de QTS, permanecendo próximos aos valores ideais ( $40-70^\circ$ ) sugeridos para aplicação como curativo.

Análises termogravimétricas indicam que a adição dos copolímeros e da curcumina à matriz de quitosana torna o sistema mais estável termicamente, isso ocorre em virtude da maior estabilidade térmica dos PLUs frente à QTS e a CUR.

Os valores de  $T_g$  da QTS também sofrem mudanças devido à presença dos aditivos. Infelizmente não foi possível observar as possíveis mudanças nos valores de  $T_g$  da QTS nas composições QTS-CUR, QTS-F127-CUR e QTS-P123-CUR dado que o processo de fusão da CUR ocorre na mesma região de temperatura da  $T_g$  da matriz, suprimindo a visualização da  $T_g$  desta. As amostras de composição QTS-F127-CUR e QTS-P123-CUR possuem menor módulo de elasticidade e maior alongamento máximo comparado àquela composta por QTS-CUR, entretanto, são mais rígidas e menos plásticas que a membrana de QTS pura. Os valores de  $T_m$  dos PLUs diminuíram quando esses foram adicionados às formulações, indicando que a cristalinidade desses copolímeros é influenciada pelas cadeias da QTS. Também não foi possível observar as possíveis mudanças nos valores de  $T_g$  da QTS nas composições QTS-F127-CUR e QTS-P123-CUR, entretanto, ocorre um deslocamento para valores ainda menores de  $T_m$  dos copolímeros nessas formulações, corroborando os dados de tração.

A capacidade de intumescimento e liberação da CUR são aumentadas com a presença dos copolímeros nas formulações. Esse comportamento ocorre porque os copolímeros ajudam a solubilizar o ativo, além de aumentarem o volume livre entre as cadeias da QTS, fazendo com que moléculas de água consigam se difundir com maior facilidade para o interior da matriz. Adicionalmente, os grupos EO presentes na estrutura de ambos os copolímeros possui alta

capacidade de absorção de água, o que auxilia no aumento significativo do intumescimento das membranas de QTS.

As formulações contendo curcumina apresentaram atividade bactericida contra cepas de bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*), exibindo concentração inibitória mínima de 25 e 100 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os estudos de permeabilidade em pele abdominal humana mostram que as membranas a base de quitosana/plurônico contendo curcumina têm potencial para se tornar um curativo emergente. A CUR quantificada por fluorescência e observada qualitativamente por microscopia confocal exibe maior acúmulo na epiderme que na derme. Imagens de SEM indicam que as membranas de QTS são parcialmente desintegradas por enzimas presentes na pele.

O presente capítulo proporcionou o entendimento das propriedades de matrizes de quitosana contendo curcumina e forneceu indícios de como melhorar a formulação e diminuir custos de produção. O próximo capítulo aborda a produção de uma matriz tridimensional eletrofiada de acetato de celulose recoberta com fina camada de solução filmogênicas a base de QTS.

# **CAPÍTULO IV**

**Desenvolvimento e caracterização de fibras eletrofiadas a base de acetato de celulose recobertas com camada de solução filmogênica de quitosana/plurônico contendo curcumina**

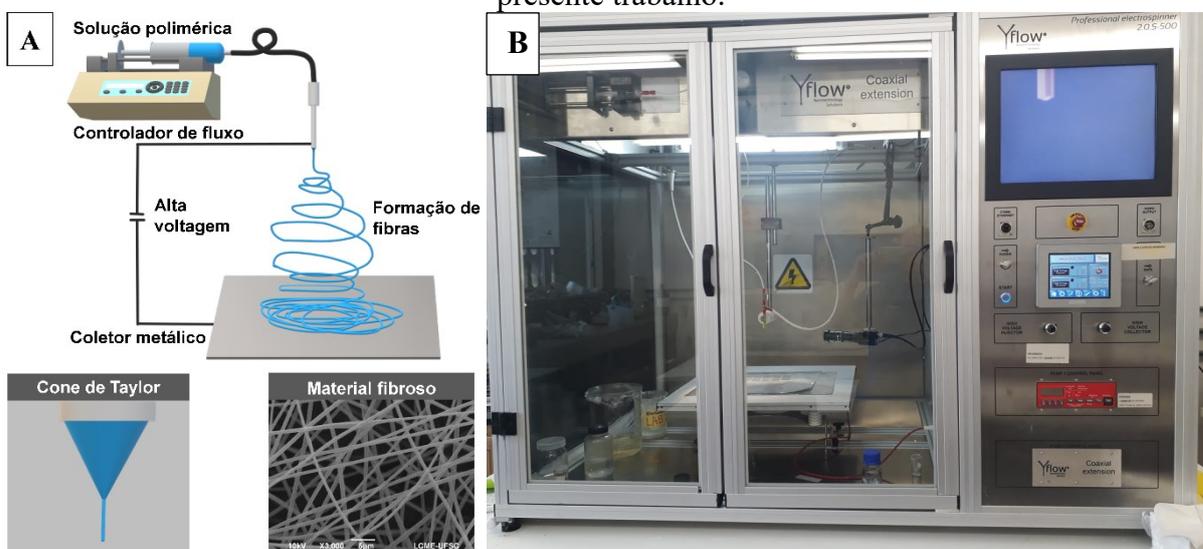
## 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Com os resultados observados no Capítulo III verificou-se que, as membranas produzidas exibem liberação lenta e permeabilidade relativamente baixa de CUR. Afim de aumentar a área superficial das amostras à base de QTS e melhorar as propriedades físico-químicas gerais das formulações produzidas outras abordagens, além da secagem de solvente, têm sido empregadas. Dentre elas, a técnica de eletrofiação vêm ganhando destaque devido sua aplicabilidade numa ampla gama de aplicações biomédicas, como liberação controlada de medicamentos, curativos para feridas e enxertos vasculares. Esta técnica está sendo utilizada com sucesso na produção de fibras de diversos polímeros, apresentando diâmetro de fibras controladas na escala micro ou nanométrica, resultando em potencial aumento da superfície de contato. Como consequência da relação área/volume, exibe alta porosidade e baixo diâmetro de fibras formadas, podendo assim ocasionar aumento da taxa de dissolução da QTS.<sup>104,162</sup>

Um eletrofiador consiste em uma bomba de vazão, na qual uma seringa contendo solução relativamente viscosa de polímero (ou polímero fundido) é acoplada, a ponta da agulha metálica da seringa é conectada a um aparato coletor metálico, aterrado, por meio de uma fonte de alta tensão (Figura 48). Ao se aplicar um valor de tensão elétrica elevada ( $> 6$  kV) na ponta da agulha (injetor), resulta em uma diferença de potencial (DDP) entre o injetor e o aparato coletor. Ao aumentar a DDP, a gota da solução polimérica, que é passada pela agulha a um fluxo controlado, sofre deformação em direção ao coletor, fazendo com que a gota assumira forma aproximadamente cônica, formando o chamado cone de Taylor.<sup>162,163</sup>

Quando, ao aplicar-se uma tensão ainda maior, o campo elétrico atinge um valor crítico, as forças elétricas vencem a tensão superficial e a ponta do cone rompe-se ejetando a solução rumo ao coletor em forma de finos fios. Durante o caminho ao coletor, o solvente evapora e as fibras poliméricas são depositadas aleatoriamente no coletor metálico (Figura 48).<sup>162,163</sup>

Figura 48 – (A) Esquema geral do aparato instrumental para a fabricação de fibras eletrofiadas a partir de uma solução polimérica e (B) fotografia do equipamento utilizado no presente trabalho.



Fonte: figura adaptada de Kalantari *et al.* (2019).<sup>162</sup>

Apesar de parecer simples a obtenção de fibras eletrofiadas, o sucesso em alcançar a formação de fibras uniformes depende de diversos fatores. Parâmetros importantes para o processo de eletrofiação não são apenas propriedades de polímeros e soluções, como massa molar, viscosidade, condutividade e tensão superficial, mas também condições do eletrofiador, como tensão elétrica aplicada, distância agulha-coletor, fluxo de solução, etc; ou ainda parâmetros ambientais difíceis de controlar, como a temperatura e umidade relativa do ar.<sup>163</sup>

### 1.1 PARÂMETROS DA SOLUÇÃO

De maneira resumida, tensões superficiais muito altas dificultam a formação do cone de Taylor, levando a descontinuidade e instabilidade na prospecção da solução. À medida que a tensão superficial é reduzida, a formação do cone é facilitada e ocorre diminuição na tendência da presença de partículas (*beads*), em contrapartida pode levar a um aumento do diâmetro das fibras.<sup>164,165</sup>

A concentração do polímero influencia o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas, uma concentração mínima de polímero é necessária para se obter fibras, normalmente ao aumentar a concentração do polímero aumenta-se também o diâmetro das fibras. Quanto maior for a interação polímero-solvente, maior será a viscosidade da solução polimérica, em uma solução pouco viscosa o grau de emaranhamento entre as cadeias do polímero é menor, quando é aplicada a DDP no injetor, o solvente alonga-se sem ser capaz de arrastar as cadeias do polímero. Entretanto, viscosidade muito elevada tende a não ser possível

formar fibras pela dificuldade de prospecção da solução, desta maneira, a viscosidade deve ser adequada: nem muito alta, nem muito baixa.<sup>164,165</sup>

É necessário que a solução possua condutividade elétrica, soluções sem condutividade não são possíveis de eletrofiar. Solventes com constantes dielétricas menores do que 15 não são adequados para a eletrofição, já que não permitem boa interação com o campo elétrico, soluções com maiores valores de constante dielétrica tendem a distribuir a densidade de carga na superfície mais uniformemente. Desta forma, essas soluções possuem menor incidência de *beads* e o diâmetro das fibras é geralmente reduzido.<sup>164,165</sup>

## 1.2 PARÂMETROS DO EQUIPAMENTO

Em relação aos parâmetros do processo de eletrofição, a voltagem aplicada está relacionada com a migração de cargas para a superfície do jato e afeta o diâmetro das fibras. Quando se aumenta a voltagem aplicada no injetor, o diâmetro das fibras diminui, pois favorece o alongamento da solução em virtude das forças coulombianas que atuam no jato. Em contrapartida, voltagens muito altas influenciam a estabilidade do cone e aumentam a dispersidade e o diâmetro das fibras.<sup>164,165</sup>

Para manter a integridade das fibras é necessário que o solvente evapore durante o tempo de “voo” até o coletor, solvente remanescente nas fibras faz com que as fibras coalesçam e percam a sua forma. Assim, a distância entre agulha e coletor deve ser suficiente para garantir que esse fenômeno não ocorra. A distância também está ligada a força do campo elétrico, quanto maior a distância menor a influência do campo ao longo do jato, aumentando a dispersidade e diâmetro do material formado.<sup>164,165</sup>

A taxa de vazão de solução está interconectada com a DDP aplicada, é necessária uma taxa mínima suficiente para alimentar o jato da eletrofição sem que a solução seque na ponta da agulha. No entanto, vazões muito altas não permitem a completa evaporação do solvente durante a trajetória agulha-coletor, fazendo com que as fibras coalesçam ainda durante o voo ou no coletor.<sup>164,165</sup>

Em geral, altas umidades desfavorecem a formação de fibras, principalmente de polímeros hidrossolúveis, pois impede a evaporação completa do solvente. Em contrapartida, a falta de umidade pode favorecer a evaporação muito rápida do solvente e entupir a agulha do injetor antes mesmo de formar o jato. Para polímeros não hidrossolúveis a presença de umidade pode favorecer o aparecimento de poros nas fibras. A temperatura influencia a viscosidade e tensão superficial da solução de eletrofição.<sup>166</sup>

### 1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ELETROFIAÇÃO DOS POLÍMEROS QTS E AC

A eletrofiação de polímeros naturais carregados, como a quitosana, é mais difícil do que o processo realizado com polímeros sintéticos. A alta densidade de carga positiva da QTS, resultado do grande número de grupos amino presente na estrutura do polímero, que se repele fortemente durante o processo de eletrofiação, impede a formação de um jato estável. Além disso, há a necessidade de se utilizar solventes perigosos e altamente tóxicos, como ácido trifluoroacético, tetrahidrofurano, hexafluoroisopropanol, diclorometano ou ácido acético muito concentrado.<sup>163</sup> Esses solventes orgânicos são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, e o ácido acético em altas concentrações é irritante e prejudicial, necessitando de uma boa exaustão para evitar contaminações. O que geralmente é empregado nesses casos são modificações estruturais na quitosana ou misturas com polímeros sintéticos com fácil formação de fibras, como o PEO por exemplo.<sup>104,162,163</sup>

Desta maneira, a obtenção de fibras a base de quitosana continua sendo um desafio na área de engenharia de tecidos, uma vez que há a necessidade de encontrar solventes menos prejudiciais à saúde e que atuem de forma efetiva no processo de produção de fibras.<sup>163,162</sup> Outros biopolímeros, como o acetato de celulose (AC), podem ser eletrofiados de maneira mais fácil e sem a necessidade da utilização de solventes tão agressivos a saúde, podendo ser eletrofiado com acetona, por exemplo.

Uma propriedade tanto positiva quanto negativa do acetato de celulose é sua insolubilidade em água e alta solubilidade em acetona. A baixa solubilidade em água impede a utilização do AC como membrana que se dissolve em meio fisiológico, além de impossibilitar o uso de um solvente (água) que não apresenta qualquer risco ao possível paciente. Em contrapartida, o fato de não se dissolver em meio aquoso concede ao AC a possibilidade de servir como matriz de suporte para a preparação de material misto e ser retirado para manutenção após aplicação em uma ferida, por exemplo. A solubilidade adequada em acetona do acetato de celulose permite a fabricação de fibras por eletrofiação, sendo a acetona relativamente um bom solvente para a técnica que exige solventes que evaporem durante o tempo de voo do jato produzido pelo equipamento de eletrofiação. No entanto, como a pressão de vapor da acetona é muito alta, acaba resultando no rápido entupimento da agulha durante o processo de eletrofiação.<sup>167,168</sup>

Para evitar o rápido entupimento da agulha injetora, solventes como clorofórmio, N, N-dimetilformamida, diclorometano, ácido fórmico, metanol e piridina acabam substituindo a acetona na eletrofiação do acetato de celulose. No entanto, assim como no caso da QTS, esses solventes são prejudiciais à saúde e devem ser evitados.<sup>166</sup> Para contornar esse problema, muitos

pesquisadores utilizam sistemas de misturas binária ou ternária de solventes para aumentar a pressão de vapor da solução em relação ao solvente volátil, e aumentar a constante dielétrica da solução, resultando em jatos mais estáveis e com menor incidência de entupimento da agulha.<sup>166,168</sup>

Embora a quitosana e o acetato de celulose tenham sido eletrofiados com sucesso como polímeros isolados ou misturados com outros polímeros, a eletrofição de fibras de mistura AC–QTS diretamente é bastante complicada pela falta de um sistema cossolvente adequado. Pesquisadores tentaram eletrofiar esta mistura de polímeros a partir de uma mistura de acetona e ácido acético como solventes, porém não conseguiram produzir quaisquer resultados satisfatórios.<sup>169</sup> Desta maneira, no presente trabalho, optou-se por aplicar sistemas ternários de solventes com baixa toxicidade preparados pela mistura de acetona/etanol/água otimizados para a fabricação de fibras eletrofiadas de acetato de celulose e recobri-las com fina camada filmogênica de quitosana contendo curcumina pelas técnicas de *spin coating* ou aspersão utilizando aerógrafo.

A ideia de recobrir as fibras de AC com as soluções de QTS-PLUs-CUR foi fundamentada a partir dos trabalhos de Trinca *et al.* (2017), onde os autores recobriram com sucesso fibras eletrofiadas de blendas de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/acetato de celulose com uma segunda camada eletrofiada de QTS/PEO.<sup>104</sup> Outro trabalho que serviu de base foi o desenvolvido por Li *et al.* (2008), neste estudo os autores recobriram (por imersão) fibras eletrofiadas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com camada de gelatina.<sup>170</sup>

O propósito deste capítulo está centrado no desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose à partir soluções compostas de diferentes misturas acetona/etanol/água e o recobrimento destas fibras com solução filmogênica à base de QTS/PLUs contendo curcumina utilizando duas técnicas diferentes (*spin coating* e aerógrafo convencional). A caracterização dos materiais obtidos se deu pelo uso de técnicas espectroscópicas (FTIR), térmicas (TGA e DSC), microscópicas (confocal), mecânicas e a determinação dos valores dos ângulos de contato tanto das fibras como dos materiais recobertos.

## 2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS

O acetato de celulose com  $M_n = 50.000 \text{ g mol}^{-1}$  e 39,7% de acetilação (Lote 13002PO), assim como a quitosana, curcumina e os copolímeros plurônicos (já descritos nos capítulos anteriores) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes acetona, etanol e ácido acético são de grau analítico e foram comprados da NEON, sendo utilizados sem purificação prévia. Água deionizada foi utilizada em todos os ensaios.

O eletrofiador usado foi um *Professional Electrospinner*, da Yflow Sistemas y Desarrollos S. L., modelo 2.0S-500, com injeção feita através de uma bomba de vazão automática utilizando seringa. Uma câmera com sensor de imagem 1/3" *color sharp high sensitivity (charge-coupled device)* – 0,1 Lux, equipada com duas lentes (20 e 40 mm), permite a visualização em alta resolução do cone de Taylor formado na ponta do injetor. A variação da tensão que pode ser aplicada é de 0–30 kV no injetor.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Preparo das soluções de acetato de celulose para eletrofiação

Todas as soluções de acetato de celulose foram preparadas com percentual massa/massa (massa do soluto/massa da solução, % m/m). Os frascos usados para fazer as soluções foram hermeticamente fechados e a agitação foi realizada mecanicamente por meio de agitador magnético.

As misturas de solventes (acetona/etanol/água) foram produzidas de acordo com a Tabela 12. As soluções de AC foram feitas variando-se a concentração mássica de 6 a 11%, e também estão descritas na referida tabela. As designações “A” e “X” da tabela referem-se à utilização de acetona em proporções acima e abaixo de 50%, respectivamente.

Para a produção das soluções, primeiramente realizou-se a dissolução do AC em acetona, com posterior adição gota a gota da solução contendo a mistura etanol/água com auxílio de uma seringa acoplada a uma bomba de fluxo (gotejador) da marca Razel modelo R-100EC o qual foi utilizado para ação do êmbolo da seringa com taxa de  $10 \text{ mL h}^{-1}$  sob agitação constante por 24 h.

Tabela 12 - Composição das soluções de acetato de celulose para eletrofição, dados de condutividade e tensão superficial das soluções. Entre parênteses está a razão etanol/água do sistema.

Amostra	AC (% m/m)	Acetona (% m/m)	% m/m e razão etanol/água	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ )
A1	10	60	30 (80/20)	1,68	23,5
A2	10	60	30 (20/80)	2,45	27,0
A3	10	60	30 (30/70)	2,22	26,0
A4	10	60	30 (40/60)	2,23	26,5
A5	10	60	30 (60/40)	1,99	25,0
X1	10	48	42 (100/0)	1,21	22,0
X2	10	48	42 (0/100)	4,62	—
X3	10	48	42 (20/80)	—	—
X4	10	48	42 (65/35)	1,88	25,0
X5	10	40	50 (100/0)	1,15	22,5
X6	10	44	46 (65/35)	1,73	26,0
X7	7	44	49 (65/35)	1,66	25,0
X8	7	44	49 (35/65)	2,65	28,0
X9	6	48	46 (35/65)	2,13	27,5
X10	6	48	46 (65/35)	1,85	25,0
X11	9	48	43 (65/35)	1,83	25,5
X12	11	48	41 (65/35)	2,01	25,0

Fonte: tabela elaborada pelo autor deste trabalho (2020).

### 2.2.2 Parâmetros instrumentais de eletrofição das soluções poliméricas

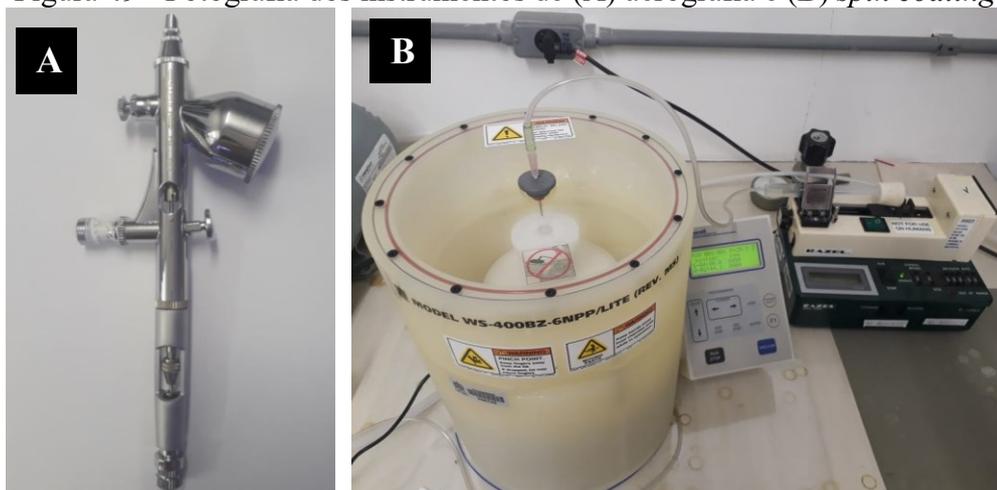
A injeção das amostras variou de 1,0 a 4,0 mL h<sup>-1</sup>, a tensão aplicada no injetor variou de 6 a 9 kV, em distâncias agulha-coletor que variaram de 6 a 12 cm. As soluções foram injetadas com uso de seringa Becton-Dicknson com capacidade de 10 mL e o diâmetro interno da agulha usado foi de 0,4 mm.

Tanto o acetato de celulose na forma de pó (como adquirido) quanto as fibras formadas por esse polímero foram caracterizadas por TG, DSC e FTIR seguindo as metodologias descritas no Capítulo III. Os ensaios mecânicos das fibras foram realizados utilizando papel seda como suporte das fibras durante as análises.

### 2.2.3 Recobrimento das fibras eletrofiadas de acetato de celulose pelas soluções de QTS

O recobrimento das fibras de AC pelas soluções filmogênicas de quitosana foram realizados por duas vias: aspergido com o uso de aerógrafo convencional ou por intermédio de um *spin coating* (Figura 49). O aerógrafo utilizado foi da marca STEULA modelo BC-60 e o *spin coating* da marca Laurell modelo WS-400BZ-6NPP/LITE. A concentração de aspersão da solução de QTS contendo os outros componentes (CUR e PLUs) foram as mesmas das preparadas para a produção dos filmes por secagem de solvente, descritas no Capítulo III. O mesmo valeu para o recobrimento via *spin coating*, para essa técnica os parâmetros de rotação por minuto, fluxo de solução e tempo de gotejamento foram controlados. A rotação por minuto variou de 1000 a 8000 rpm, com fluxo constante de 1 gota a cada 10 s e o tempo de gotejamento entre 2 e 4 min.

Figura 49 - Fotografia dos instrumentos de (A) aerografia e (B) *spin coating*.



Fonte: fotografias obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

### 2.2.4 Morfologia da superfície das fibras eletrofiadas

As análises morfológicas das fibras sem e com recobrimento foram obtidas por SEM aplicando uma voltagem de aceleração de 10 kV, como descrito nos Capítulo III. Os materiais eletrofiados foram depositados em *stub* utilizando fita de carbono e recobertos com ouro.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da concentração inicial de acetato de celulose para o preparo das soluções de eletrofição, assim como os parâmetros de processo do equipamento, foi realizada a partir de testes baseados na literatura.<sup>167,168,171</sup> A mistura de solventes (água/etanol) foi utilizada no intuito de diminuir a concentração do solvente volátil acetona, diminuindo, assim, a pressão de vapor em comparação com a acetona pura.<sup>167</sup> As proporções acetona/etanol/água foram selecionadas com o propósito de diminuir a concentração de acetona, sem ocasionar precipitação do acetato de celulose ou prejudicar o processo de eletrofição.<sup>166,168</sup> Adicionalmente, a escolha e produção das soluções consecutivas foram estabelecidas a partir dos resultados observados da eletrofição da solução anterior. A Figura 50 exibe as fotografias das soluções de acetato de celulose usadas no processo de eletrofição.

Figura 50 - Fotografias das soluções de acetato de celulose em diferentes proporções de acetona/etanol/água utilizadas para a eletrofição de acordo com a Tabela 12.



Fonte: fotografias obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

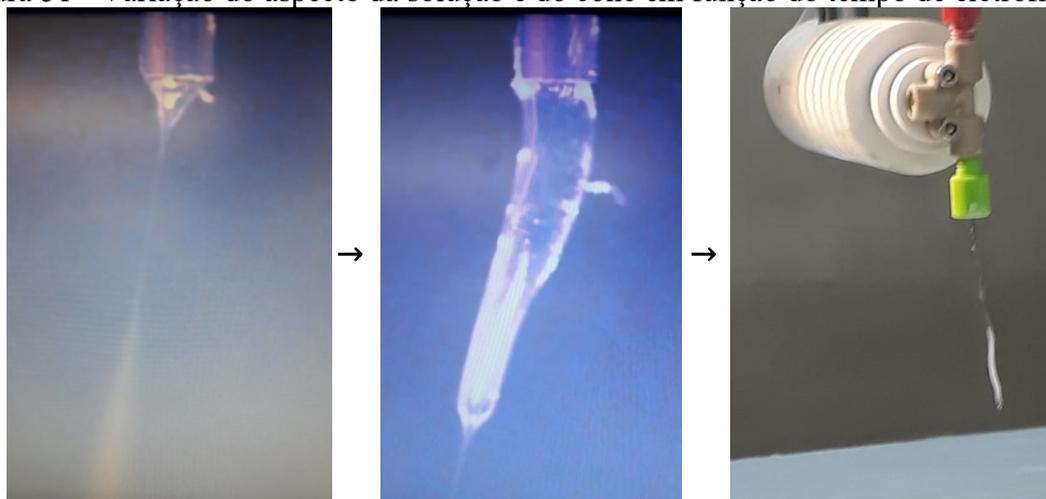
A partir da Figura 50 verifica-se que praticamente todas as misturas preparadas formaram soluções levemente turvas, porém sem a presença visual de partículas precipitadas. A exceção foi a amostra X2 (acetona/[etanol/água] = 48/42[0/100]), que nitidamente apresentou turvamento excessivo e perda da característica viscosa da solução, evidenciando a precipitação do AC presente. Assim, todas as outras soluções foram empregadas na obtenção dos materiais eletrofiados.

### 3.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE

Geralmente, em estudos envolvendo eletrofiação de polímeros, os pesquisadores almejam fibras com o menor diâmetro possível e, de preferência, na escala nanométrica.<sup>164</sup> No entanto, como o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um material de suporte gerado com o AC para o posterior recobrimento com soluções filmogênicas de QTS, o diâmetro das fibras não se torna uma meta tão importante quanto o aumento do tempo de eletrofiação sem a ocorrência de entupimento consecutivo da ponta da agulha pelo polímero. Assim, primeiramente investigou-se o tempo de eletrofiação das amostras de acetato de celulose a partir de diferentes misturas acetona/etanol/água e só então avaliou-se a influência dos parâmetros experimentais sobre o diâmetro das fibras produzidas.

Todas as soluções eletrofiadas ocasionaram entupimento da agulha em virtude da secagem da solução de AC em algum momento durante o processo de eletrofiação. A Figura 51 mostra a variação do aspecto da solução e do cone de Taylor formado pelas soluções de acetato de celulose durante a eletrofiação. É possível observar que inicialmente ocorre a formação do cone característico (~15 s), em seguida, o polímero que está na interface lateral (solução/ar) do cone sofre secagem por conta da evaporação da mistura de solventes, formando uma espécie de barreira cilíndrica de polímero com um canal interno pelo qual a solução viscosa ainda consegue passar e ser ejetada em direção ao aparato coletor. Em última instância, o canal interno do cilindro formado pelo polímero é obstruído pela secagem da solução e o processo de eletrofiação é interrompido.<sup>32,168</sup>

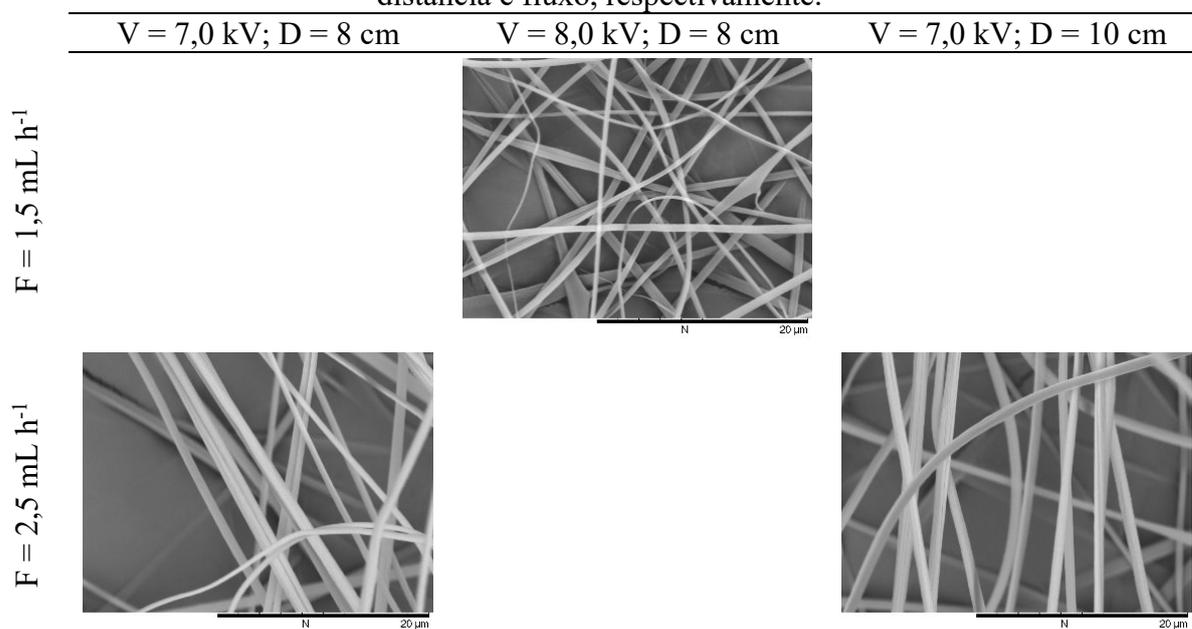
Figura 51 - Variação do aspecto da solução e do cone em função do tempo de eletrofiação.



Fonte: fotografias obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

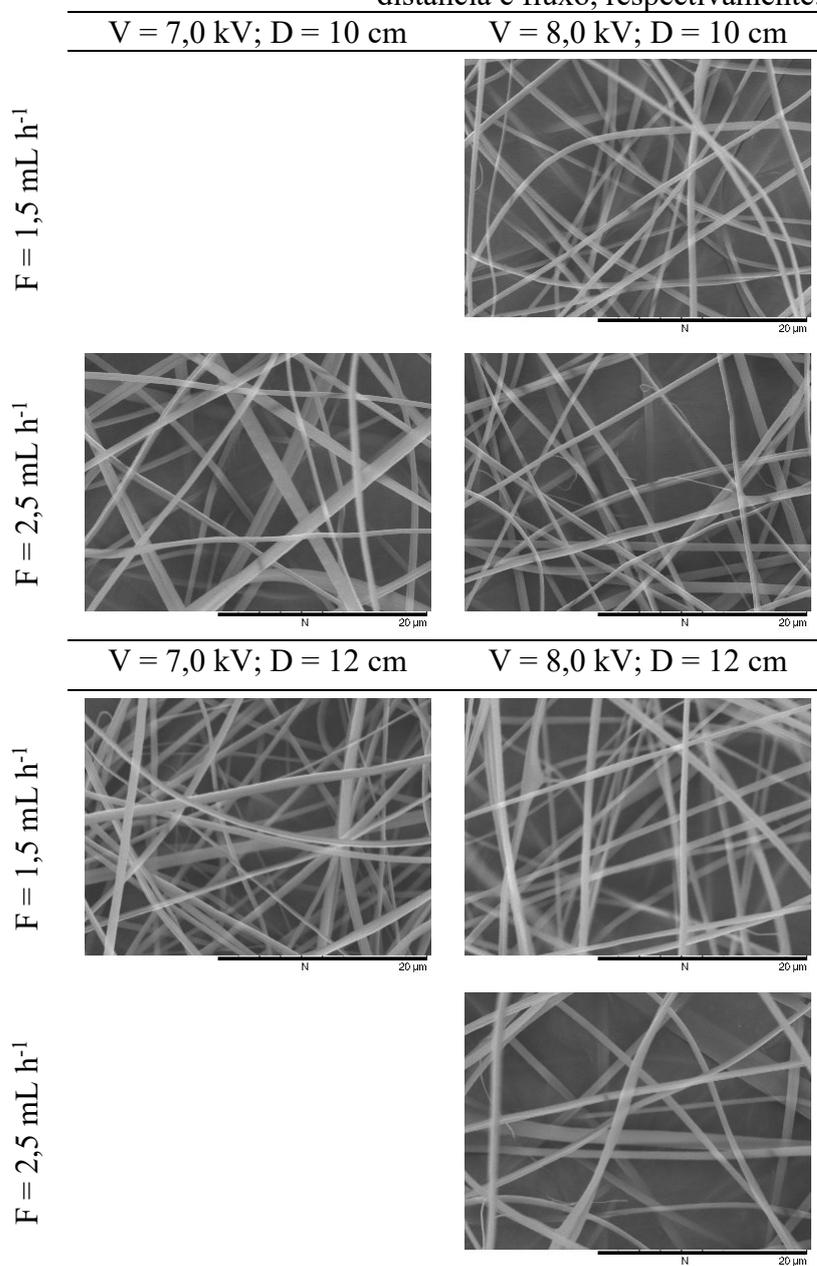
As amostras A1–5, com porcentagem de acetona acima de 50%, formaram fibras com morfologias satisfatórias para quase todas as amostras e parâmetros de processo utilizados. Isso é condizente já que a relativa grande quantidade de acetona nessas soluções favorecem a secagem durante o voo do jato e por este ser um bom solvente para a solubilização do acetato de celulose.<sup>32,168</sup> As Figuras de 52 a 55 mostram as micrografias por SEM das fibras de AC obtidas a partir de diferentes soluções e parâmetros de processo. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.

Figura 52 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A2. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



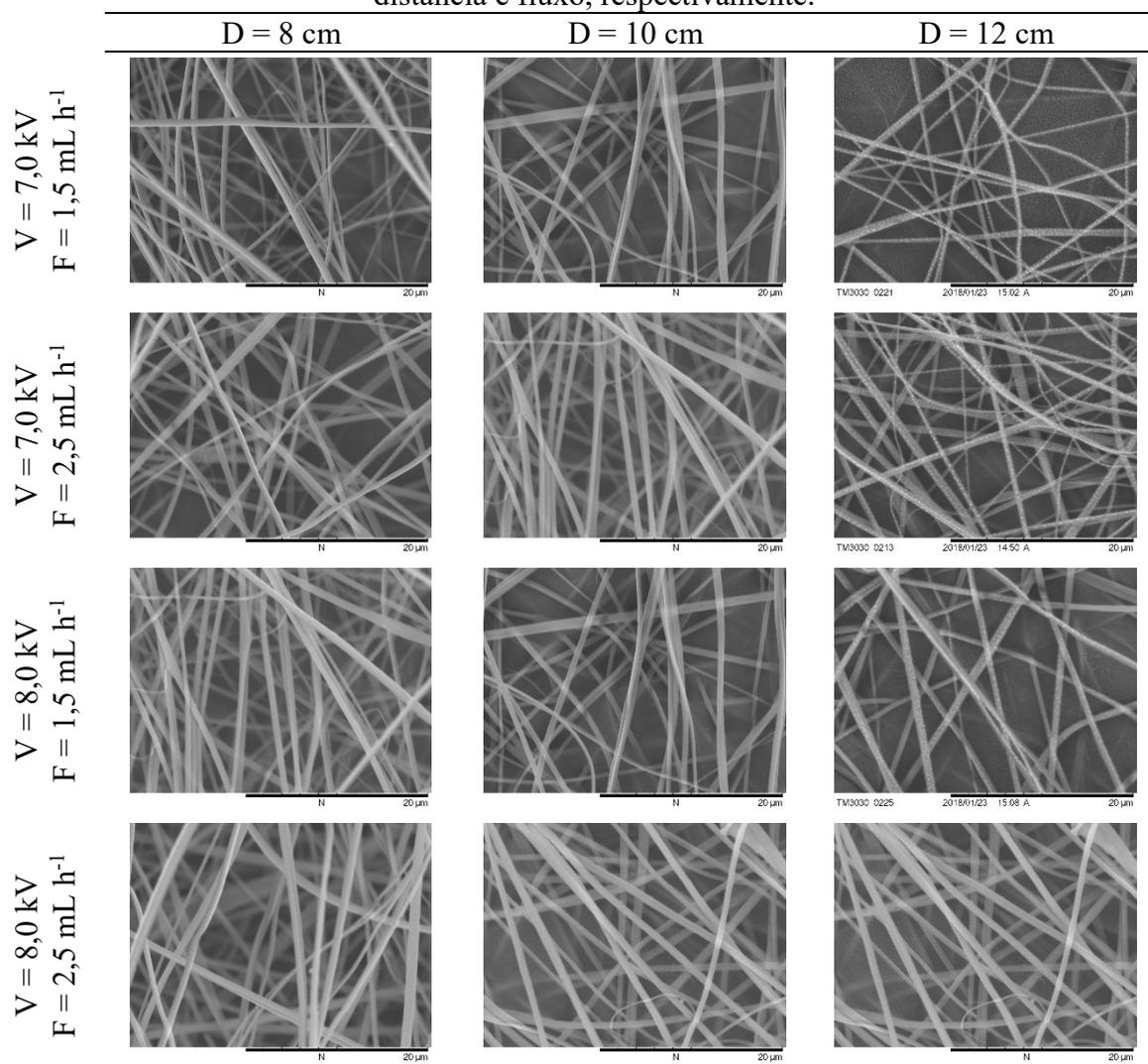
Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 53 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofição a partir da solução A3. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



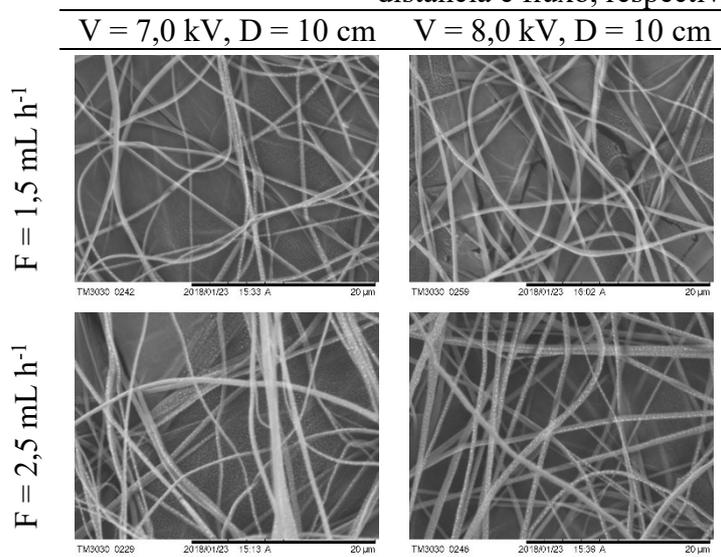
Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 54 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução A4. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 55 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofição a partir da solução A5. A magnificação utilizada foi de 5000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



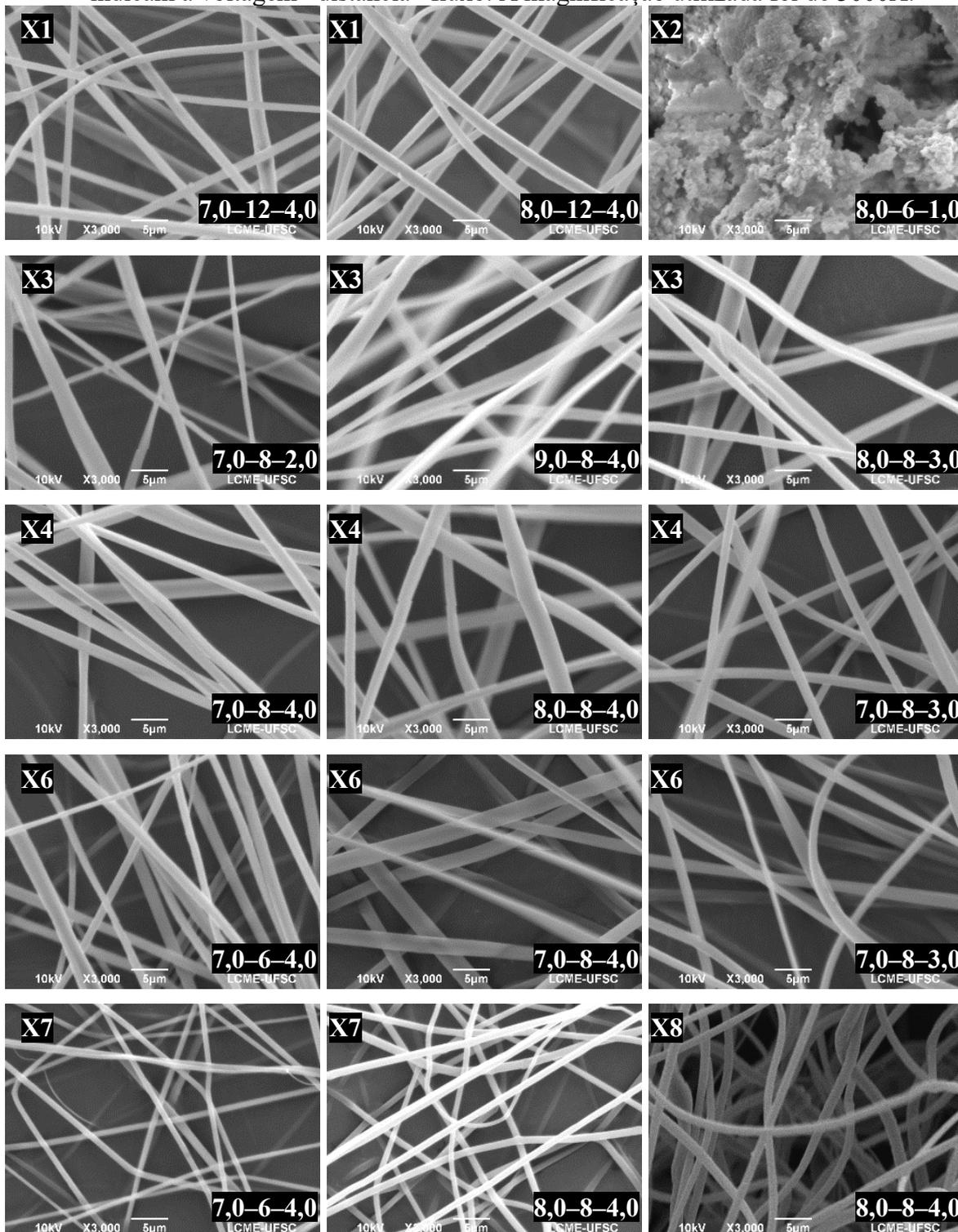
Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

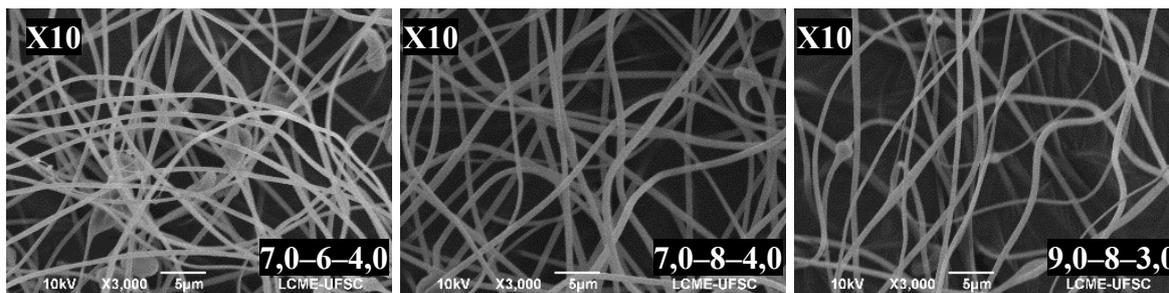
No entanto, nenhuma das diferentes misturas contendo acetona acima de 50% obtiveram tempos de eletrofição superiores a 1 min, sendo a amostra A5 a que exibiu maior tempo de eletrofição contínua: aproximadamente 1 min quando utilizado voltagens de 7,0 e 8,0 kV, distância entre agulha e coletor de 10,0 cm e fluxo de solução de 2,5 mL h<sup>-1</sup>. As imagens das fibras eletrofiadas da formulação A1 não foram apresentadas pois a ponta da agulha secou assim que foi ligado o fluxo de solução e a DDP no equipamento, portanto não foi possível obter fibras em quantidade suficiente para os ensaios de microscopia. Os espaços não preenchidos com as imagens de SEM das figuras referentes as amostras A2 e A3 se devem também ao fato de não ter sido possível obter fibras em quantidades apreciáveis devido ao rápido entupimento da ponta da agulha, ou a não capacidade do sistema em produzir fibras, obtendo-se amostra em forma de partículas. A amostra A5 deveria apresentar um número de imagens semelhante à amostra A4, porém boa parte do arquivo que continha as microscopias desta amostra foi corrompido e não puderam ser apresentadas.

Como o tempo de eletrofição das amostras A2–5 foram abaixo do desejado (algumas amostras mantinham-se constante por apenas 10 s), optou-se por não continuar eletrofiando soluções contendo 60% m/m de acetona. Passou-se a partir de então, preparar-se soluções com percentagem de acetona abaixo de 50% m/m, com o propósito de diminuir a pressão de vapor da solução e, em consequência, a continuidade da eletrofição do AC. As Figuras de 56 a 58 mostram as micrografias obtidas por SEM das soluções entre X1 e X12. A Figura 56 mostra

apenas as formulações que apresentaram maior tempo de eletrofiação dentre as amostras X1 e X10.

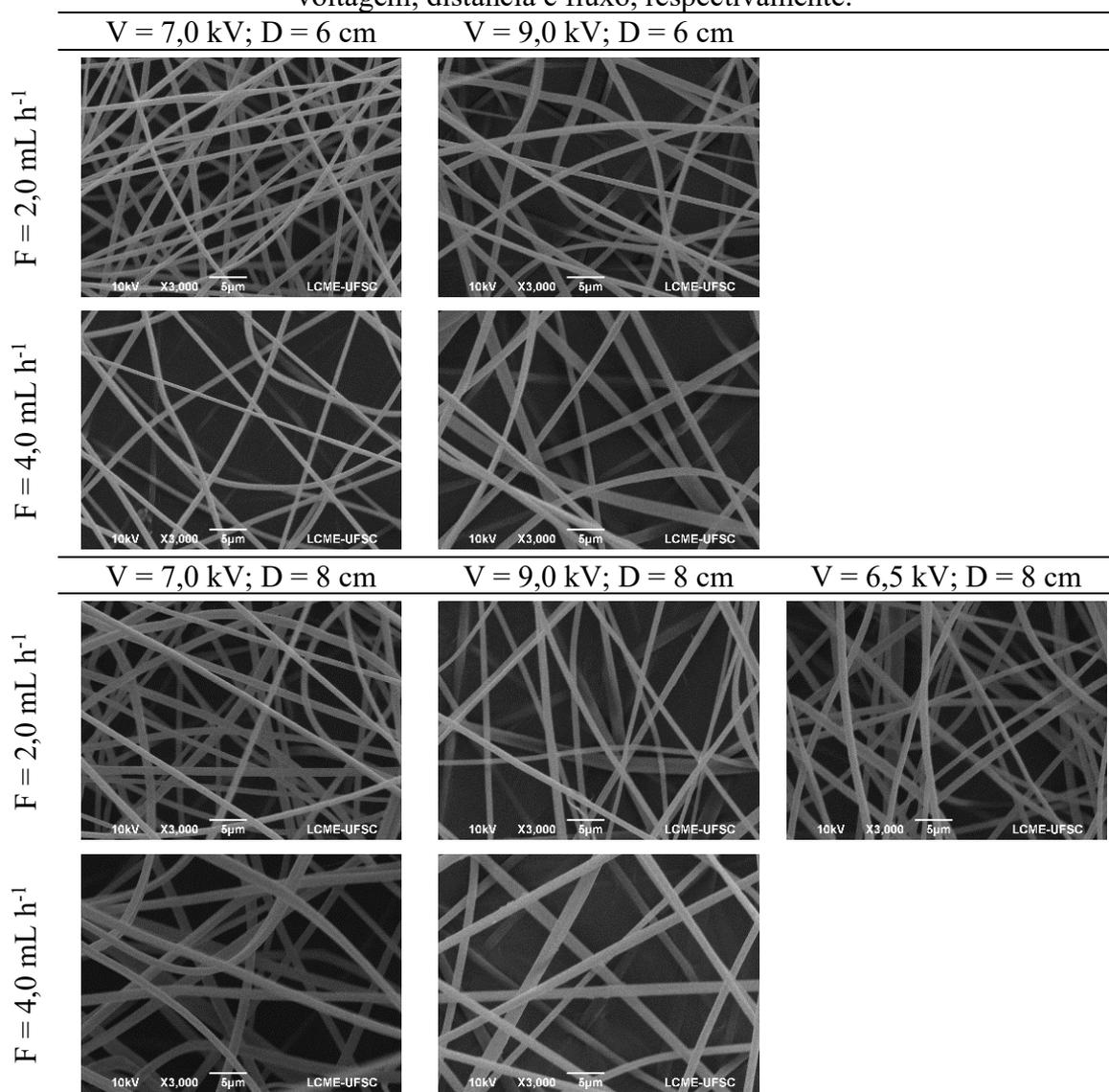
Figura 56 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir das melhores condições de processo das soluções entre X1 e X10. A legenda na parte inferior das imagens indicam a voltagem—distância—fluxo. A magnificação utilizada foi de 3000X.





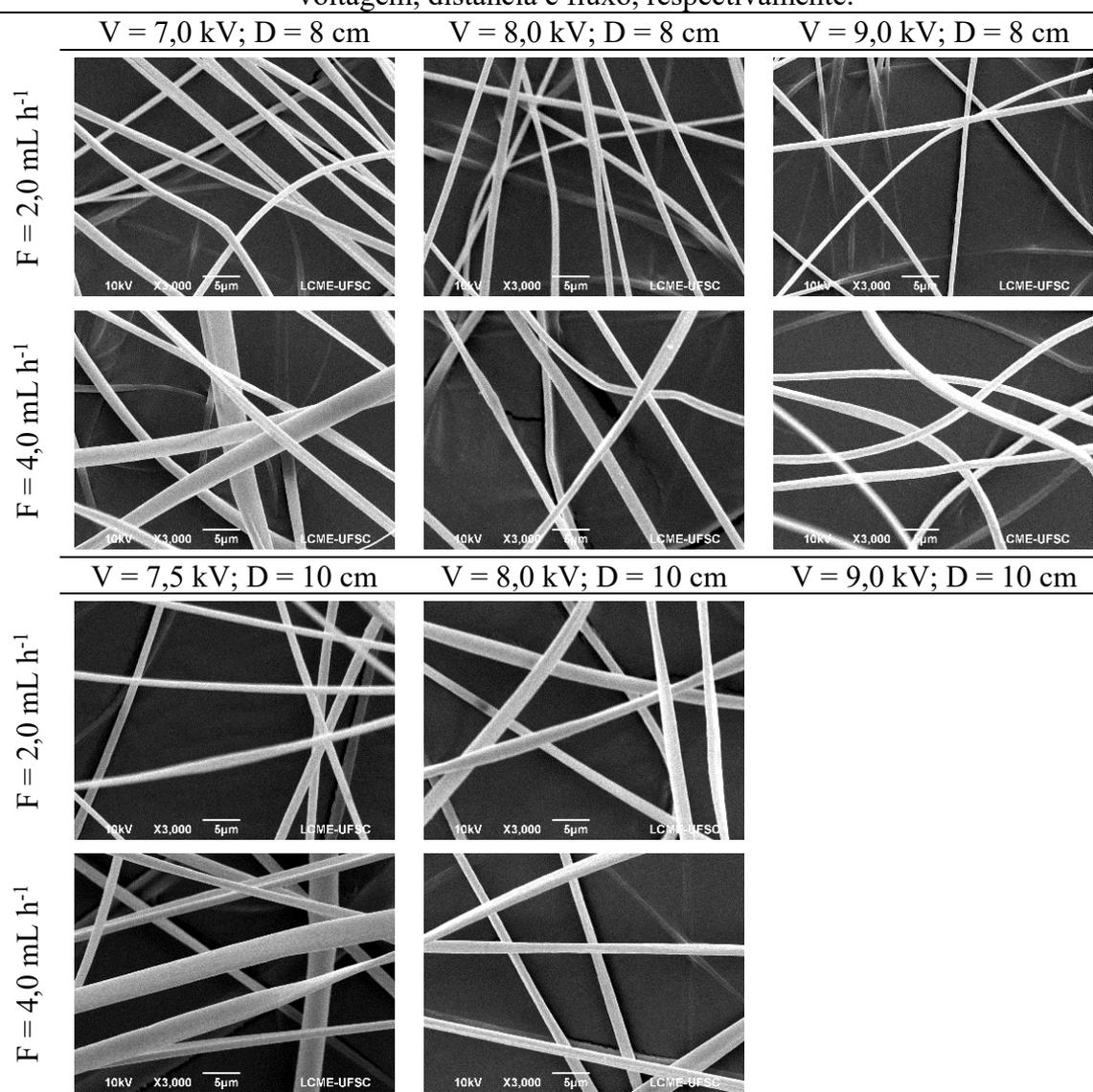
Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 57 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução X11. A magnificação utilizada foi de 3000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 58 - Imagens de SEM das fibras de AC obtidas por eletrofiação a partir da solução X12. A magnificação utilizada foi de 3000X. As abreviaturas V, D e F são atribuídas a voltagem, distância e fluxo, respectivamente.



Fonte: figuras obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

A maior parte das combinações instrumentais realizadas para a eletrofiação das soluções X1–12 resultaram em continuidade de eletrofiação, sem o entupimento da ponta da agulha, acima de 1,5 min, principalmente ao utilizar fluxo de 4,0 mL h<sup>-1</sup>. As amostras X5 e X9 não exibiram formação de fibras devido à baixa concentração de acetona, no primeiro caso, e à baixa concentração de AC, no segundo caso. Fazendo com que a solução da amostra X5 precipitasse rapidamente na ponta da agulha, e que não formasse fibra durante a eletrofiação da amostra X9.<sup>32,168</sup> Não foi observado qualquer correlação dos dados de condutividade e tensão superficial com a capacidade de eletrofiação das soluções descritas na Tabela 12 e a morfologia das fibras obtidas.<sup>32,168</sup>

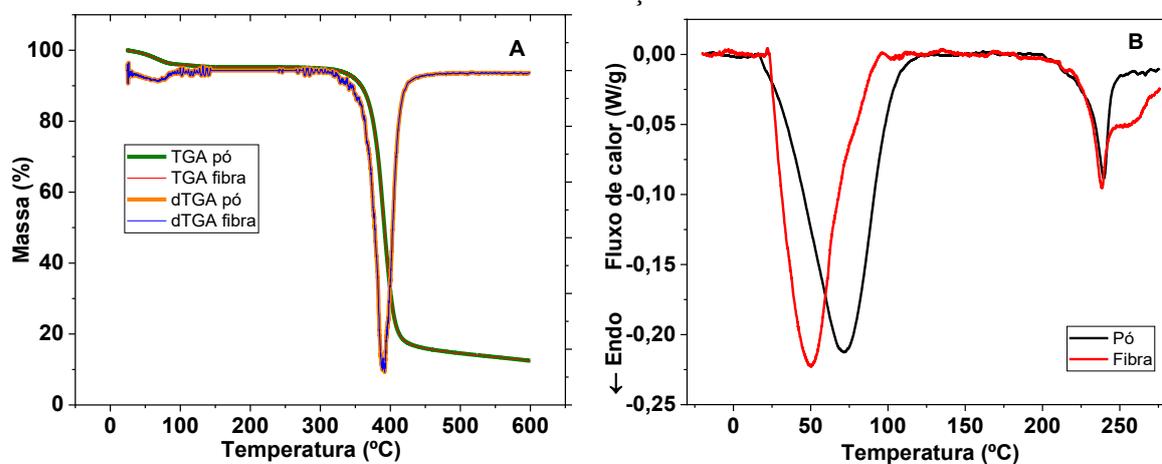
A amostra X11 foi a que mostrou melhor morfologia cilíndrica dentre as soluções eletrofiadas (Figura 57), assim como maior uniformidade dos diâmetros das fibras e também com menores dimensões. Porém, infelizmente não foi a que exibiu o maior tempo de eletrofição dentre as soluções. Além disso, as fibras formadas pela amostra X11 se mostraram quebradiças e fáceis de serem rompidas ao tracionadas. Esta propriedade não pôde ser mostrada experimentalmente por meio de equipamento, porém foi notada ao ser submetida à colagem em fita de carbono no *stub* metálico para as análises de SEM (não esticavam e saíam facilmente).

A amostra X12 foi a que exibiu maior tempo de eletrofição dentre elas, chegando até a 8 min de continuidade, principalmente quando utilizado voltagem abaixo de 8,0 kV, distância entre 8,0 e 10,0 cm e fluxo de 4,0 mL h<sup>-1</sup>, sendo portanto, a amostra escolhida para dar sequência às próximas análises. Um adendo a ser feito é que a umidade relativa (UR) é um fator importante que ocasiona variação da morfologia e tempo de eletrofição contínua das soluções. Notoriamente, UR abaixo de 45% parecem proporcionar maiores tempos de eletrofição e fibras mais homogêneas.<sup>166</sup>

### 3.2 CARACTERIZAÇÕES TÉRMICAS E ESPECTROSCÓPICA DO AC

O pó como recebido, assim como as fibras de acetato de celulose foram caracterizados por técnicas térmicas (TG e DSC) e por espectroscópica (FTIR). A Figura 59 apresenta os gráficos de perda de massa e fluxo de calor em função da temperatura para o AC antes e após a eletrofição.

Figura 59 - Gráficos de (A) TG e (B) DSC do acetato de celulose como recebido e após a eletrofição.

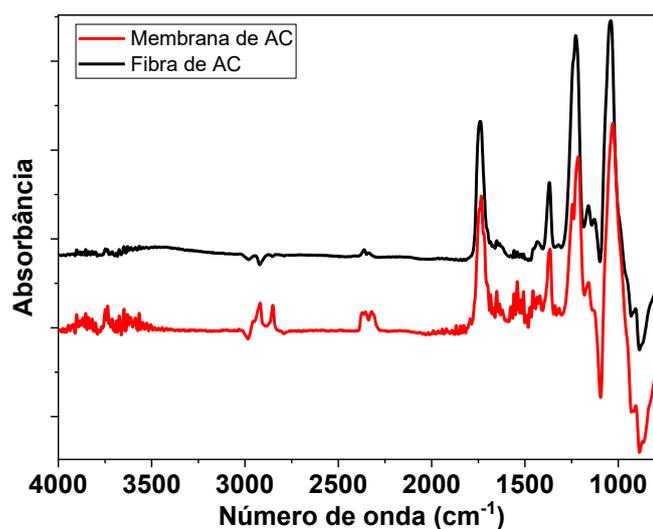


Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Não foi observado qualquer mudança do perfil de perda de massa comparando-se o polímero na forma de pó e fibra (as curvas se sobrepõem). Assim, ambas as curvas mostram uma leve perda de massa (~4%) até a temperatura de 84 °C, referente a absorção de umidade pelo AC. A segunda região de perda de massa (80%) que ocorre entre 318 e 431 °C, com taxa máxima igual a 390 °C, é resultado da degradação do polímero. Ao final do aquecimento resta 12% da massa inicial de AC.<sup>33</sup> Comportamento semelhante foi verificado nos estudos de DSC (Figura 59B), sendo notado apenas uma mudança na temperatura do evento endotérmico largo, que ocorre com taxa máxima em 71 °C no polímero em pó e 50 °C quando na forma de fibra. Esse evento está relacionado com a dessorção de umidade pelo acetato de celulose.<sup>10</sup> Esse comportamento pode estar associado ao preparo das amostras e a forma cristalina do solvente, indicando que a maneira com que o AC interage com a umidade deve estar relacionada com a forma que o polímero foi preparado e a estrutura que ele se encontra após o processo de eletrofiação. O segundo evento endotérmico que ocorre com taxa máxima em 239 °C em ambas as formas do polímero é atribuído a fusão do AC.<sup>10</sup> Ocorre o aparecimento de um leve ombro próximo a 260 °C, no qual pode estar associado a diferentes populações cristalinas. No entanto, essa explicação é de caráter apenas especulativo e carece de análises auxiliares, tais como difração de Raios-X.<sup>10</sup>

Além das caracterizações térmicas, o acetato de celulose foi caracterizado via infravermelho. A Figura 60 mostra os espectros de FTIR do AC na forma de membrana e fibra.

Figura 60- Espectros de FTIR do acetato de celulose como recebido e na forma de fibra.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

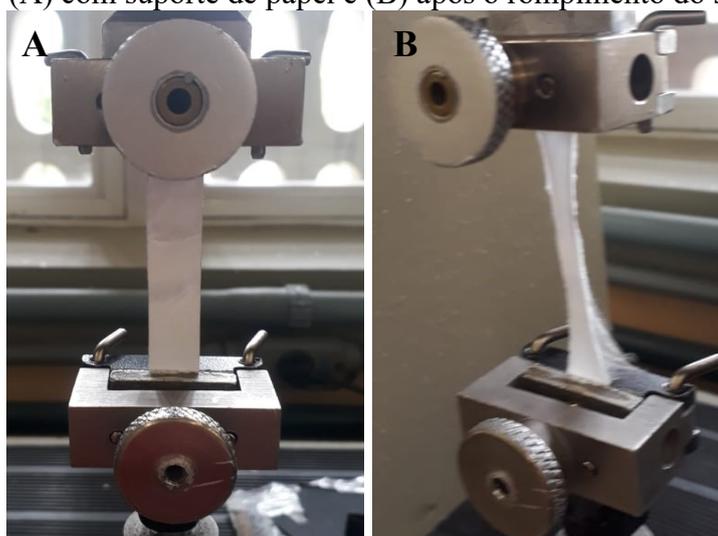
Assim como mostrado nos resultados de TG e DSC, o espectro de FTIR do AC não demonstra variação devido ao processo de eletrofiação. O polímero exibe bandas na região

entre 3045 e 2987  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento C–H dos grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  do AC. A banda em 1742  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C=O. O sinal de deformação C–H dos grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  aparecem em 1370  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1229  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C–O–C, enquanto a banda em 1045  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento  $-\text{C}-\text{OH}$  do AC.<sup>172</sup>

### 3.3 ENSAIOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO DAS FIBRAS DE AC

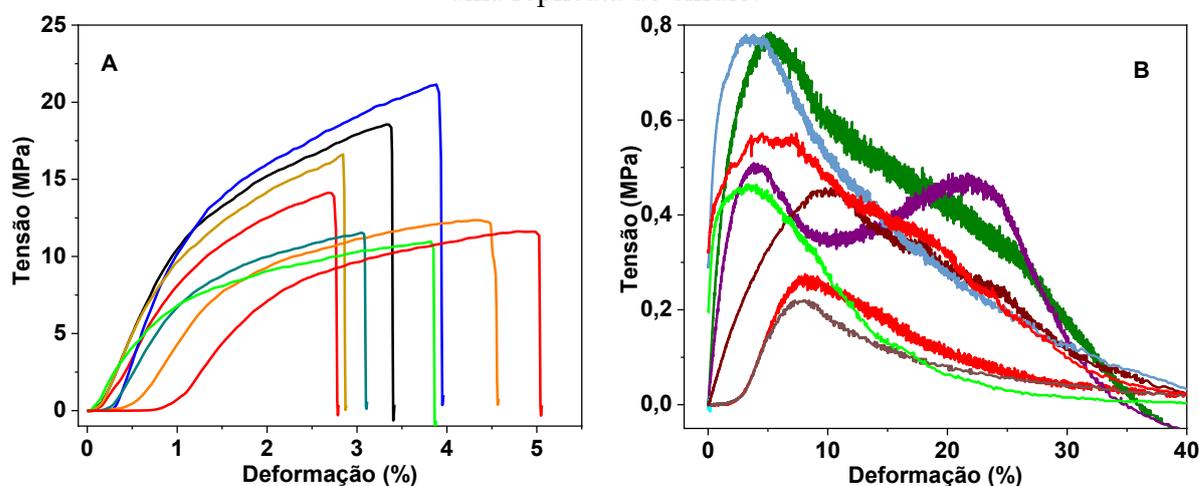
Após obtenção das fibras de maneira satisfatória, escolheu-se uma das misturas para prosseguir com os estudos envolvendo a fibras de acetato de celulose. Como descrito no item anterior, a amostra com mistura de solventes que demonstrou melhor tempo de formação de fibra foi a X12, com os parâmetros instrumentais descritos anteriormente. Devido a relativa fragilidade e dificuldade de manuseio das fibras, não foi possível realizar os ensaios mecânicos dos corpos de prova sem o auxílio de um suporte físico (Figura 61). Desta forma, as soluções de AC foram eletrofiadas sobre papel ceda e então cortadas com auxílio de um molde juntamente com o papel, condicionados em umidade relativa controlada ( $58 \pm 5\%$ ) por 40 horas e então submetidas aos testes mecânicos, que se sucedeu em duas etapas. A primeira etapa foi realizada com o papel suporte até o rompimento deste, enquanto a segunda etapa (corrida) foi efetuada com o papel rompido, e assim as propriedades mecânicas somente das fibras foram obtidas (Figura 62).

Figura 61 - Fotografia das fibras eletrofiadas a partir da amostra X12 submetidas ao ensaio de tração (A) com suporte de papel e (B) após o rompimento do suporte.



Fonte: fotografias obtidas pelo autor deste trabalho (2020).

Figura 62 - Ensaio mecânico das fibras de acetato de celulose (A) ainda no papel suporte e (B) após o rompimento do papel suporte. Cada curva, tanto em (A) quanto em (B) representa uma replicata do ensaio.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A Figura 62 exibe o comportamento mecânico das fibras de AC quando no suporte de papel (Figura 62A) e após o rompimento do suporte (Figura 62B). Verifica-se que o papel contendo as fibras de AC rompem-se com deformação máxima abaixo de 5% e com tensão máxima entre 10 e 20 Mpa. Infelizmente, é impraticável tentar diferenciar a contribuição de cada componente (papel e fibra de AC) na curva final obtida. No entanto, é plausível concluir que antes do rompimento toda a resistência do material é proporcionada pelo papel suporte, já que ele é o componente que possui maior resistência a tração. Além disso, as fibras são facilmente deformáveis aplicando-se uma força de tração relativamente baixa, portanto é difícil supor que as fibras de AC ocasionem grande efeito na resistência a tração do material formado pelo suporte + fibra. Os dados das propriedades mecânicas do material antes do rompimento do suporte não foram compilados em tabela dado que esse não é o material de estudo.

Após o rompimento do suporte o único material que exerce resistência a tração são as fibras de AC. Nota-se a partir da Figura 62B que as fibras de AC proporcionam baixa resistência a tração, exibindo tensão máxima de até 0,8 MPa (muito inferior ao suporte). Ao atingir a tensão máxima as fibras começam a desfiar (não ocorre quebra) devido a força de tração, enquanto a força de resistência exercida pelas fibras vai decrescendo até tender a zero. A deformação máxima nesse ponto é de até 40% para algumas das fibras. A partir dos 40% de deformação as fibras continuam a desfiar sem exercer qualquer resistência até chegar a 100% de deformação (não mostrado).

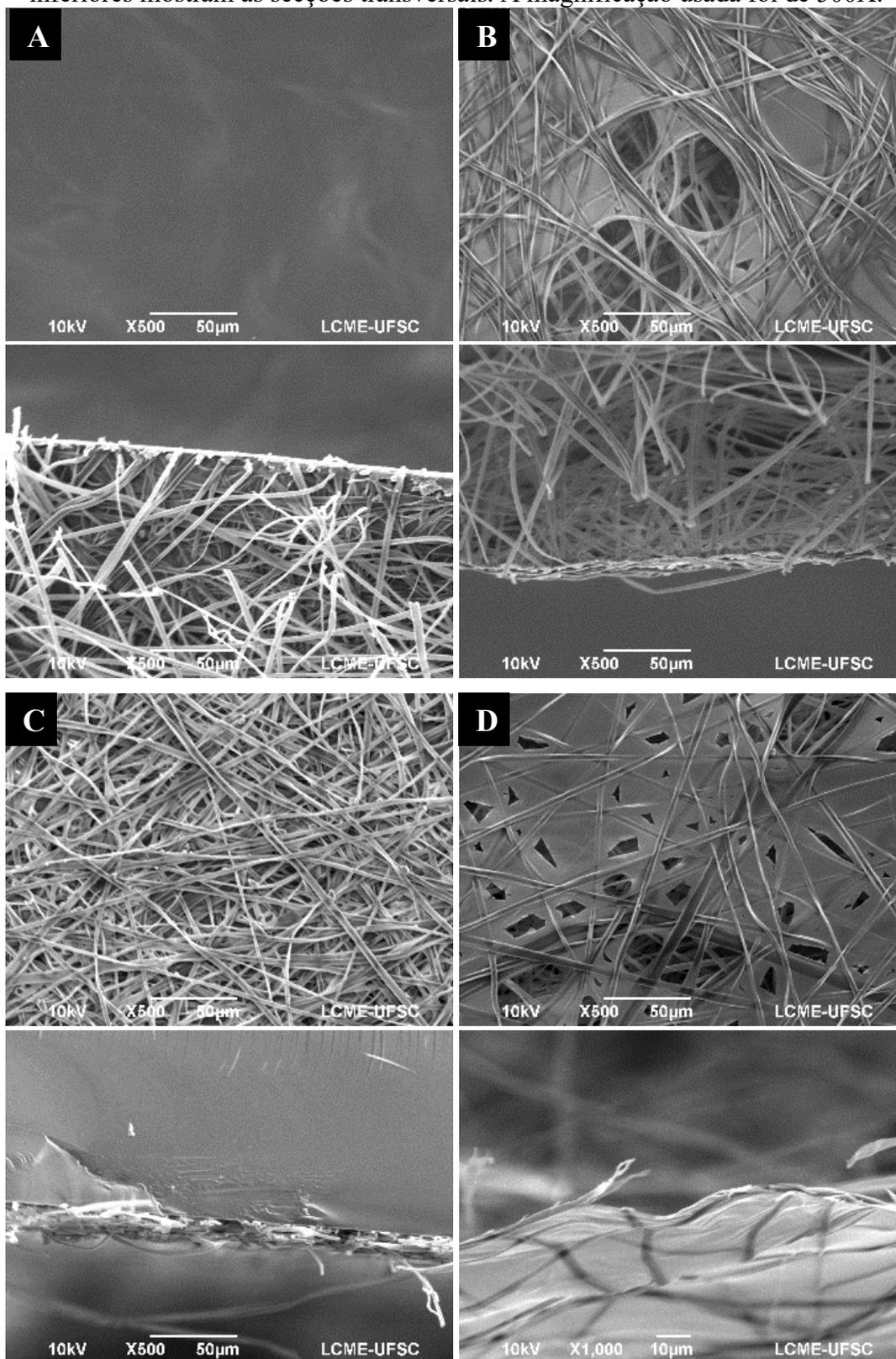
As fibras de acetato de celulose apresentam módulo de elasticidade de  $44,2 \pm 0,2$  MPa, valores similares foram obtidos por Liu e Tang (2007).<sup>173</sup> Esse valor é muito inferior ao obtido

para as membranas a base de quitosana ( $>1000$  MPa), podendo ser utilizado como material de suporte para as soluções filmogênicas de QTS e melhorar as propriedades do material final, aumentando sua flexibilidade. Apesar disso, os valores tanto de tensão máxima como de módulo de elasticidade obtidos nos ensaios mecânicos podem não representar os valores corretos para as fibras de AC, uma vez que os ensaios foram realizados com auxílio de um suporte de papel para as fibras eletrofiadas, ainda assim dão uma boa estimativa desses valores.

### 3.4 RECOBRIMENTO DAS FIBRAS DE AC COM SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS DE QTS

Assim como no caso dos ensaios de tensão-deformação, a amostra X12 foi a escolhida para os testes de recobrimento pelas soluções filmogênicas de quitosana. Os recobrimentos foram efetuados de duas maneiras diferentes: utilizando aerógrafo e por *spin coating*, como descrito no item 2.2.3 deste capítulo. Na primeira técnica não houve parâmetros instrumentais suficientemente controláveis para a aplicação do recobrimento, foi controlado apenas, e por meio qualitativo, a abertura do jato de solução, a distância de aspersão ( $\sim 30$  cm) e o número de repetição da passada do aerógrafo. Em contra partida, na segunda técnica foi possível controlar a rotação da amostra, o tempo total de gotejamento e a frequência de queda da gota da solução de QTS sobre a amostra. Em ambas as técnicas foi optado por recobrir as fibras utilizando soluções com as mesmas concentrações dos constituintes usadas para a preparação das membranas descritas no capítulo anterior. A Figura 63 mostra a morfologia das fibras recobertas com QTS tanto por aspersão utilizando aerógrafo quanto por *spin coating*.

Figura 63 - Morfologia das fibras de AC recobertas com QTS pela técnica de aspersão (A e B) por aerógrafo e por *spin coating* (C e D). As imagens superiores mostram as superfícies e as inferiores mostram as secções transversais. A magnificação usada foi de 500X.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Figura 63 verifica-se que foi possível recobrir as fibras empregando-se ambas as técnicas, no entanto, a técnica de aspersão por aerógrafo demonstra maior deposição da solução de QTS sobre as fibras de AC que a técnica de *spin coating*. As Figuras 63(A e B) mostram, respectivamente, as deposições da solução filmogênicas de QTS por aspersão com e sem aquecimento do suporte contendo as fibras em chapa de aquecimento (~80 °C). As Figuras 63(C e D) exibem a deposição da solução de QTS por *spin coating*, em rotação de 8000 rpm durante 2 min para a C e em rotação de 6000 rpm durante 2 min para a amostra exibida na Figura 63D. Na Figura 63C não houve deposição significativa e na Figura 63D ocorreu a deposição de uma camada extremamente fina.

É importante destacar que, embora tenha sido possível recobrir as fibras de AC com QTS utilizando a técnica de *spin coating*, como mostrado na Figura 63(C e D), as fibras não possuem aderência suficiente ao aparato de vidro utilizado como suporte, ao longo da eletrofiação, para as fibras durante a rotação no equipamento. Aparentemente o peso resultante do acúmulo das gotas da solução viscosa de QTS, assim como a umidificação da superfície de vidro pela solução, ocasiona desprendimento das fibras e projeção delas em direção a parede do equipamento, fazendo com que as fibras fossem enoveladas, grudassem e perdessem seu aspecto alongado. Esse comportamento foi significativo ao utilizar-se altas rotações e tempos de gotejamento (> 2 min). Porém, valores elevados desses dois parâmetros são fundamentais para uma boa dispersão e acumulação das soluções filmogênicas de QTS sobre toda a superfície das fibras. Modificações nos parâmetros da solução polimérica de gotejamento podem, talvez, melhorar o processamento de recobrimento.<sup>174</sup>

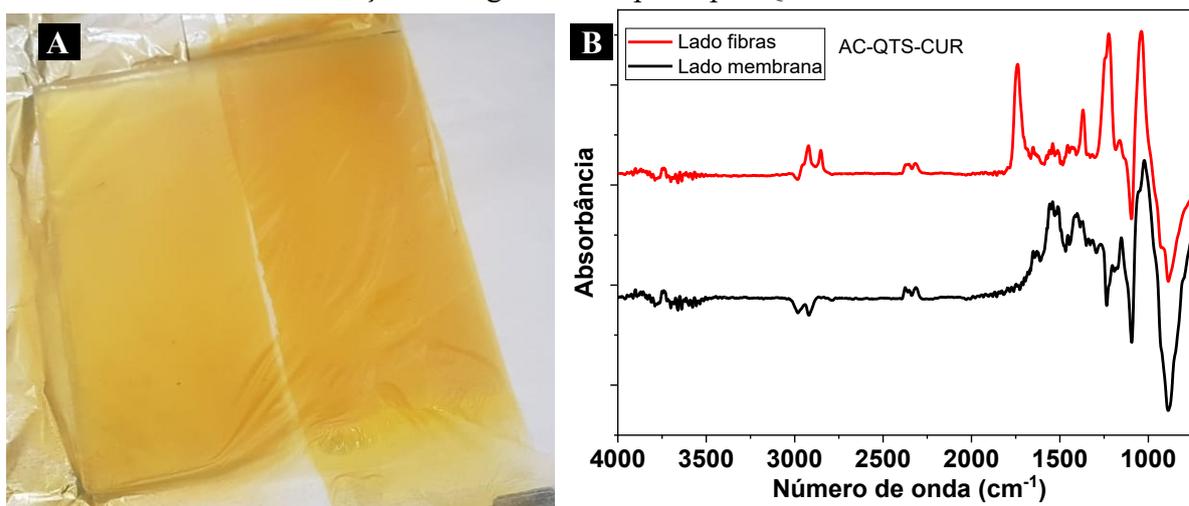
Em contrapartida, as fibras recobertas com QTS por aspersão utilizando aerógrafo não ocasionaram qualquer dessas desvantagens. Além disso, ao contrário do *spin coating* que desperdiça parte da solução durante o processo de recobrimento, a técnica de aspersão proporciona maior rendimento de deposição das soluções de QTS sobre as fibras de AC, economizando solução polimérica, evitando desperdícios excessivos e com maior controle visual da efetividade e uniformidade do processo.<sup>175</sup> Sendo, portanto, a técnica de aspersão com aerógrafo a escolhida para o recobrimento com as soluções de QTS contendo CUR.

Infelizmente não foi possível realizar ensaios mecânicos para as amostras recobertas devido às dimensões das amostras formadas com as técnicas e o tipo de suporte utilizado para a deposição das fibras.

### 3.4.1 Análises das fibras de AC recobertas com solução filmogênicas de QTS contendo CUR

A Figura 64 exibe a fotografia e o espectro de FTIR da amostra de fibra de AC recoberta com solução filmogênica composta por QTS–CUR.

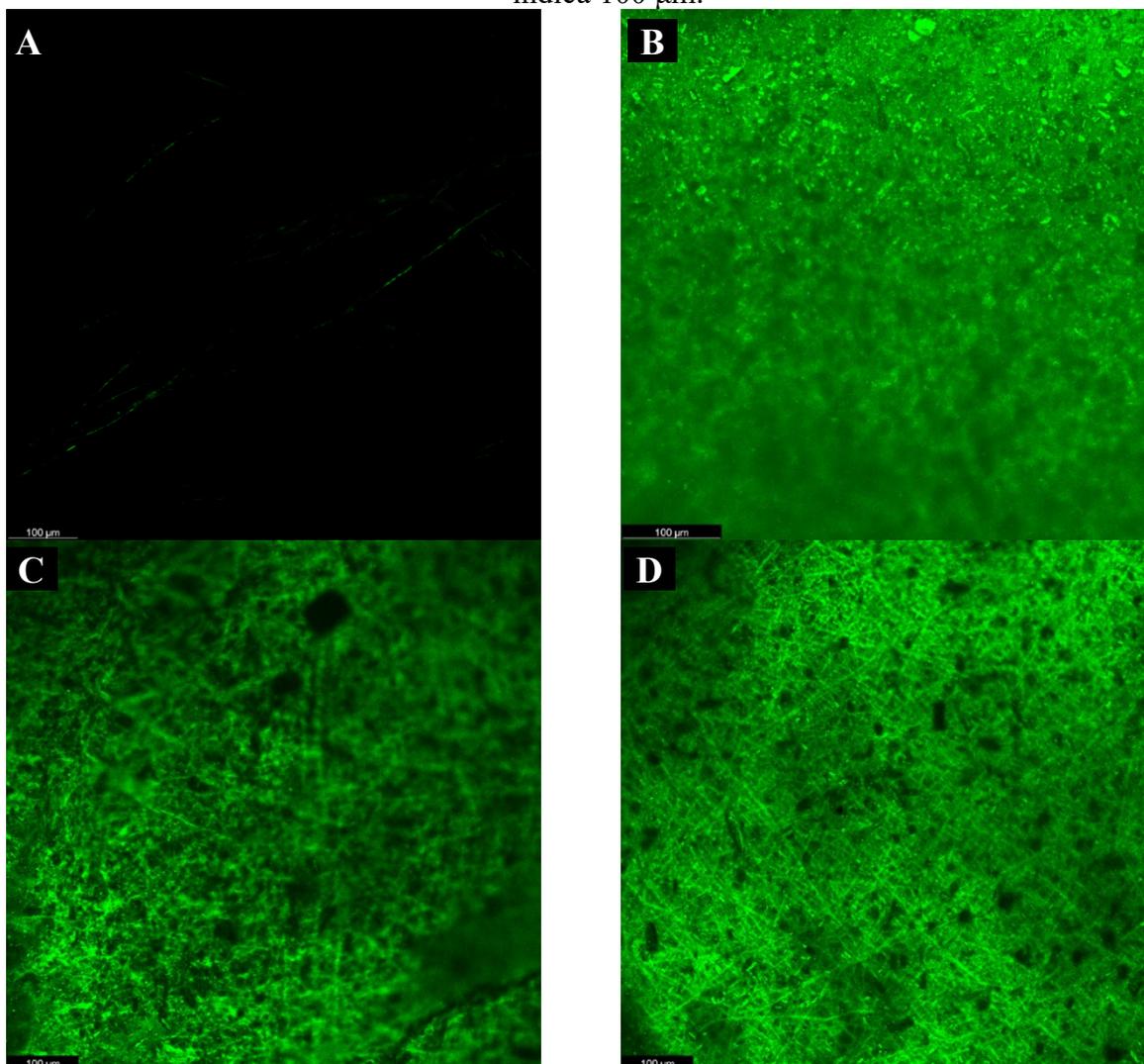
Figura 64 – (A) Fotografia e (B) espectro de FTIR da amostra de fibra de AC recoberta com solução filmogênica composta por QTS–CUR.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

A partir da Figura 64 verifica-se que as fibras de AC foram recobertas com solução de QTS contendo curcumina de forma satisfatória e relativamente homogênea. Os espectros de FTIR seguem um perfil semelhante ao obtido para as membranas de QTS. Onde a o lado de baixo da amostra exibe perfil idêntico ao do AC puro, enquanto que o lado de cima mostra perfil espectral referente à mistura QTS–CUR. Isso é condizente, uma vez que só o lado de cima das fibras foi aspergido com a solução filmogênicas.<sup>102,126,172</sup> Apesar de não mostrados aqui as fibras recobertas com as soluções compostas por QTS–F127–CUR e QTS–P123–CUR exibem características de recobrimento e perfil espectral semelhante à amostra de QTS–CUR. As imagens de microscopia confocal das fibras de AC recobertas são mostradas na Figura 65.

Figura 65 – Microscopia confocal das fibras eletrofiadas de AC (A) não recobertas e recobertas com (B) QTS–CUR, (C) QTS–F127–CUR e (D) QTS–P123–CUR. A escala indica 100  $\mu\text{m}$ .



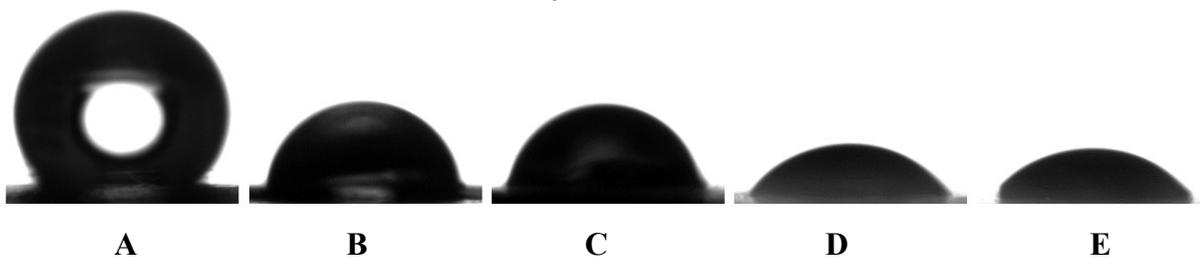
Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

As fibras eletrofiadas de AC sem recobrimento não possuem emissão de fluorescência, enquanto que as amostras recobertas com solução de QTS contendo CUR exibem fluorescência característica, semelhante a das membranas produzidas por secagem de solvente. Novamente, a amostra sem os PLUs possui sinais de cristais pouco definidos de CUR não solubilizados, similarmente ao correlato na forma apenas de membrana. A adição dos PLUs à formulação praticamente elimina o aparecimento de cristais de CUR. Além disso, é possível verificar os padrões das fibras de AC nas imagens de confocal pela presença de “riscos” em todas as imagens.

Como as fibras foram recobertas com soluções de QTS que contém a mesma concentração dos constituintes (QTS, PLUs e CUR), acredita-se que as amostras finais possuam propriedades microbiológicas semelhantes a das membranas a base de QTS desenvolvidas

A Figura 66 mostra o perfil das gotas de água adquiridas para as amostras de fibras de AC sem e com recobrimento por soluções filmogênicas à base de QTS, resultando na Tabela 13.

Figura 66 – Fotografias digitais das gotas adquiridas durante os ensaios de ângulo de contato das fibras de AC (A) sem e com recobrimento pelas soluções de composição (B) QTS, (C) QTS–CUR, (D) QTS–F127–CUR, (E) QTS–P123–CUR utilizando água como solvente em pH ~7,0.



Fonte: dados elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

Tabela 13 – Valores dos ângulos de contato das fibras de AC sem e com recobrimento obtidas através da Figura 66.

Formulação (n = 5)	Ângulo de contato
AC	118,3 ± 5,9
AC–QTS	85,1 ± 2,9
AC–QTS–CUR	74,0 ± 1,6
AC–QTS–F127–CUR	53,8 ± 1,7
AC–QTS–P123–CUR	48,0 ± 7,3

Fonte: tabela elaborados pelo autor deste trabalho (2020).

De acordo com a Figura 66 e Tabela 13, as fibras de AC exibem superfície relativamente hidrofóbica, devido principalmente aos grupos acetil. A aspersão de solução contendo QTS diminui devido à maior hidrofiliabilidade deste polímero frente ao AC. As amostras contendo os PLUs em sua composição são as que possuem os menores valores de ângulo de contato e que, aqui, estão entre os valores ideais (40–70°) para o favorecimento de proliferação de células de cicatrização.<sup>149</sup>

Desta maneira, é pertinente dizer que as fibras de AC podem ser recobertas por formulações de QTS com menor uso de solução filmogênica em comparação às membranas formadas por secagem de solvente. Além disso, acredita-se que esse sistema aumente a taxa de liberação da CUR quando produzido com menores massas molares de QTS, assim como melhorar a “respiração” e facilitar a manutenção dos curativos cutâneos produzidos pelo sistema desenvolvido no presente trabalho.

#### 4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Diferentes razões acetona/etanol/água foram utilizadas para a fabricação de fibras eletrofiadas de acetato de celulose, formando fibras satisfatórias.

As amostras A2–5 contendo teor de acetona acima de 50% exibiram fibras relativamente homogêneas e com diâmetro pequeno. No entanto, não foram capazes de ser eletrofiadas continuamente por tempos superiores a 1 min.

Todas as amostras X1–12 apresentaram continuidade de eletrofiação superior a 1 min, sendo a amostra X12 a que demonstrou maior tempo de eletrofiação contínua (~8 min). Em contrapartida, essa amostra possui fibras com maior diâmetro e menos cilíndricas que a amostra X11. Não foi possível obter fibras satisfatoriamente a partir das amostras X5 e X9 devido à baixa concentração de acetona da amostra X5 e à baixa concentração de AC na amostra X9.

As fibras eletrofiadas não exibiram alterações significativas em relação às suas propriedades térmicas em comparação ao pó de AC e apenas uma pequena mudança em seu perfil espectral de FTIR. Os ensaios mecânicos mostram que as fibras a base de AC possuem baixo módulo de elasticidade (~45 MPa) e deforma-se até aproximadamente 40%.

As amostras de AC recobertas com solução de QTS contendo PLUs em sua composição exibiram ângulos de contato dentro dos valores ideais para a proliferação de células de cicatrização.

As fibras de AC foram recobertas utilizando tanto a técnica de *spin coating* quanto por aspersão utilizando um aerógrafo. Entretanto, apenas no segundo caso foi observado deposição de quantidade relativamente alta (maior espessura da membrana), sendo que pelo *spin coating*, no melhor dos casos, foi depositado apenas uma camada muito fina de solução filmogênica. Uma estratégia que poderia ser empregada para tentar melhorar a dispersão da solução de QTS sobre as fibras de AC pela técnica de *spin coating* seria a modificação de alguns parâmetros da solução, concentração por exemplo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a diversas desvantagens apresentadas pelos curativos tradicionais a base de algodão, como por exemplo, adesão excessiva, periodicidade de manutenção elevada, crescimento celular através do curativo, dentre outros, existe a necessidade de desenvolver novos materiais que possam substituir os tradicionais de maneira a diminuir o desconforto dos pacientes. Este trabalho apresentou e discutiu sobre o desenvolvimento de um material eletrofiado a base de acetato de celulose recoberto com camada de quitosana/plurônico curcumina para possível aplicação em feridas cutâneas.

Na primeira parte do trabalho investigou-se o comportamento tautomerico da CUR em meio aquoso, a interação deste polifenol com os copolímeros P123 e F127 e a influência da temperatura em ambos os processos. Verificando-se que a forma enol da CUR está presente em maior quantidade, mesmo em meio aquoso, e que o aumento da temperatura tanto desloca o equilíbrio para a forma 1,3 diceto quanto aumenta a velocidade com que o equilíbrio é estabelecido. A presença de ambos os copolímeros em solução aquosa desloca o equilíbrio novamente para a forma ceto-enol e a interação entre a CUR e os copolímeros se torna mais significativa com o aumento da temperatura, sendo maior para CUR–P123 que para CUR–F127. As partículas, em solução, desses sistemas exibiram tamanhos médios inferiores a 100 nm, medidos por DLS.

Em seguida, desenvolveu-se o preparo de membranas a base de quitosana contendo o sistema CUR–PLU. A melhor maneira de preparar as soluções para posterior secagem foi utilizando adição direta da CUR e dos PLUs, com aquecimento brando e sem auxílio de fluxo de ar. A partir dos dados de microscopia confocal, verificou-se que a adição dos copolímeros às membranas diminui consideravelmente a presença de cristais de CUR. Além disso, as membranas contendo CUR preparadas com os PLUs exibiram melhora significativa nas propriedades mecânicas, de intumescimento, ângulo de contato, permeação ao vapor de água e na liberação do ativo, em comparação àquelas sem os copolímeros.

A liberação da CUR a partir das membranas a base de QTS se ajustou bem ao modelo cinético de Peppas-Sahlin, com liberação de até 70% após 350 h quando avaliada na presença de Tween 80. Todas as formulações contendo CUR exibiram atividade *in vitro* contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, possuindo valores de concentração inibitória mínima de 25 e 100 mg mL<sup>-1</sup> de gel, respectivamente. As análises *ex vivo* em pele abdominal humana mostraram que a presença dos copolímeros diminui um pouco a permeação da CUR, principalmente em relação as camadas mais superficiais da pele. No entanto, fazem com que ocorra aumento da fluorescência da pele, quando analisadas por confocal.

No capítulo posterior, foram desenvolvidas fibras de acetato de celulose por eletrofiação a partir de soluções com diferentes proporções acetona/etanol/água, sendo a que proporcionou maiores tempos de continuidade foi a amostra X12 composta por 11% de AC, 48% de acetona e 41% de mistura etanol/água (65/35). Aparentemente as propriedades térmicas e espectroscópicas das amostras não sofrem consideráveis alterações. Como demonstrado por microscopia eletrônica, a técnica convencional de aspersão por aerógrafo é superior ao *spin coating* no quesito economia de solução, uniformidade e quantidade de polímero depositado.

Desta forma, sistema formado pela aspersão de solução filmogênica de quitosana/plurônico contendo curcumina sobre as fibras eletrofiadas de acetato de celulose pode vir a servir como curativo para feridas e queimaduras.

## INDICADORES DE PRODUTIVIDADE NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO

No período em que o doutorado foi realizado, algumas publicações de trabalhos científicos em periódicos, capítulo de livro e apresentações de trabalhos em congressos foram realizadas, ora de trabalhos diretamente ligados aos resultados experimentais da presente tese, ora de trabalhos em colaboração envolvendo os projetos de outros alunos do Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos – POLIMAT. A seguir estão relacionadas as publicações neste período:

### Artigos completos publicados em periódicos:

1. de Moraes, F.A.P., **Enumo Jr, A.**, Gonçalves, R.S., Cesar, G.B., Miranda, N., Vilsinski, B.H., Combuca da Silva, R., Vataru Nakamura, C., Hioka, N., Caetano, W., 2019. Hypericin photodynamic activity. Part III: in vitro evaluation in different nanocarriers against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 18, 487–494. DOI: 10.1039/C8PP00444G

2. **Enumo, A.**, Pereira, C.I.D., Parize, A.L., 2019. Temperature Evaluation of Curcumin Keto–Enolic Kinetics and Its Interaction with Two Pluronic Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B* 123, 5641–5650. DOI: 10.1021/acs.jpccb.9b04150

### Capítulo de livro:

Parize, Alexandre L.; **Enumo, Adalberto**; Caon Branco, Natália B.. Chitosan Nanoparticles and Nanocapsules. *Frontiers in Biomaterials*. 1ed.: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2017, v. 3, p. 78-106. DOI: 10.2174/9781681084855117030007

### Apresentação de trabalhos em congressos:

SANCHES, M. P.; GROSS, I. P.; SAATKAMP, R. H.; **ENUMO JR, A.**; PARIZE, A. L.; SOLDI, V.. Avaliação da nanoencapsulação de óleo essencial de citronela em nanopartículas de pluronic® P123 decoradas com quitosana-alginato de sódio. Anais do 15º CBPol, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**ENUMO JR, A.**; da SILVA, S. L.; PARIZE, A. L.. Elaboração e avaliação das propriedades de membranas a base de quitosana contendo agente antifúngico. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves. Anais do 15º CBPol, 2019.

**ENUMO JR, A.**; GROSS, I. P.; SAATKAMP, R. H.; SANCHES, M. P.; PARIZE, A. L.. Avaliação das propriedades térmicas e mecânicas de filmes de poli(ácido láctico)

plastificados com ácido maleico e derivados esterificados. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves. Anais do 15º CBPol, 2019.

da SILVA, S. L.; **ENUMO JR, A.**; PARIZE, A. L.. Development and properties evaluation of chitosan-based membranes containing antifungal terbinafine. In: XVIII Brazil MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú. Anais do XVIII SBPMat, 2019.

**ENUMO JUNIOR, A.**; PARIZE, A. L.. Evaluation of the interaction between Pluronic triblock copolymers and curcumin. In: XVII Brazil MRS Meeting, 2018, Natal. Anais do XVII SBPMat, 2018.

**ENUMO JUNIOR, A.**; GROSS, I. P.; PARIZE, A. L.. INFLUÊNCIA DO GRAU DE INTUMESCIMENTO EM PROPRIEDADES MECÂNICAS DE MATRIZES DE QUITOSANA. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2018, Foz do iguaçu. Anais do 23º CBECiMat, 2018.

**ENUMO JUNIOR, A.**; ANDRZEJEWSKI, R. G.; PARIZE, A. L.. Evaluation of chitosan-based membrane containing Pluronic for curcumin incorporation. In: XVI Brazil MRS Meeting, 2017, Gramado. Anais do XVI SBPMat, 2017.

ANDRZEJEWSKI, R. G.; BRANCO, N. B. C.; **ENUMO JUNIOR, A.**; PARIZE, A. L.. Neutral chitosan membranes crosslinked with genipin: preparation and characterization. In: XVI Brazil MRS Meeting, 2017, Gramado. Anais do XVI SBPMat, 2017

## REFERÊNCIAS

1. ROWAN, M. P. et al. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2015.
2. KORRAPATI, P. S. et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 747–765, 2016.
3. KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 3, p. 217–233, 2017.
4. GRAND VIEW RESEARCH. **Traditional Wound Management Market Size, Share, & Trends Analysis Report By Product (Gauze, Tape, Bandage, Cotton), By Application (Chronic, Acute), By Region, Competitive Insights, And Segment Forecasts, 2019 - 2026**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/traditional-wound-management-market>>. Acesso em: 2 jan. 2020.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Burns**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns>>. Acesso em: 2 jan. 2020.
6. CHOUHAN, D. et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. **Biomaterials**, v. 216, n. May, p. 119267, 2019.
7. HUSSAIN, Z. et al. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: A review of new trends and state-of-the-art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 223–241, 2017.
8. ASGHARI, S.; LOGSETTY, S.; LIU, S. Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds. **Burns**, v. 42, n. 4, p. 877–883, 2016.
9. SELIG, H. F. et al. The properties of an “ideal” burn wound dressing - What do we need in daily clinical practice? Results of a worldwide online survey among burn care specialists. **Burns**, v. 38, n. 7, p. 960–966, nov. 2012.
10. TSEKOVA, P. B. et al. Electrospun curcumin-loaded cellulose acetate/polyvinylpyrrolidone fibrous materials with complex architecture and antibacterial activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 206–214, 2017.
11. NING, C. et al. Effect of hydrogel grafting, water and surfactant wetting on the adherence of PET wound dressings. **Burns**, v. 40, n. 6, p. 1164–1171, 2014.
12. HU, D.; QIANG, T.; WANG, L. Quaternized chitosan/polyvinyl alcohol/sodium carboxymethylcellulose blend film for potential wound dressing application. **Wound Medicine**, v. 16, p. 15–21, 2017.
13. KIM, H. S. et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2019.
14. PATRULEA, V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications.

**European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417–426, 2015.

15. MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127–136, 2014.

16. BASSAS-GALIA, M. et al. **Natural polymers: A source of inspiration**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016.

17. CIHAN, E.; POLAT, M.; POLAT, H. Designing of spherical chitosan nano-shells with micellar cores for solvation and safeguarded delivery of strongly lipophilic drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 529, n. June, p. 815–823, 2017.

18. ARAVAMUDHAN, A. et al. Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**, p. 67–89, 2014.

19. LAYEK, B.; MANDAL, S. Natural polysaccharides for controlled delivery of oral therapeutics: a recent update. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. August 2019, p. 115617, fev. 2020.

20. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, jul. 2006.

21. MA, Z.; GARRIDO-MAESTU, A.; JEONG, K. C. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. August, p. 257–265, 2017.

22. ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 273–286, 2018.

23. ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1003–1011, 2017.

24. HAMED, H. et al. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. March, p. 445–460, 2018.

25. FRANK, L. A. et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, n. December 2019, p. 104459, 2020.

26. NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.

27. AHSAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 97–109, 2018.

28. BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.

29. DAI, L. et al. 3D printing using plant-derived cellulose and its derivatives: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, n. March 2018, p. 71–86, 2019.

30. OKHOVAT, A.; ASHTIANI, F. Z.; KARIMI, M. A comparative study on thermodynamic phase behavior analysis of cellulose acetate, cellulose acetate propionate and cellulose acetate butyrate-DMF-water ternary systems. **Journal of Polymer Research**, v. 22, n. 12, p. 1–7, 2015.
31. KONWAR, L. J. et al. Sulfonated carbon as a new, reusable heterogeneous catalyst for one-pot synthesis of acetone soluble cellulose acetate. **RSC Advances**, v. 6, n. 11, p. 8829–8837, 2016.
32. TUNGPRAPA, S. et al. Electrospun cellulose acetate fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameter. **Cellulose**, v. 14, n. 6, p. 563–575, 2007.
33. LI, W. et al. Nanofibrous mats layer-by-layer assembled via electrospun cellulose acetate and electrosprayed chitosan for cell culture. **European Polymer Journal**, v. 48, n. 11, p. 1846–1853, 2012.
34. JAGANNATHAN, R.; ABRAHAM, P. M.; PODDAR, P. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: A mechanistic study of its solubility and stability. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 50, p. 14533–14540, 2012.
35. AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 1–7, 2014.
36. TEØNNESEN, H. H. et al. Studies on curcumin and curcuminoids - XXI. Variation in the content of curcuminoids in *Curcuma longa* L. and *Curcuma aromatica* Salisb. from India during one season. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 194, n. 6, p. 570–572, 1992.
37. ILANGOVAN, M. et al. *Curcuma longa* L. plant residue as a source for natural cellulose fibers with antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. January, p. 556–560, 2018.
38. NARDO, L. et al. Role of H-bond formation in the photoreactivity of curcumin. **Spectroscopy**, v. 22, n. 2–3, p. 187–198, 2008.
39. TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 180, n. 2, p. 132–134, 1985.
40. BERNABÉ-PINEDA, M. et al. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 1091–1097, abr. 2004.
41. ZHANG, Y. et al. pKa, Zinc- and Serum Albumin-Binding of Curcumin and Two Novel Biologically- Active Chemically-Modified Curcumins. p. 4367–4375, 2012.
42. KHARAT, M. et al. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 2017.
43. CHEN, J. et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 33–42, 2016.

44. CHAINANI-WU, N. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric ( *Curcuma longa* ). **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 1, p. 161–168, fev. 2003.
45. PULIDO-MORAN, M. et al. Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1–22, 2016.
46. KANT, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 322–330, 2014.
47. YANAGISAWA, D. et al. Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their A $\beta$ -binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 4179–4185, maio 2010.
48. TEJADA, S. et al. Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 11, p. 1002–1007, 2 set. 2016.
49. LUNDEVIG, D. M. S. et al. Curcumin induces differential expression of cytoprotective enzymes but similar apoptotic responses in fibroblasts and myofibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 330, n. 2, p. 429–441, 2015.
50. REZAI, M.; ORYAN, S.; JAVERI, A. Curcumin nanoparticles incorporated collagen-chitosan scaffold promotes cutaneous wound healing through regulation of TGF- $\beta$ 1/Smad7 gene expression. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, n. December 2018, p. 347–357, 2019.
51. PANCHATCHARAM, M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1–2, p. 87–96, 2006.
52. CARVALHO, D. DE M. et al. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 1, p. 115–119, 2015.
53. KURIEN, B. T. et al. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 4, p. 567–576, 2007.
54. MANDAL, S. et al. An investigation into the effect of the structure of bile salt aggregates on the binding interactions and ESIHT dynamics of curcumin: A photophysical approach to probe bile salt aggregates as a potential drug carrier. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 44, p. 13795–13807, 2013.
55. TØNNESEN, H. H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1–2, p. 127–135, 2002.
56. BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018bd.
57. BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.

58. ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARATH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules**, v. 27, n. 9, p. 2414–2425, abr. 1994.
59. KABANOV, A.; ZHU, J.; ALAKHOV, V. Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. **Advances in Genetics**, v. 53, n. 05, p. 231–261, 2005.
60. KADAM, Y. et al. Micelles from PEO–PPO–PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 49–57, mar. 2011.
61. KABANOV, A. V; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 1, p. 1–72, jan. 2002.
62. CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 303–317, jun. 2007.
63. BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and pH. **Langmuir**, v. 29, n. 13, p. 4350–4356, 2 abr. 2013.
64. HEYNE, B. Self-assembly of organic dyes in supramolecular aggregates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1103–1114, 2016.
65. HAZRA, M. K.; ROY, S.; BAGCHI, B. Hydrophobic hydration driven self-assembly of curcumin in water: Similarities to nucleation and growth under large metastability, and an analysis of water dynamics at heterogeneous surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 18, p. 18C501, 14 nov. 2014.
66. BHATIA, N. K. et al. Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. **RSC Advances**, v. 6, n. 105, p. 103275–103288, 2016bn.
67. MOOI, S. M.; KELLER, S. N.; HEYNE, B. Forcing aggregation of cyanine dyes with salts: A fine line between dimers and higher ordered aggregates. **Langmuir**, v. 30, n. 32, p. 9654–9662, 2014.
68. MOOI, S. M.; HEYNE, B. Size does matter: How to control organization of organic dyes in aqueous environment using specific ion effects. **Langmuir**, v. 28, n. 48, p. 16524–16530, 2012.
69. WOJTYK, J.; MCKERROW, A. Quantitative investigations of the aggregation behaviour of hydrophobic anilino squaraine dyes through UV/vis spectroscopy and dynamic light scattering. **Canadian journal of ...**, v. 912, n. 613, p. 903–912, 1999.
70. MANOLOVA, Y. et al. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 815–820, nov. 2014.

71. SAMANTA, S.; ROCCATANO, D. Interaction of curcumin with PEO-PPO-PEO block copolymers: A molecular dynamics study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 11, p. 3250–3257, 2013.
72. NEESE, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, p. 4–9, 2018.
73. BROWN, L. et al. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.
74. IGLESIAS, E. Solvent effects versus concentration effects in determining rates of base-catalyzed keto-enol tautomerization. **New Journal of Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 625, 2005.
75. VANZIN, D. et al. Microenvironment Effects on the Kinetics of the Alkaline Hydrolysis of Bispyridinium Conformers. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 45, n. 11, p. 703–711, nov. 2013.
76. VILSINSKI, B. H. et al. Spectroscopic Study of Aluminum Phthalocyanine Chloride (AlPcCl) in Homogeneous and Micro-Heterogeneous Media Consisting of P-123 and F-127 Polymeric Micelles. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 631–639, 2015.
77. RANGEL-YAGUI, C. O. et al. Micellar solubilization of ibuprofen: influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.
78. DE, M. et al. Interfacial Composition, Structural and Thermodynamic Parameters of Water/(Surfactant+n-Butanol)/n-Heptane Water-in-Oil Microemulsion Formation in Relation to the Surfactant Chain Length. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 13, n. 4, p. 475–484, 10 out. 2010.
79. GHATAK, C. et al. An Understanding of the Modulation of Photophysical Properties of Curcumin inside a Micelle Formed by an Ionic Liquid: A New Possibility of Tunable Drug Delivery System. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 10, p. 3369–3379, 15 mar. 2012.
80. LI, J. et al. Viewing Molecular and Interface Interactions of Curcumin Amorphous Solid Dispersions for Comprehending Dissolution Mechanisms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 2781–2792, 7 ago. 2017.
81. LÖF, D. et al. A Calorimetry and Light Scattering Study of the Formation and Shape Transition of Mixed Micelles of EO 20 PO 68 EO 20 Triblock Copolymer (P123) and Nonionic Surfactant (C 12 EO 6 ). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 21, p. 5911–5920, maio 2007.
82. KAROLEWICZ, B. et al. Pluronic F127 as a suitable carrier for preparing the imatinib base solid dispersions and its potential in development of a modified release dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 1, p. 383–390, 15 out. 2017.
83. PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.
84. KHOPDE, S. M. et al. Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of

curcumin. **Photochemistry and photobiology**, v. 72, n. 5, p. 625–631, 2000.

85. BONG, P. H. Spectral and photophysical behaviors of curcumin and curcuminoids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 81–86, 2000.

86. ANJOMSHOA, S.; NAMAZIAN, M.; NOORBALA, M. R. The Effect of Solvent on Tautomerism, Acidity and Radical Stability of Curcumin and Its Derivatives Based on Thermodynamic Quantities. **Journal of Solution Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1021–1030, 4 jul. 2016.

87. HUANG, Y. et al. Characterization of keto-enol tautomerism of p -hydroxyphenylpyruvic acid using CE with amperometric detection and spectrometric analysis. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23–24, p. 4155–4160, dez. 2009.

88. SIMON, A. et al. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure–activity relationships. **Cancer Letters**, v. 129, n. 1, p. 111–116, jul. 1998.

89. VILSINSKI, B. H. et al. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 3, p. 518–525, maio 2015.

90. GANGULY, R. et al. Heat-induced solubilization of curcumin in kinetically stable pluronic P123 micelles and vesicles: An exploit of slow dynamics of the micellar restructuring processes in the aqueous pluronic system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 176–182, abr. 2017.

91. DE MORAIS, F. A. P. et al. Hypericin photodynamic activity. Part III: in vitro evaluation in different nanocarriers against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 487–494, 2019.

92. ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interface: thermodynamics, structure, dynamics and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, p. 1–46, 1995.

93. CHATTERJEE, A.; MAITY, B.; SETH, D. Photophysics of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid in cationic micelles: Effect of chain length and head group of the surfactants and urea. **RSC Advances**, v. 4, n. 64, p. 34026–34036, 2014.

94. WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Macromolecules**, v. 27, n. 15, p. 4145–4159, jul. 1994.

95. RAVAL, A. et al. Systematic characterization of Pluronic® micelles and their application for solubilization and in vitro release of some hydrophobic anticancer drugs. **Journal of Molecular Liquids**, v. 230, p. 473–481, 2017.

96. LOPES, J. R.; LOH, W. Investigation of Self-Assembly and Micelle Polarity for a Wide Range of Ethylene Oxide–Propylene Oxide–Ethylene Oxide Block Copolymers in Water. **Langmuir**, v. 14, n. 4, p. 750–756, 1998.

97. NAKASHIMA, K.; BAHADUR, P. Aggregation of water-soluble block copolymers in

aqueous solutions: Recent trends. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123–126, n. SPEC. ISS., p. 75–96, 2006.

98. GHOSH, S. et al. Organic additive, 5-methylsalicylic acid induces spontaneous structural transformation of aqueous pluronic triblock copolymer solution: A spectroscopic investigation of interaction of curcumin with pluronic micellar and vesicular aggregates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 39, p. 11437–11448, 2014.

99. CHAT, O. A. et al. Aggregation and Rheological Behavior of the Lavender Oil–Pluronic P123 Microemulsions in Water–Ethanol Mixed Solvents. **Langmuir**, v. 34, n. 3, p. 1010–1019, 23 jan. 2018.

100. FUGITA, R. A. et al. Thermal behaviour of curcumin. **Brazilian Journal of Thermal analysis**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 2012.

101. GOUD, N. R. et al. Fast dissolving eutectic compositions of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 63–72, dez. 2012.

102. SINGH, P. K. et al. From micron to nano-curcumin by sophorolipid co-processing: highly enhanced bioavailability, fluorescence, and anti-cancer efficacy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 104, p. 60334–60341, 2014.

103. HARADA, T. et al. The capture and stabilization of curcumin using hydrophobically modified polyacrylate aggregates and hydrogels. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 31, p. 9515–9523, 2014.

104. TRINCA, R. B. et al. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. **European Polymer Journal**, v. 88, p. 161–170, 2017.

105. RIBEIRO, M. P. et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 6, p. 817–824, 2009.

106. BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

107. TANASALE, M. F. J. D. P.; BIJANG, C. M.; RUMPAKWARA, E. Preparation of Chitosan with Various Molecular Weight and Its Effect on Depolymerization of Chitosan with Hydrogen Peroxide using Conventional Technique. **International Journal of ChemTech Research**, v. 12, n. 01, p. 112–120, 2019.

108. PARK, S. Y.; MARSH, K. S.; RHIM, J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 194–197, 2002.

109. CUZZUCOLI CRUCITTI, V. et al. Intermolecular interaction and solid state characterization of abietic acid/chitosan solid dispersions possessing antimicrobial and antioxidant properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, n. June 2017, p. 114–123, 2018.

110. DE Y. POZZO, L. et al. Chitosan coatings crosslinked with genipin for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy sheets. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. August 2017, p. 71–77, 2018.

111. PARIZE, A. L. et al. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1127–1132, 2012.
112. ASTM INTERNATIONAL. ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM Standards**, p. 12, 2012.
113. BAJPAI, S. K. et al. Curcumin/cellulose micro crystals/chitosan films: Water absorption behavior and in vitro cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 239–247, 2015.
114. ASTM INTERNATIONAL. ASTM E96/E96M–16: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. **ASTM Standards**, v. 14, n. July 2000, p. 1–10, 2002.
115. MAZZARINO, L. et al. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 219–226, 2010.
116. VRANIĆ, E.; UZUNOVIĆ, A. Study of the Applicabilty of Content Uniformity and Dissolution Variation Test on Ropinirole Hydrochloride Tablets. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 193–200, 20 maio 2008.
117. ABLA, M. J.; BANGA, A. K. Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 1, p. 19–26, 2012.
118. CAON, T. et al. Lipid- and Polymer-Based Nanostructures for Cutaneous Delivery of Curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 920–925, 2017.
119. PATEL, S.; AUNDHIA, C.; SHAH, N. EMULGEL : A NOVEL APPROACH FOR TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEM Article send by Biomedical European of. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 9, p. 501–506, 2016.
120. ALMEIDA, C. M. R. et al. The role of choline chloride-based deep eutectic solvent and curcumin on chitosan films properties. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 456–466, 2018.
121. YADAV, P. et al. Enhancement of anticancer activity and drug delivery of chitosan-curcumin nanoparticle via molecular docking and simulation analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, n. November 2017, p. 188–198, 2018dq.
122. BUENO, C. Z. et al. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 117–125, 2014.
123. LUO, N. et al. Preparation and characterization of cellulose/curcumin composite films. **RSC Advances**, v. 2, n. 22, p. 8483, 2012.
124. SIONKOWSKA, A. et al. The photochemical stability of collagen - Chitosan blends. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 162, n. 2–3, p. 545–554, 2004.
125. MUKERJEE, A. et al. Spectroscopic properties of curcumin: Orientation of transition moments. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 39, p. 12679–12684, 2010.

126. QUEIROZ, M. F. et al. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 141–158, 2015.
127. DATTA, M. Organoclay Pluronic F68 – Montmorillonite, as a sustained release drug delivery vehicle for propranolol hydrochloride. **European Chemical Bulletin**, v. 3, n. 6, p. 593–604, 2014.
128. JARDIM, K. V. et al. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 294–304, 2015.
129. DOU, Q.; KARIM, A. A.; LOH, X. J. Modification of thermal and mechanical properties of PEG-PPG-PEG copolymer (F127) with MA-POSS. **Polymers**, v. 8, n. 9, 2016.
130. DHAWADE, P. P.; JAGTAP, R. N. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. **Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 3, p. 1372–1382, 2012.
131. DONG, Y. et al. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 4, p. 1553–1558, 2004.
132. BIZARRIA, M. T. M.; D'ÁVILA, M. A.; MEI, L. H. I. Non-woven nanofiber chitosan/PEO membranes obtained by electrospinning. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 1, p. 57–68, 2014.
133. RIVERO, S. et al. An Insight into the Role of Glycerol in Chitosan Films. **Food Biophysics**, v. 11, n. 2, p. 117–127, 2016.
134. JOHN, F.; GEORGE, J. Curcumin Encapsulated Alginate/Pluronic Block Copolymer Micelles as a Promising Therapeutic Agent. **UK Journal of Pharmaceutical Biosciences**, v. 2, n. 3, p. 6, 2014.
135. KALAYCIOĞLU, Z. et al. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 882–888, 2017.
136. TSAI, H. A. et al. Mechanical properties of asymmetric polysulfone membranes containing surfactant as additives. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 25, p. 5917–5922, 2001.
137. CASTAÑO, O. et al. Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 129, p. 95–117, 2018.
138. NASERI-NOSAR, M.; ZIORA, Z. M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, n. January, p. 379–398, 2018.
139. BOER, M. et al. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 33, n. 1, p. 1–5, 2016.

140. SHARIATINIA, Z.; FAZLI, M. Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 112–124, 2015.
141. OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; GIERSZEWSKA, M.; PIERÓG, M. pH-responsive hydrogel membranes based on modified chitosan: water transport and kinetics of swelling. **Journal of Polymer Research**, v. 22, n. 8, p. 153, 19 ago. 2015.
142. DJOKIĆ, J. D. et al. Processing and nanomechanical properties of chitosan/poly(ethylene oxide) blend films. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 12, p. 1723–1733, 2012.
143. YAP, L. S.; YANG, M. C. Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 204–211, 2016.
144. ROHINDRA, D. R.; NAND, A. V.; KHURMA, J. R. Swelling properties of chitosan hydrogels. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 22, n. 1, p. 32, 2004.
145. SAHU, A. et al. Encapsulation of curcumin in Pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 25, n. 6, p. 619–639, 2011.
146. QIN, W. et al. Fabrication of porous chitosan membranes composed of nanofibers by low temperature thermally induced phase separation, and their adsorption behavior for Cu<sup>2+</sup>. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. June, p. 338–346, 2017.
147. BEIGZADEH GHELEJLU, S.; ESMAILI, M.; ALMASI, H. Characterization of chitosan-nanoclay bionanocomposite active films containing milk thistle extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 613–621, 2016.
148. GANESAN, P. Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications. **Wound Medicine**, v. 18, p. 33–40, 2017.
149. OLIVEIRA, S. M.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. Cell interactions with superhydrophilic and superhydrophobic surfaces. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 28, n. 8–9, p. 843–863, 2014.
150. MIRHOSSEINI, M. M.; HADDADI-ASL, V.; ZARGARIAN, S. S. Fabrication and characterization of hydrophilic poly( $\epsilon$ -caprolactone)/pluronic P123 electrospun fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 17, p. 1–11, 2016.
151. HOMEZ-JARA, A. et al. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233–1240, 2018.
152. CHIGNELL, C. F. et al. SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.
153. PETROVIĆ, L. B. et al. An investigation of chitosan and sodium dodecyl sulfate interactions in acetic media. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 81, n. 5, p. 575–

587, 2016.

154. OU, A.; BO, I. Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, v. 07, n. 03, 2017.

155. BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. In: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. [s.l.] Elsevier, 2015ey. p. 63–86.

156. CHEN, X. G. et al. Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5915–5918, 2002.

157. LUCERO, H. A.; KAGAN, H. M. Review Lysyl oxidase : an oxidative enzyme and effector of cell function. v. 63, p. 2304–2316, 2006.

158. AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 27–37, 2016.

159. GUNES, H. et al. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 2, p. 246–250, 2016.

160. TEOU, S. et al. Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus : A Brief Review. v. 2016, 2016.

161. SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope T. J. Silhavy, D. Kahne and S. Walker, . **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, p. 1–16, 2010.

162. KALANTARI, K. et al. Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, n. October 2018, p. 588–600, 2019.

163. ELSABEE, M. Z.; NAGUIB, H. F.; MORSI, R. E. Chitosan based nanofibers, review. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 1711–1726, 2012.

164. HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018.

165. GHATMALE, P. et al. Review : Electro Spinning Technique and Factors Affecting Electro Spun Nano Fibers and Some Applications. **International Journal for Scientific Research & Development**, v. 4, n. 04, p. 681–686, 2016.

166. KONWARH, R.; KARAK, N.; MISRA, M. Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 4, p. 421–437, 2013.

167. ANGEL, N. et al. Effect of processing parameters on the electrospinning of cellulose acetate studied by response surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, n. November 2019, p. 100015, 2020.

168. MATULEVIČIUS, J.; KLIUČININKAS, L.; MARTUZEVIČIUS, D. Electrospinning

of cellulose acetate fibers from a ternary solvent system. **Chemija**, v. 25, n. 2, p. 125–129, 2014.

169. SALIHU, G.; GOSWAMI, P.; RUSSELL, S. Hybrid electrospun nonwovens from chitosan/cellulose acetate. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 739–749, 2012.

170. LI, X. et al. Coating electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. **Langmuir**, v. 24, n. 24, p. 14145–14150, 2008.

171. SON, W. O. N. K. et al. Electrospinning of Ultrafine Cellulose Acetate Fibers : Studies of a New Solvent System and Deacetylation of. p. 5–11, 2003.

172. RODRÍGUEZ, K. et al. Electrospun nanofibrous cellulose scaffolds with controlled microarchitecture. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, n. March 2015, p. 143–149, 2014.

173. LIU, H.; TANG, C. Electrospinning of Cellulose Acetate in Solvent Mixture N,N-Dimethylacetamide (DMAc)/Acetone. **Polymer Journal**, v. 39, n. 1, p. 65–72, 2007.

174. HALL, D. B.; UNDERHILL, P.; TORKEKELSON, J. M. Spin coating of thin and ultrathin polymer films. **Polymer Engineering and Science**, v. 38, n. 12, p. 2039–2045, 1998.

175. SCALARONE, D.; MAGNACCA, G.; NISTIC, R. Microporous and Mesoporous Materials Sol-gel chemistry , templating and spin-coating deposition : A combined approach to control in a simple way the porosity of inorganic thin films / coatings. v. 248, p. 18–29, 2017.