

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
*CAMPUS* POÇOS DE CALDAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS

**SAMIRA FALEIROS SILVA BRIANEZI**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E  
mPEG-PCL PARA RECOBRIMENTO DE FERIDAS E LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE GENTAMICINA**

Poços de Caldas/MG

2016

**SAMIRA FALEIROS SILVA BRIANEZI**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E  
mPEG-PCL PARA RECOBRIMENTO DE FERIDAS E LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE GENTAMICINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Polímeros e Biomateriais.  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos.  
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernandes Costa Marques.

Poços de Caldas/MG

2016

B849p Brianezi, Samira Faleiros Silva.

Preparação e caracterização de membranas de quitosana e mPEG-PCL para recobrimento de feridas e liberação controlada de gentamicina / Samira Faleiros Silva Brianezi. – Poços de Caldas, 2016.

67 f. -

Orientadora: Maria Gabriela Nogueira Campos.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2016.  
Bibliografia.

1. Gentamicina. 2. Copolímeros. 3. Quitosana. 4. Cicatrização de feridas. I. Campos, Maria Gabriela Nogueira. II. Título.

CDD: 620.192

**SAMIRA FALEIROS SILVA BRIANEZI**

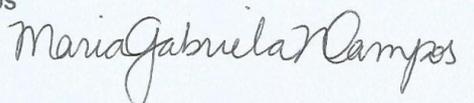
**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E  
mPEG-PCL PARA RECOBRIMENTO DE FERIDAS E LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE GENTAMICINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Polímeros e Biomateriais.

Aprovado em: 30/05/2016

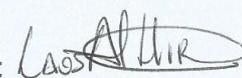
Professor (a): Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

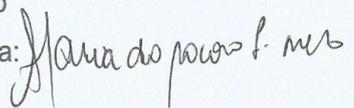
Professor (a): Dr. Laos Alexandre Hirano

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Professora (a): Dra. Maria do Socorro Fernandes Melo

Instituição: FACULDADE PITAGORAS

Assinatura: 

Ao meu marido Patrick,  
meu filho Arthur, pela  
paciência e amor.

Aos meus pais e  
meus sogros, pelo incentivo  
e carinho sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui.

A minha orientadora Dra Maria Gabriela Nogueira Campos por sua orientação, paciência e dedicação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Marques e à sua equipe do Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP pela ajuda.

À equipe da UNIFAL-MG e do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais por terem me possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe da Unicamp - SP e à empresa M&G fibras de Poços de Caldas pela colaboração com algumas análises.

Aos meus colegas do Programa que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

## RESUMO

Atualmente é de grande interesse a fabricação de novos materiais para o recobrimento de feridas de pele. A quitosana (QUIT) é um material funcional por suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Além disso, pode acelerar a cicatrização de feridas e se mostra hemostática e bactericida. A policaprolactona (PCL) é um poliéster com propriedades compatíveis e biodegradabilidade, encontrado em várias aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos. O copolímero de metoxi polietileno glicol (mPEG) e PCL, o mPEG-PCL, é um copolímero anfifílico biodegradável, tornando possível a interação da PCL (hidrofóbica) com a QUI, que é hidrofílica. A gentamicina (GE), também hidrofílica, é um dos antibióticos mais utilizados devido ao seu baixo custo e boa estabilidade. Nesta pesquisa foram preparadas membranas de QUIT com mPEG-PCL e GE, as quais foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), colorimetria, análise na região do infravermelho (FTIR), termogravimetria (TG), calorimetria diferencial exploratória (DSC), umidade e porcentagem de intumescimento. Ainda, foram realizados ensaios de liberação de GE *in vitro* e da atividade antimicrobiana, utilizando *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A distribuição uniforme do copolímero mPEG-PCL na matriz de QUIT e a presença de GE na superfície das mesmas foram observadas nas micrografias de MEV e comprovadas por FTIR. Além disso, não houve alteração significativa na cor L das membranas, que se mostraram translúcidas, propriedade importante para recobrimentos de ferida. Por DSC, obteve-se temperaturas de fusão intermediárias, comparando-se com as da QUIT e do mPEG-PCL, porém superiores à temperatura corpórea (37°C). A TG mostrou perda de massa das membranas em temperaturas superiores a 37°C. As membranas foram capazes de absorver tampão, simulando os fluidos exsudados da ferida e apresentaram cerca de 15% de umidade. Nos testes de atividade antimicrobiana, foi possível observar halo de inibição ao redor das membranas carregadas com GE, que teve uma liberação inicial menor na membrana com maior concentração de mPEG-PCL no ensaio de liberação *in vitro*.

Palavras-chave: Gentamicina. mPEG-PCL. Quitosana. Recobrimento de feridas de pele.

## ABSTRACT

It is currently of great interest to the manufacture of new materials for covering skin wounds. Chitosan (QUIT) is a functional material for its biodegradability characteristics, biocompatibility and non-toxicity. Furthermore, it can accelerate wound healing and hemostatic and bactericidal shown. Polycaprolactone (PCL) is a polyester with consistent properties and biodegradability, found in various biomedical applications such as controlled drug release. Methoxy polyethylene glycol copolymer (mPEG) and PCL, mPEG-PCL, is a biodegradable amphiphilic copolymer, making possible the interaction of PCL (hydrophobic) with QUIT which is hydrophilic. Gentamicin (GE) also hydrophilic, is one of the most widely used antibiotics due to its low cost and good stability. In this research were prepared QUIT membranes with mPEG-PCL and GE, which were characterized by scanning electron microscopy (SEM), colorimetry, look in the infrared (FTIR), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC) humidity and percentage of swelling. Furthermore, GE release assays and in vitro antimicrobial activity were conducted using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The uniform distribution of the mPEG-PCL copolymer QUIT matrix and the presence of GE on their surface were observed in the SEM micrographs and tested by FTIR. Moreover, there was no significant change in color L membrane, which showed translucent, important property for wound coverings. DSC was obtained intermediate melting temperatures, comparing with the QUIT and mPEG-PCL, but higher than body temperature (37<sup>0</sup>C). The TG showed weight loss of membranes at temperatures above 37<sup>0</sup>C. The membranes were capable of absorbing buffer simulating the exuded fluids from the wound and had about 15% moisture. In the antimicrobial activity test, we observed inhibition halo around the charged membranes with GE, which had a lower initial release in the membrane with the highest concentration of mPEG-PCL in vitro release test.

Keywords: Gentamicin. mPEG-PCL. Chitosan. Skin wound dressing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Camadas da pele.....	15
Figura 2 - Fórmula Estrutural da quitosana.....	21
Figura 3 - Fórmula estrutural da Policaprolactona.....	22
Figura 4 - Fórmula Estrutural do Sulfato de Gentamicina.....	24
Figura 5 - Desenho exemplificando os pontos onde foram tomadas as medidas de espessura nas membranas.....	29
Figura 6 - Representação de cor sólida para $L^*$ $a^*$ $b^*$ no espaço colorido.....	29
Figura 7 - Membranas de quitosana com e sem gentamicina.....	37
Figura 8 - Membranas sem gentamicina.....	37
Figura 9 - Membranas com gentamicina.....	37
Figura 10 - Gráfico referente à cor $L^*$ das membranas.....	38
Figura 11 - Gráfico referente à cor $a^*$ das membranas.....	39
Figura 12 - Gráfico referente à cor $b^*$ das membranas.....	40
Figura 13 - Imagens de Microscopia eletrônica de varredura para as amostras.....	42
Figura 14 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para os componentes mPEG-PCL em pó, quitosana em pó e solução de gentamicina 5,6 mg/mL.....	43
Figura 15 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para as membranas sem gentamicina.....	44
Figura 16 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para as membranas com gentamicina.....	45
Figura 17 - Curvas de análise termogravimétrica para as membranas sem gentamicina e para os componentes mPEG-PCL pó e quitosana pó.....	47
Figura 18 - Curvas de termogravimetria derivada para as membranas sem gentamicina e para os componentes mPEG-PCL e quitosana pó..	48
Figura 19 - Curva da calorimetria diferencial exploratória (DSC) para as membranas sem gentamicina, para quitosana pó e mPEG-PCL....	50
Figura 20 - Porcentagem de intumescimento das membranas à 37°C.....	51

Figura 21 - Resultado da atividade antimicrobiana das membranas nas placas cultivadas <i>Escherichia coli</i> .....	54
Figura 22 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura para as membranas após ensaio de atividade antimicrobiana.....	55
Figura 23 - Resultado da atividade antimicrobiana das membranas nas placas com <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
Figura 24 - Curva padrão de absorvância (u.a.) x concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) para a solução de gentamicina.....	58
Figura 25 - Gráfico de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) x tempo (h) para liberação controlada de solução de gentamicina até 5 horas.....	59
Figura 26 - Gráfico de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) x tempo (dias) para liberação controlada de solução de gentamicina até 7 dias.....	60
Figura 27 - Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória para as amostras sem gentamicina.....	68
Figura 28 - Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória para as amostras com gentamicina.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das membranas.....	28
Tabela 2 - Espessura das membranas sem gentamicina em $\mu\text{m}$ .....	36
Tabela 3 - Espessura das membranas com gentamicina em $\mu\text{m}$ .....	36
Tabela 4 - Parâmetros de cor $L^*$ , cor $a^*$ e cor $b^*$ .....	40
Tabela 5 - Diferença total de cor.....	41
Tabela 6 - Porcentagem de perda de massa.....	46
Tabela 7 - Resultados de calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	49
Tabela 8 - Teor de umidade para as membranas sem gentamicina.....	52
Tabela 9 - Teor de umidade para as membranas com gentamicina.....	52
Tabela 10- Tamanho dos halos nas membranas.....	56

## LISTA DE SIGLAS

DSC	- Calorimetria diferencial exploratória/ <i>Differential scanning calorimetry</i>
FDA	- <i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	- Infravermelho por transformada de Fourier/ <i>Fourier Transform Infrared</i>
GE	- Solução de Gentamicina
LB	- Luria-Bertani
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
mPEG	- metoxi polietileno glicol
mPEG-PCL	- copolímero metoxi Poli (Etileno Glicol) e Policaprolactona
PCL	- Policaprolactona
QUI	- Quitosana
QUIT	- Membrana de quitosana
QUIT – GE	- Membrana de quitosana com gentamicina
T <sub>m</sub>	- Temperatura de fusão
1/8 mPEG-PCL/QUIT	- Membrana com 0,0125 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana
1/4 mPEG-PCL/QUIT	- Membrana com 0,025 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana
1/2 mPEG-PCL/QUIT	- Membrana com 0,05 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana
1/8 mPEG-PCL/QUIT – GE	- Membrana com 0,0125 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana e 1,0 mL de solução de gentamicina
1/4 mPEG-PCL/QUIT – GE	- Membrana com 0,025 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana e 1,0 mL de solução de gentamicina
1/2 mPEG-PCL/QUIT – GE	- Membrana com 0,05 g de mPEG- PCL, 0,1 g de quitosana e 1,0 mL de solução de gentamicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1	PELE.....	15
2.2	LESÕES DO TECIDO EPITELIAL/CICATRIZAÇÃO.....	16
2.3	CURATIVOS/TRATAMENTOS.....	17
<b>2.3.1</b>	<b>Enxertos/ queimaduras.....</b>	<b>18</b>
2.4	BIOMATERIAIS.....	19
2.5	QUITOSANA.....	19
2.6	POLICAPROLACTONA (PCL).....	21
2.7	QUITOSANA/ PCL.....	22
2.8	mPEG-PCL.....	23
2.9	GENTAMICINA.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	MATERIAIS.....	26
<b>3.1.1</b>	<b>Chitosana.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Copolímero mPEG-PCL.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Gentamicina.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Ninidrina.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Ácido acético glacial, PA.....</b>	<b>27</b>
3.2	MÉTODOS.....	27
<b>3.2.1</b>	<b>Preparação das membranas.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Espessura.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Cor e Opacidade.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Análise Morfológica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Análise de Infravermelho (FTIR).....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Análise termogravimétrica (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG).....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Umidade.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Comportamento hídrico (<i>Swelling Behavior</i>).....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Estudo antibacteriano.....</b>	<b>33</b>

<b>3.2.11</b>	<b>Estudo da liberação de gentamicina <i>in vitro</i>.....</b>	<b>33</b>
3.2.11.1	OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO.....	33
3.2.11.2	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
4.1	ESPESSURA.....	35
4.2	COR E OPACIDADE.....	36
4.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	41
4.4	ANÁLISE DE INFRAVERMELHO.....	42
4.5	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG).....	45
4.6	ANÁLISE TÉRMICA.....	48
4.7	ABSORÇÃO DE ÁGUA.....	50
4.8	UMIDADE.....	51
4.9	ANÁLISE ANTIBACTERIANA.....	52
4.10	CURVA PADRÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE GENTAMICINA.....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho experimental constitui no desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana e copolímero metoxi Poli (Etileno Glicol) Policaprolactona carregadas com gentamicina; e no estudo *in vitro* da liberação de gentamicina. As mesmas podem ser aplicadas no desenvolvimento de adesivos para o tratamento de feridas; e no estudo *in vitro* da liberação de gentamicina e da atividade antimicrobiana das membranas.

As feridas cutâneas acometem um número muito grande de pessoas no Brasil e no Mundo, sendo provocadas por queimaduras, infecções crônicas, insuficiência vascular, diabetes e hipertensão, podendo levar o paciente a morte devido à perda de grandes áreas da pele (ADAM et al., 1999).

A pele é o maior órgão do corpo tendo como principais funções proteção contra infecções, lesões, traumas, raios solares e sendo importante no controle da temperatura corpórea (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

Com o notável crescimento do estudo para criação de novas formas para liberação controlada de fármacos, tem se dado destaque a produção e utilização de membranas produzidas a partir de polímeros biodegradáveis, por possuírem baixo custo e fácil acesso (LISTONI, 2013).

Um material atualmente muito utilizado no tratamento de feridas para liberação controlada de fármacos é a quitosana, que é derivada da quitina, um produto natural encontrado em camarões e cascas de caranguejo, e obtida por desacetilação química; esta foi utilizada como um dos componentes da membrana. A quitosana possui várias aplicações como implantes, matriz de liberação de fármacos, suporte para engenharia de tecidos, substituições cutâneas e curativos (HOEMANN, 2005).

A quitosana destaca-se por sua abundância, baixa toxicidade e biodegradabilidade e é um dos polímeros com maior citação no estudo de monitoramento tecnológico de biomateriais, podendo ser utilizada na liberação de diferentes drogas. Também é utilizada na produção de pele artificial e na cicatrização de diferentes tipos de feridas por atuar como agente homeostático e cicatrizante, tendo ação antifúngica e bactericida (LISTONI, 2013).

Outro material também utilizado neste trabalho foi a PCL, que é um poliéster biodegradável, semicristalino, encontrando em várias aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos, suturas e suporte para engenharia de tecidos,

devido as suas propriedades compatíveis e sua biodegradabilidade. É um biomaterial aprovado pela FDA (*Food and Drugs Administration*) para liberação de fármacos. Possui baixo ponto de fusão (60°C) sendo de fácil processamento e biodegradável por hidrólise (SAHOO et al.,2010).

Embora a PCL seja muito utilizada como um material de matriz suas aplicações são um pouco limitadas por possuir algumas desvantagens como baixa atividade bioregulamentar, alta hidrofobicidade, distribuição de carga neutra, lenta taxa de degradação e produto de degradação ácida (GU et al., 2014; SAHOO et al., 2010). Dessa forma, a associação da PCL com a quitosana pode ser uma alternativa para contornar tais desvantagens. Entretanto, tais polímeros são supostamente incompatíveis, uma vez que a quitosana é um polímero polar, portanto hidrofílico e a PCL, um polímero apolar portanto hidrofóbico.

Uma forma de tornar essa mistura compatível é a adição de produtos químicos que possuem parte hidrofílica e parte hidrofóbica, como por exemplo, o poli (óxido de etileno) (SAHOO et al., 2010).

O metoxi polietilenoglicol (mPEG), é um polímero hidrofílico, atóxico, antígeno e imunogênico e pode ser copolimerizado com a PCL para aumentar a sua hidrofílicidade, estendendo suas aplicações (MARQUES et al., 2015). Dessa forma a associação da quitosana com o mPEG-PCL garante o equilíbrio de propriedades, tornando o material interessante para liberação controlada de fármacos.

A gentamicina é um dos antibióticos mais utilizados, devido ao seu baixo custo, ampla ação antibacteriana, baixa taxa de resistência patogênica e de alergia, boa estabilidade e solubilidade em água (CAMPOS et al.,2009; FRUTOS et al., 2000). Portanto, foi objetivo deste trabalho preparar e caracterizar membranas de quitosana e mPEG-PCL para potencial aplicação no tratamento de feridas e estudar o efeito da incorporação do copolímero mPEG-PCL na matriz de quitosana na liberação controlada *in vitro* e na atividade antimicrobiana da gentamicina, utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que são as principais contaminantes das feridas de pele.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será feita uma revisão bibliográfica abordando uma visão geral sobre o tema.

### 2.1 PELE

A pele é o maior tecido do corpo humano e serve como uma proteção entre o corpo humano e o meio ambiente, protegendo os órgãos e o corpo contra organismos patógenos e micro-organismos (GROEBER et al., 2011).

De acordo com Campos et al. (2005), a pele é um tecido viscoelástico que é submetida a leves tensões.

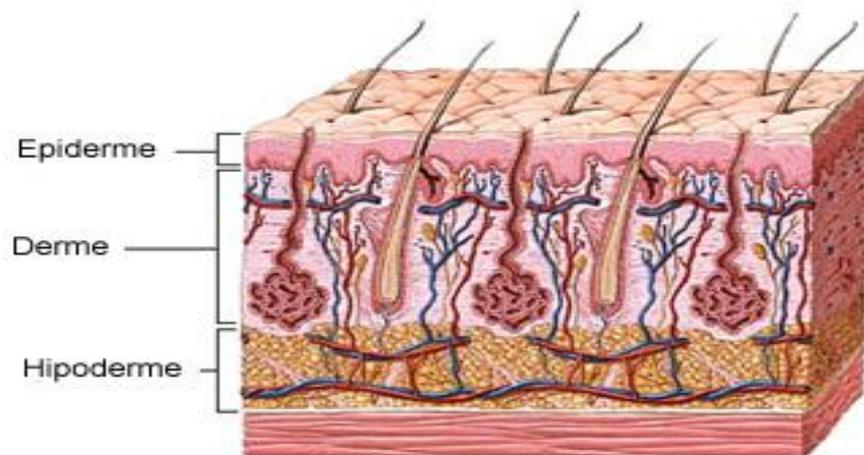


Figura 1 - Camadas da pele.

Fonte: A.D.A.M., (2013).

Protege o corpo de forças externas, integra os complexos sistemas sensoriais nervosos e de imunidade, controla a perda de líquidos e desempenha importantes funções estéticas (RATNER et al, 2013).

Compõe-se de duas camadas principais, conforme Figura 1: a derme e a epiderme. Há ainda uma terceira camada, a hipoderme que é composta principalmente de gordura. Estas três camadas desempenham um papel importante de proteção contra choques mecânicos protegendo contra feridas. A derme constitui a maior parte da pele e é composta de colágeno com elastina e alguns glicosaminoglicanos. Os fibroblastos são o maior tipo de célula presente na derme, e

são capazes de produzir enzimas importantes no processo de cicatrização da pele (METCALFE; FERGUSON, 2007). Nela encontram-se os vasos sanguíneos, linfáticos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, pelos e terminações nervosas. A epiderme é constituída das camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, um importante órgão sensorial (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

Ainda de acordo com Metcalfe e Ferguson (2007) é fina e altamente celular, composta principalmente de queratinócitos e nas camadas epidérmicas inferiores, melanócitos para pigmentação.

A terceira camada, a hipoderme, contém tecido adiposo que é bem vascularizado e contribui para regularização e propriedades mecânicas da pele (METCALFE; FERGUSON, 2007).

## 2.2 LESÕES DO TECIDO EPITELIAL/ CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização se inicia logo após a ocorrência de uma lesão para que o tecido lesionado seja substituído por um tecido conjuntivo vascularizado, promovendo o reestabelecimento da homeostase tecidual. A pele é um tecido bastante exposto aos fatores ambientais. (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Quando a área de uma ferida é muito grande e não pode ser tratada com procedimentos convencionais pode ocorrer até a morte do paciente. Os defeitos da pele podem ser divididos de acordo com a profundidade da lesão como: I) epidérmica, II) espessura parcial superficial, III) espessura parcial profunda, IV) feridas de pele de espessura total. As feridas das categorias de I a III podem se regenerar pela capacidade de auto cura da pele. Em contraste, as feridas de pele de espessura total são especificadas por uma completa destruição dos elementos regenerativos epiteliais que estão na derme (GROEBER et al., 2011).

A cicatrização pode ser descrita como o conjunto de processos que se iniciam logo após uma lesão, em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos interagindo entre si para que ocorra a reconstituição epitelial (CAMPOS; BRANCO; GROTH, 2007).

Campos, Branco e Groth (2007) descrevem três fases da cicatrização: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação ou remodelamento. A fase inflamatória é iniciada logo após a lesão ocorrendo uma vasodilatação e um

aumento de permeabilidade vascular promovendo a migração de neutrófilos para a ferida, estes produzem radicais livres que auxiliam na destruição das bactérias, sendo substituídos gradativamente pelos macrófagos que são fundamentais na transição para a fase seguinte. A fase proliferativa é constituída por quatro etapas: epitalização, angiogênese, formação de tecido de granulação e depósito de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia se estendendo até o término da segunda semana. A fase de maturação ou remodelamento é caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada, sendo a fase mais importante.

No processo de cicatrização, quando em contato com o ar, a ferida fica ressecada, formando uma crosta que auxilia na contenção da hemorragia e na proteção do ferimento contra agentes externos, porém a crosta também é um fator prejudicial, pois impede a visualização da evolução do processo cicatricial impedindo o diagnóstico precoce de infecções (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

A contaminação das feridas por micro-organismos deve ser evitada e combatida, sendo as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* micro-organismos patógenos que são importantes na contaminação das mesmas (CAMPOS et al., 2006).

### 2.3 CURATIVOS/ TRATAMENTOS

A alta incidência de feridas na pele tem originado a necessidade do desenvolvimento de curativos que protegem a ferida e são capazes de desenvolver a proliferação de células e a regeneração da pele. É também importante não haver dano ao tecido regenerado com a retirada do curativo. O número, o custo e o impacto sobre os indivíduos e países tem motivado o desenvolvimento de uma série de curativos. Estes curativos geralmente consistem em um suporte poroso (tipicamente um poliuretano ou silicone) e um hidrogel (IGNACIO et al., 2011).

Os curativos são uma forma de tratamento das feridas cutâneas e suas escolhas dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos. Atualmente são inúmeros os tipos de curativos existentes no mercado. A antiga controvérsia entre curativo seco e curativo úmido deu lugar a uma proposta atual de oclusão e manutenção do meio úmido. A cicatrização através do meio úmido tem algumas vantagens em relação ao meio seco: prevenir a desidratação do tecido que leva a morte celular, acelerar a angiogênese, estimular a epitalização e a formação do tecido de

granulação, facilitar a remoção do tecido necrótico e fibrina, servir como barreira protetora contra micro-organismos, promover a diminuição da dor, evitar a perda excessiva de líquidos e evitar traumas na troca do curativo (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Quando as lesões da pele são mantidas limpas e úmidas, a cura ocorre entre 7 a 10 dias. Da mesma forma, queimaduras superficiais são curadas em tempos semelhantes se não forem infectadas e revestidas adequadamente. Ferimentos e queimaduras que se estendem até a derme profunda ou em toda a derme vão ser curados apenas depois de um longo período, podendo se tornar feridas crônicas (RATNER et al., 2013).

### **2.3.1 Enxertos/ queimaduras**

Feridas de espessura total com mais de 1 cm de diâmetro necessitam de enxerto de pele para evitar cicatrizes extensas. O transplante de pele é atualmente um dos melhores tratamentos para feridas de espessura total, incluindo queimaduras. Antes do enxerto é preciso primeiro fazer a excisão para o tratamento de queimaduras, as proteínas desnaturadas pelo calor devem ser removidas da pele para evitar complicações como infecções e contaminações por micro-organismos (GROEBER et al., 2011).

Pacientes que sofreram trauma ou queimaduras numa grande área da pele, necessitam urgente do tratamento da ferida sendo os enxertos de pele os procedimentos mais comuns para reparos da mesma (LIU et al., 2014).

Para tratar a perda de pele, enxertos de pele são úteis, podendo ser fornecidos com espessura total ou como uma película espessa. Enxertos de espessura total são aplicados muitas vezes para pequenas feridas, consistem em toda derme e epiderme, sendo a ferida fechada com suturas. Enxertos com uma película espessa são aplicados a feridas maiores e pode ser expandidos através de um processo de engrenagem que lhes permitem cobrir uma área maior. Microscopicamente, os vasos sanguíneos da ferida revascularizam o enxerto. As principais características para um bom substituto de pele são: ser barato, de longa duração, uma barreira bacteriana, semipermeável para água, elástico, de fácil aplicação, indolor para o paciente, antialérgico e atóxico e ter longa validade. A perda de líquido e infecção

bacteriana são as duas maiores preocupações no tratamento de um paciente com perda de pele (RATNER et al., 2013).

Ainda de acordo com Ratner et al. (2013), dependendo da espessura da queimadura, esta pode ser classificada em três graus. As queimaduras de primeiro grau são feridas que afetam apenas a epiderme. As queimaduras de segundo grau são mais profundas do que as de primeiro grau afetando as camadas da derme. Já as queimaduras de terceiro grau se estendem além da derme.

## 2.4 BIOMATERIAIS

Um biomaterial é um material viável usado em dispositivos médicos para se interagir com sistemas biológicos, havendo interações físicas e químicas entre esses materiais. Sua principal característica é a biocompatibilidade que é a capacidade do material em executar uma resposta apropriada ao hospedeiro em uma determinada aplicação. Existem muitas classes de materiais usados em biomateriais como metais, cerâmicas, polímeros, vidros, carbono e materiais compósitos. Estes materiais são usados como nanopartículas, revestimentos, fibras, filmes, membranas, espumas, tecidos e peças moldadas ou usinadas (RATNER et al, 2013).

Macromoléculas biológicas, como polissacarídeos, proteínas e peptídeos têm sido empregadas como biomateriais indispensáveis por décadas (ZHANG; CAO, 2014).

## 2.5 QUITOSANA

A quitosana é um amino polissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina. Sua estrutura química conforme Figura 2, é formada pelos copolímeros  $\beta(1-4)$ -2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta(1-4)$ -2-acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. A quitosana vem sendo estudada como biomaterial de potencial aplicação principalmente nas áreas médica e farmacêutica. É crescente, também, a importância da quitosana como adsorvente, em processos de recuperação e/ou de purificação de bioprodutos de alto valor agregado, como as proteínas. Uma vantagem dessa utilização está na disponibilidade da quitosana na

natureza através da quitina, podendo ser facilmente encontrada, como subproduto da indústria pesqueira (TORRES et al., 2005).

A quitosana, depois da celulose, é a segunda maior biomassa mais abundante, sendo muito utilizada como transportadora de fármacos por causa da sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade e atividade biológica. Porém sua aplicação é limitada pela sua baixa solubilidade devido a sua alta cristalinidade (LIU et al., 2009).

Estruturas poliméricas formadas por organismos vivos são suscetíveis de fácil cisão de sua cadeia principal. Os polissacarídeos que são de origem natural, mesmo quimicamente modificados, são biodegradáveis, e desta maneira não têm permanência prolongada indesejável em artefatos descartados (MANO; MENDES, 1999).

Devido à sua natureza poli catiônica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas se dissolve facilmente podendo ser moldada nas mais diversas formas como membranas, esferas, gel, microesferas, entre outras (TORRES et al., 2005). Em geral, estes materiais tem ganhado atenção por induzir pouca reação do tipo corpo estranho.

Experimentos em animais têm demonstrado que a eficácia da aceleração da cicatrização de feridas pode ser obtida pelo aumento da síntese de colágeno na fase inicial da cicatrização com o uso de quitosana (LI et al., 2012). Devido as suas propriedades biológicas interessantes a quitosana tem sido cada vez mais utilizada em sistemas de entrega de fármacos, implantes e curativos. Soluções de quitosana têm sido usada para tratamento de feridas de pele como úlceras, queimaduras e feridas cirúrgicas (CAMPOS et al., 2006).

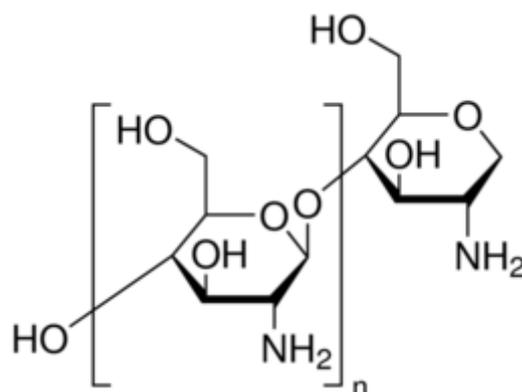


Figura 2 – Fórmula estrutural da quitosana.

Fonte: SIGMA-ALDRICH, (2015).

## 2.6 POLICAPROLACTONA (PCL)

A PCL, cuja fórmula estrutural é mostrada na Figura 3, é um polímero hidrofóbico e semicristalino, tendo sua cristalinidade diminuída com o aumento do peso molecular, tem boa solubilidade e baixo ponto de fusão (entre 58 e 64°C) (RATNER et al., 2013; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Sua temperatura de decomposição é de aproximadamente 350°C e se degrada lentamente devido a sua alta hidrofobicidade e cristalinidade (HUANG et al., 2003).

Têm algumas vantagens sobre outros polímeros como degradação cinética, propriedades mecânicas, facilidade em moldar e fabricar permitindo tamanhos adequados de poro contudentes ao tecido em crescimento e a entrega controlada de drogas dentro de sua matriz. Seu peso molecular pode variar de 3000 a 80 000 g/mol (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Devido as suas propriedades físico-químicas, suas características mecânicas, a facilidade de processo com um baixo ponto de fusão, têm se tornado atraente para aplicações biomédicas (NEVES et al., 2011)

Ainda de acordo com Woodruff e Hutmacher (2010) a PCL é apropriada para liberação controlada de fármacos devido a sua alta permeabilidade a muitas drogas e sua biocompatibilidade e devido a sua capacidade de ser excretado do corpo. Comparado a outros polímeros, sua biodegradação é lenta, sendo mais indicada para liberação em longo prazo. Tem também a capacidade de formar misturas

compatíveis com outros polímeros e tem sido muito usada para recobrimento de feridas cutâneas.

De acordo com Ratner et al. (2013) é um termoplástico, borrachoso a temperatura ambiente. Possui uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de  $-65^\circ\text{C}$ . É um poliéster muito utilizado em substituição de osso e como suporte para engenharia de tecido.

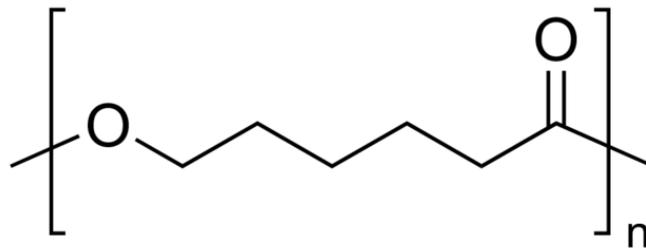


Figura 3 - Fórmula estrutural da Policaprolactona.

Fonte: SIGMA-ALDRICH, (2015).

## 2.7 QUITOSANA/PCL

A combinação de dois polímeros é uma maneira eficiente de desenvolver um novo material com combinações de propriedades não processadas por um único polímero. A PCL possui boa biocompatibilidade, é não tóxica para o organismo, possui reabsorção gradual após um implante e boas propriedades mecânicas. Já a quitosana é atóxica, biodegradável, biocompatível, bio-absorvível e bifuncional. Porém, a PCL é um polímero caro, o que faz suas aplicações serem mais restritas, sendo então necessária sua mistura com outros polímeros. Alguns estudos têm sido feitos para melhorar sua biodegradabilidade através de processos de copolimerização (SAHOO et al., 2010).

A PCL é um poliéster importante que possui um éster e cinco grupos metilenos em sua unidade de repetição. Aprovada pela FDA, é biodegradável, atóxica e possui boas propriedades mecânicas, por isso tem sido amplamente investigado como membranas na área biomédica. Possui também algumas desvantagens como alta cristalinidade, alta hidrofobicidade e ausência de funcionalidade bioativa (GU et al., 2014).

Quando combinados, a natureza hidrofílica da quitosana irá melhorar a molhabilidade e permeabilidade da PCL acelerando sua degradação hidrolítica. Já a PCL irá reduzir a absorção de água da quitosana, melhorando suas propriedades mecânicas (NEVES et al., 2011).

Ainda, de acordo com Gu et al. (2014), juntando a quitosana e o PCL, estes são capazes de se auto montar em micelas poliméricas através de copolimerização por grafitização e podem ser utilizadas na liberação de fármacos.

Já de acordo com Liu et al. (2009), existe um problema de estabilidade entre os agregados QUI-g- PCL em soluções biológicas, devido à alta hidrofobicidade da PCL e a natureza insolúvel da quitosana. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero altamente solúvel em água e pode ser usado na copolimerização em blocos com polímeros hidrofóbicos, a fim de se formar copolímeros em blocos anfifílicos.

## 2.8 mPEG-PCL

Copolímero é um polímero que apresenta mais de um mero sendo estes diferentes na cadeia polimérica. São chamados de comonômeros cada um dos monômeros utilizados na copolimerização (CANEVAROLO, 2004).

Recentemente copolímeros em bloco anfifílicos com blocos hidrofílicos e hidrofóbicos têm sido estudados em biotecnologia e campos farmacêuticos para verificar sua capacidade de formar micelas poliméricas (XIE et al., 2007; LIU et al., 2009).

Os copolímeros em bloco mPEG-PCL são polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para uso potencial em sistemas de liberação de fármacos (NIAMSA et al., 2008).

O mPEG-PCL é um copolímero composto por cadeias de mPEG (hidrofílico), o que permite sua dispersão no sangue e por cadeias de PCL (hidrofóbica), sendo o mPEG usado com sucesso como micro iniciador de polimerização de anel do  $\epsilon$ -caprolactona (MARQUES et al., 2015).

Os blocos hidrofóbicos formam o núcleo interno da estrutura atuando como um local de incorporação de fármacos e os blocos hidrofílicos formam um invólucro exterior hidratado, que serve como interface de estabilização entre o núcleo e o meio externo. Em muitos casos, o bloco hidrofílico do copolímero forma micelas que são referentes ao PEG e que fazem aumentar as propriedades hidrofílicas e

biocompatibilidade do polímero. Poliésteres alifáticos biodegradáveis são amplamente estudados como blocos hidrofóbicos, os quais o poli ( $\epsilon$ -caprolactona), o PCL, é um dos blocos hidrofóbicos mais atraentes e promissores devido à sua boa biocompatibilidade, a permeabilidade de fármacos e não toxicidade (XIE et al., 2007).

## 2.9 GENTAMICINA

A gentamicina cuja fórmula estrutural está na Figura 4 é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, por ser de baixo custo é amplamente utilizado no tratamento de infecções ósseas, queimaduras, septicemia bacteriana, infecções de pele e do trato intestinal (FERREIRA, 2009). O sulfato de gentamicina é um pó com coloração que varia de branco a amarelado, que é isolado de *Micromonospora echinospora* e *Micromonospora purpúrea*. Seu uso sistêmico principal é no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gran-positivas e Gran-negativas (FERREIRA, 2009).

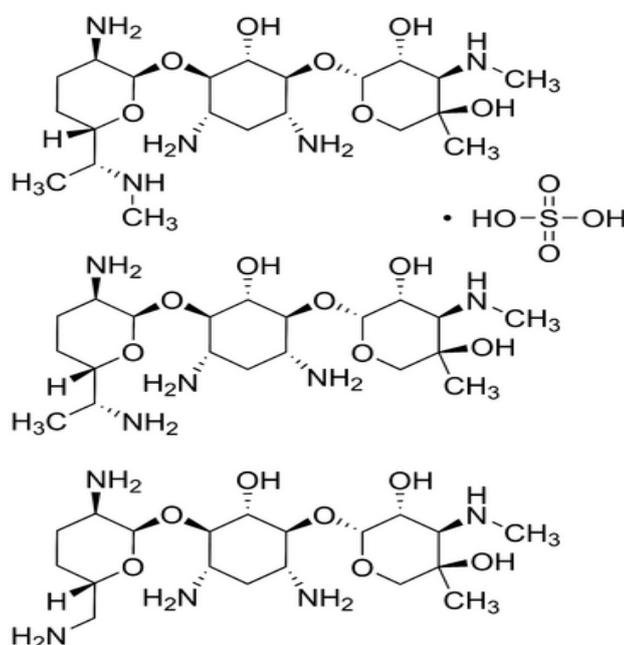


Figura 4 - Fórmula estrutural do Sulfato de Gentamicina.

Fonte: SIGMA-ALDRICH, (2015).

Sua ação depende da concentração e há baixa resistência bacteriana quando usada em doses elevadas (DELFOSSÉ et al., 2011).

De acordo com Skundric. (2002 apud CAMPOS et al., 2009) a concentração mínima de inibição da gentamicina para a *E. Coli* está entre 0,06 e 8,0 µg/mL e para a *S. aureus* está entre 0,12 a 1,0 µg/mL.

Além disso, o uso de uma alta concentração de gentamicina é questionado em estudos, pela vantagem ser limitada apenas à primeira hora de aplicação (SORENSEN, 2009).

Possui amplo espectro de ação antibacteriano, baixa taxa de alergia, boa estabilidade e solubilidade em água. Seu uso tópico é indicado para tratar infecções da pele possuindo três etapas básicas: (I) lavagem da área afetada com água e sabão, (II) aplicação do creme ou pomada na área afetada e (III) recobrimento da ferida com uma gaze, procedimento que deve ser repetido pelo menos três vezes por dia durante uma semana (CAMPOS et al., 2009).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste tópico serão apresentados os materiais e métodos utilizados para elaboração da pesquisa.

#### **3.1 MATERIAIS**

A seguir serão descritos os materiais utilizados na pesquisa.

##### **3.1.1 Quitosana**

Utilizou-se a quitosana em pó de alto peso molecular produzida pela Sigma/Aldrich (419419-250G – USA) com grau de desacetilação maior que 75%.

##### **3.1.2 Copolímero mPEG-PCL**

O copolímero mPEG-PCL foi obtido a partir da polimerização dos monômeros  $\epsilon$ -caprolactona de peso molecular 114,14 g/mol e mPEG de peso molecular 550g/mol da Sigma Aldrich. Este copolímero foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Rodrigo Marques do Instituto de Química da Unesp em Araraquara.

##### **3.1.3 Gentamicina**

Sulfato de gentamicina injetável (Neo gentamicin) da Neo Química de 280 mg/2mL foi utilizado na preparação das membranas carregada com gentamicina.

##### **3.1.4 Ninidrina**

A ninidrina da Sigma/Aldrich (N4876 – 100G/lote: BCBL0499V) foi utilizada no método colorimétrico para determinação da concentração de gentamicina.

### 3.1.5 Ácido acético glacial, PA

O ácido acético glacial da Proquímios de peso molecular 60,05 g/mol, pureza mínima de 99,8% e densidade de 1,05 g/cm<sup>3</sup> (Lote: 09/0329) foi usado na dissolução da quitosana.

## 3.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados na pesquisa serão descritos a seguir.

### 3.2.1 Preparação das membranas

Prepararam-se oito formulações de membranas, mantendo-se a quantidade de quitosana e gentamicina e variando-se a quantidade de mPEG-PCL). As membranas foram obtidas pelo método “*casting*”, seguido da evaporação do solvente em temperatura ambiente.

As diferentes formulações obtidas estão descritas a seguir e resumidas na Tabela 1.

- a) QUIT: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de água Milli-Q e 5,0 mL de acetona;
- b) QUIT - GE: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1M, 1,0 mL de solução de gentamicina a 5,6 mg/mL e 5,0 mL de acetona;
- c) 1/8 mPEG-PCL/ QUIT: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de água Milli-Q e 0,0125 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona;
- d) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de água Milli-Q e 0,025 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona;
- e) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de Milli-Q e 0,05 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona;

- f) 1/8 mPEG-PCL/ QUIT - GE: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de solução de gentamicina a 5,6 mg/mL e 0,0125 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona;
- g) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT - GE: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de solução de gentamicina a 5,6 mg/mL e 0,025 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona;
- h) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE: membrana contendo 0,1 g de quitosana dissolvida em 9,0 mL de ácido acético 1 M, 1,0 mL de solução de gentamicina a 5,6 mg/mL e 0,05 g de mPEG-PCL dissolvido em 5,0 mL de acetona.

Tabela 1 - Composição das membranas.

Membrana	Quitosana (g)	mPEG- PCL (g)	Solução de gentamicina 5600 µg/mL (mL)	Acetona (mL)	HAc 1M (mL)
QUIT	0,1	-	-	5,0	9,0
QUIT - GE	0,1	-	1,0	5,0	9,0
1/8 mPEG-PCL/ QUIT	0,1	0,0125	-	5,0	9,0
1/4 mPEG-PCL/ QUIT	0,1	0,025	-	5,0	9,0
1/2 mPEG-PCL/ QUIT	0,1	0,05	-	5,0	9,0
1/8 mPEG-PCL/ QUIT - GE	0,1	0,0125	1,0	5,0	9,0
1/4 mPEG-PCL/ QUIT - GE	0,1	0,025	1,0	5,0	9,0
1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE	0,1	0,05	1,0	5,0	9,0

Fonte: Da autora.

### 3.2.2 Espessura

A espessura das membranas foi medida com o objetivo de verificar a distribuição uniforme dos componentes na membrana.

A espessura foi medida usando-se um micrômetro de bancada, Outside Micrometer da marca Vonder, do laboratório da Unifal de Poços de Caldas, MG. A espessura das membranas foi obtida pela média aritmética dos valores de dez medidas aleatórias em diferentes pontos da membrana conforme Figura 5.

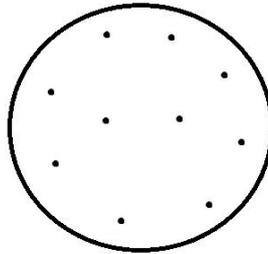


Figura 5 – Desenho exemplificando os pontos onde foram tomadas as medidas de espessura nas membranas.

Fonte: Da autora.

### 3.2.3 Cor e Opacidade

A cor e opacidade são propriedades de grande relevância para membranas utilizadas como recobrimento de feridas cutâneas, visto que é de grande importância que a ferida possa ser visualizada, para se avaliar a presença de bactérias e como está a evolução da mesma.

A cor dos filmes foi avaliada por meio de um Colorímetro Minolta CR-300 com padrão para calibração e cápsulas para acomodação das amostras do Laboratório da empresa M&G de Poços de Caldas, MG. Foram determinados os parâmetros de luminosidade  $L^*$ , variando de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , do verde (-60) ao vermelho (+60); e  $b^*$ , do azul (-60) ao amarelo (+60), conforme disposto na Figura 6. Os filmes foram colocados no equipamento e foram realizadas leituras para se obter a média de 10 valores. A diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) foi calculada de acordo com a Equação (1).

$$\Delta E^* = \left[ (L^* - L_p^*)^2 + (a^* - a_p^*)^2 + (b^* - b_p^*)^2 \right]^{0.5} \quad (1)$$

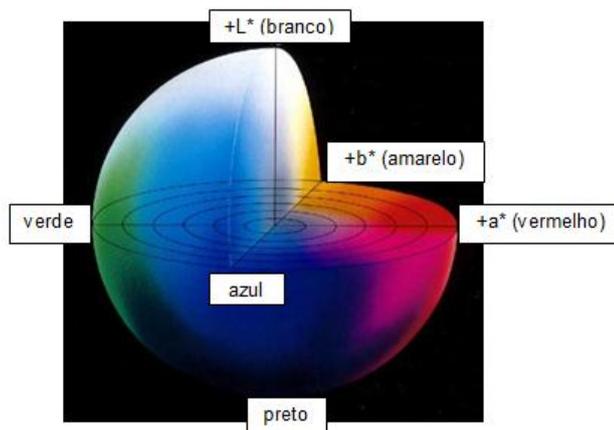


Figura 6 - Representação de cor sólida para  $L^*a^*b^*$  no espaço colorido.

Fonte: Adaptado de MINOLTA Co., (1998).

### 3.2.4 Análise morfológica

A análise morfológica foi feita para avaliar a interação entre os componentes das membranas e as características micro estruturais das mesmas.

A análise morfológica foi realizada por meio do microscópio eletrônico de varredura, do laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ/UNICAMP (LEO 440i, Inglaterra). Para tal análise, as amostras foram recobertas, para evitar acúmulo de cargas negativas nas amostras não condutoras e conseqüentemente ocasionar uma distorção da imagem, com um filme de ouro de espessura de 16 nm no Sputter Coater de marca Bal-Tec modelo SCD 050 por 60 segundos a uma pressão de operação de  $2 \times 10^{-2}$  Pa e temperatura de 24°C.

### 3.2.5 Análise de Infravermelho (FTIR)

Esta análise foi feita para as matérias-primas: quitosana em pó, pó mPEG-PCL e solução de gentamicina; e para as membranas obtidas. A espectroscopia de infravermelho (espectroscopia IV) é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. As análises foram realizadas para identificar a presença dos componentes das membranas: quitosana, mPEG-PCL e gentamicina.

As amostras foram caracterizadas por FTIR (ATR) com um espectrômetro *Agilent Technologies Cary 630 FT-IR* e o software *Microlab*.

Foi utilizada a faixa de leitura de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . O equipamento está localizado no *campus* da Unifal de Poços de Caldas.

### 3.2.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O comportamento térmico das membranas foi avaliado através dessa técnica, sendo importante para avaliar a estabilidade da membrana frente às variações de temperatura.

A análise térmica foi feita utilizando-se a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) que mede o fluxo de calor entre a amostra e um material termicamente inerte quando submetidas a uma variação de temperatura, sendo assim possível identificar e analisar as modificações ocorridas no estado físico da amostra. As análises foram realizadas no equipamento TA-Q100 do laboratório da empresa M&G de Poços de Caldas, MG, nas seguintes condições: intervalo de temperaturas de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , taxa de aquecimento de  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera de nitrogênio. As análises de DSC foram realizadas para a quitosana pó (QUI), para o mPEG-PCL e para as membranas sem gentamicina, visto que a concentração de gentamicina é mínima e não altera as transições térmicas dos polímeros, conforme observado em ensaios realizados anteriormente com membranas de quitosana e PCL (Apêndice A, Figuras 27 e 28).

### 3.2.7 Análise Termogravimétrica (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A perda de massa das amostras foi determinada pelo método termogravimétrico, sendo importante para avaliar a estabilidade da membrana frente às variações de temperatura.

É uma técnica que acompanha a perda e/ou ganho de massa de uma amostra em função do tempo ou temperatura. Já a termogravimetria derivada é um arranjo matemático onde a derivada da variação de massa em relação ao tempo é registrada em relação à temperatura ou tempo. As análises foram realizadas para a quitosana pó, para o mPEG-PCL e para as membranas sem gentamicina. O equipamento utilizado foi um *Simultaneous TG-DTA/DSC Apparatus – STA 449 F3 Jupiter* da Netzsch. As análises foram feitas sob atmosfera de nitrogênio, na faixa de temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ , taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ., sob atmosfera de

nitrogênio. O equipamento está localizado no *campus* da Unifal de Poços de Caldas, MG.

### 3.2.8 Umidade

A porcentagem de umidade das membranas foi determinada pelo método gravimétrico, e foi feito em triplicata. Realizou-se a pesagem da massa inicial das membranas ( $M_i$ ), que foram acondicionadas por 24 horas em uma estufa com circulação forçada de ar a 105°C, quando foi medida a massa final ( $M_f$ ) para determinação da porcentagem de umidade (CAMPOS et al., 2005). A porcentagem de umidade foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$\% U = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100, \quad (2)$$

Sendo:

%U = porcentagem de umidade;

$M_i$  = massa inicial da amostra (g);

$M_f$  = massa final da amostra (g).

### 3.2.9 Comportamento hídrico (*Swelling Behavior*)

As membranas preparadas foram secas em dessecador por 24 horas e pesadas ( $W_d$ ). Após tal procedimento foram imersas em solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,4 a 37 °C (temperatura corpórea) durante 24 horas, quando foram pesadas novamente ( $W_s$ ). A porcentagem de intumescimento (% S) da amostra foi obtida através da Equação (3) e calculada pela média de três repetições (BASKAR; KUMAR, 2009; QU et al., 2000).

$$\%S = \frac{[(W_s - W_d) * 100\%]}{W_s}, \quad (3)$$

Onde:

$W_s$  = massa da amostra inchada (g);

$W_d$  = massa da amostra seca (g).

### 3.2.10 Estudo antibacteriano

O estudo foi feito com todas as membranas preparadas. Foram avaliadas duas espécies, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que são importantes na microbiologia de feridas de pele.

Os testes foram realizados em triplicatas. Foi usado o meio de cultura LB sólido, colocando-se cerca de 30 mL em cada placa de Petri, as quais foram incubadas a 30°C por 24 horas para certificação da ausência de contaminação. Após esse período, com o auxílio de uma alça de *drigalski*, se espalhou, uniformemente sobre a superfície, 10 µL da cultura da bactéria. Colocando-se nas placas, por cima do meio de cultura inoculado com as bactérias, as membranas, em forma de círculo, com diâmetro de aproximadamente 2,5 cm, previamente esterilizadas por exposição UV por meia hora de cada lado. Para análise dos resultados, foi observado se houve formação de zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor das membranas testadas.

### 3.2.11 Estudo da liberação de gentamicina *in vitro*

A seguir serão descritos a obtenção da curva padrão e o ensaio de liberação *in vitro*.

#### 3.2.11.1 OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

Na obtenção da curva padrão que relaciona a concentração de gentamicina com a absorvância foram analisadas amostras diferentes de concentrações conhecidas a partir da diluição da solução injetável de gentamicina de 280 mg/2mL. Cinco amostras foram preparadas pelo método de diluição seriada nas seguintes concentrações: 280,0; 143,0; 70,0; 57,3 (µg/mL). O ponto para concentração de gentamicina igual a zero, ou seja, o branco foi obtido utilizando-se solução tampão fosfato de sódio 0,2 M.

Utilizou-se o método colorimétrico para a determinação da concentração de gentamicina, proposto por Frutos et al. (2000). A um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução de gentamicina de concentração conhecida, foram adicionados 4 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,4) e, em seguida, 1,5 mL de solução

de ninidrina (0,0125 g/mL). Posteriormente, baseado no método proposto por Frutos et al. (2000), o aparato contendo os tubos foi colocado em banho maria a 95°C por 15 minutos. Após, os tubos foram submetidos a um banho de gelo por 5 minutos de modo a resfriar a solução.

As diferentes amostras foram colocadas nas cubetas de quartzo do espectrofotômetro para medição da absorbância a 400 nm. As análises foram feitas no UV-vis Cary 60 da marca Agilent Technologies do laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do *campus* de Poços de Caldas da Unifal-MG. As medidas das absorbâncias foram registradas e relacionadas com a concentração de gentamicina de forma a se obter uma curva padrão.

### 3.2.11.2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Nesta etapa foram usadas três membranas de cada formulação, de diâmetro 2.5 cm, para realização do ensaio em triplicata. Cada membrana foi colocada em um recipiente contendo solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,4) e mantida em banho a 37°C de modo a simular a temperatura corpórea. Para determinação da concentração de gentamicina liberada nas primeiras horas, foi realizada a coleta após 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 5 horas, ou seja, a cada intervalo, o tampão era substituído por tampão fresco. Foi utilizado o mesmo procedimento colorimétrico da curva padrão para leitura das absorbâncias das soluções de tampão após cada intervalo de liberação.

Outro ensaio foi realizado separadamente, com intervalo de leitura a cada 24 horas, por 7 dias, para avaliação da liberação do antibiótico em uma semana.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas foram preparadas pelo método “*casting*”, utilizando-se moldes circulares de 2,5 cm de diâmetro. Após a evaporação do solvente, as membranas foram facilmente removidas do molde e acondicionadas separadamente para serem posteriormente analisadas.

### 4.1 ESPESSURA

Na preparação das membranas foram adicionados 1,5 mL de solução em cada molde, porém devido à alta viscosidade da solução polimérica, a distribuição da mesma pode não ter sido uniforme, obtendo-se diferentes medidas de espessura em diferentes pontos das membranas. Entretanto, considerando o processo de fabricação das membranas, pode-se concluir que os mesmos não apresentaram grande diferença de espessura e que com a incorporação da solução de gentamicina não houve alteração significativa na espessura das membranas, conforme esperado, já que se usou o mesmo volume de solução em todas as membranas. A espessura das membranas está indicada nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

A uniformidade da espessura da membrana é importante para que os componentes da membrana fiquem distribuídos de forma uniforme. É também interessante para aplicação em feridas de pele, estando relacionada com a propriedade de barreira das membranas. Os filmes ficando muito finos alteram a flexibilidade das mesmas, podendo fazer com que rasguem com facilidade, o que é não interessante para recobrimento de feridas na pele, já que o importante é se ter filmes finos e resistentes. As propriedades de barreira são importantes, ou seja, estão relacionadas com a dispersão homogênea dos componentes na matriz polimérica. Se o filme estiver muito espesso dificulta a permeação, estando o mesmo muito fino, facilita demais a mesma.

A fim de melhorar propriedades de barreira de membranas de quitosana tem sido proposto em trabalhos, sua mistura com outros materiais, reduzindo também as concentrações dos componentes. Kurek et al. (2012) preparam filmes de quitosana e polietileno de 3µm a 6µm e avaliaram as propriedades de barreira dos filmes em função da espessura.

No trabalho de Khoshgozaran-Abras et al. (2012) há a fabricação de filmes de quitosana com *aloe vera* onde se encontra valores de 0,213 mm para o filme só de quitosana e 0,163 mm para os filmes de quitosana com 50% do gel *aloe vera*, verificando uma redução na espessura do filme quando se há a incorporação do componente *aloe vera*, o que já não pode ser verificado neste trabalho com a incorporação do antibiótico.

Tabela 2 - Espessura das membranas sem gentamicina em  $\mu\text{m}$ .

Amostra	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
QUIT	$2,2 \pm 0,2$
1/8 mPEG-PCL/ QUIT	$2,1 \pm 0,5$
1/4 mPEG-PCL/ QUIT	$2,5 \pm 0,4$
1/2 mPEG-PCL/ QUIT	$3,0 \pm 0,8$

Fonte: Da autora.

Tabela 3 - Espessura das membranas com gentamicina em  $\mu\text{m}$ .

Amostra	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
QUIT - GE	$2,8 \pm 0,7$
1/8 mPEG-PCL/ QUIT - GE	$3,4 \pm 1,0$
1/4 mPEG-PCL/ QUIT - GE	$2,5 \pm 0,7$
1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE	$3,1 \pm 1,1$

Fonte: Da autora.

## 4.2 COR E OPACIDADE

Nas figuras 7, 8 e 9, estão as fotos das membranas obtidas. Todas as membranas são translúcidas e foram analisadas no Colorímetro Minolta para verificar-se a alteração de cor causadas pela incorporação de mPEG-PCL e gentamicina nas membranas.

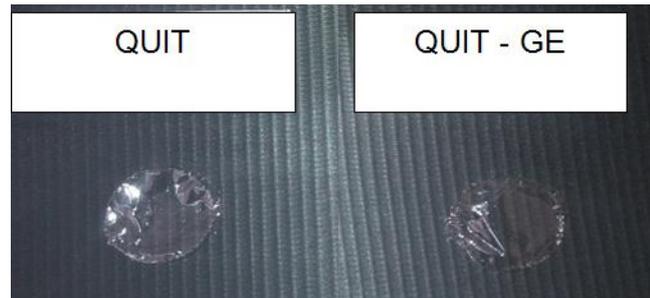


Figura 7 - Membranas de quitosana com e sem gentamicina.

Fonte: Da autora.

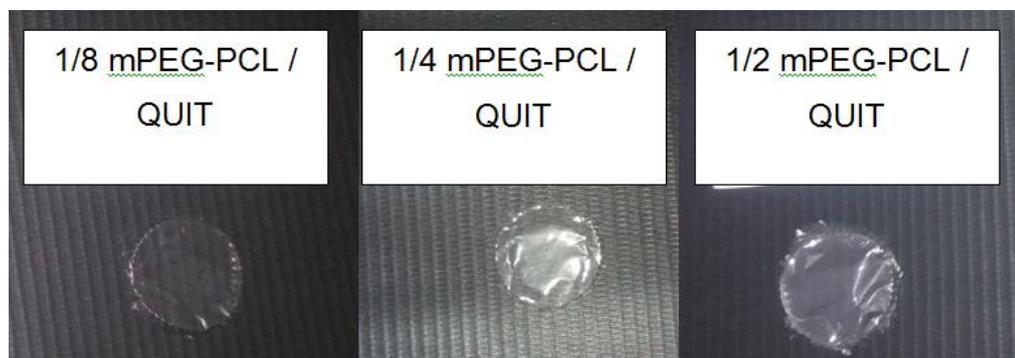


Figura 8 - Membranas sem gentamicina.

Fonte: Da autora.

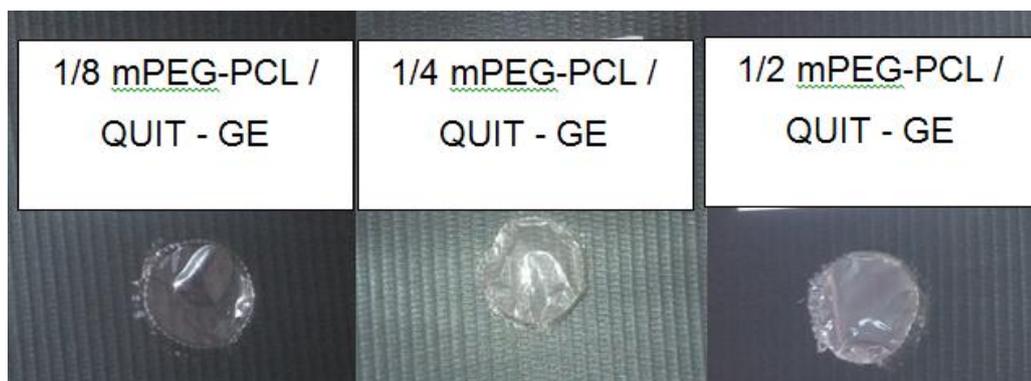


Figura 9 - Membranas com gentamicina.

Fonte: Da autora.

A cor  $L^*$  indica a luminosidade e varia de 0 (preto) até + 100 (branco). Já a cor  $a^*$  indica coordenada cromática e varia de - 60 (verde) até + 60 (vermelho). Há ainda a cor  $b^*$  que também indica coordenada cromática, porém varia de - 60 (azul)

até + 60 (amarelo). Nas figuras 10, 11 e 12 seguem gráficos referentes à cor L\*, a\* e b\*, respectivamente.

Referente à cor L\* das membranas, vê-se pelo gráfico da Figura 10 que todas as amostras possuem valores próximos a 70, ou seja, mais próximos do +100 que é a cor branca. Esses valores já eram esperados, devido ao fato de as membranas serem translúcidas. A maior diferença encontrada de cor L\* foi vista entre as membranas QUIT E QUIT – GE, que se deve à incorporação da solução de gentamicina. Conforme se adicionou à membrana o componente mPEG-PCL em diferentes concentrações, não houve diferença significativa de luminosidade das membranas.

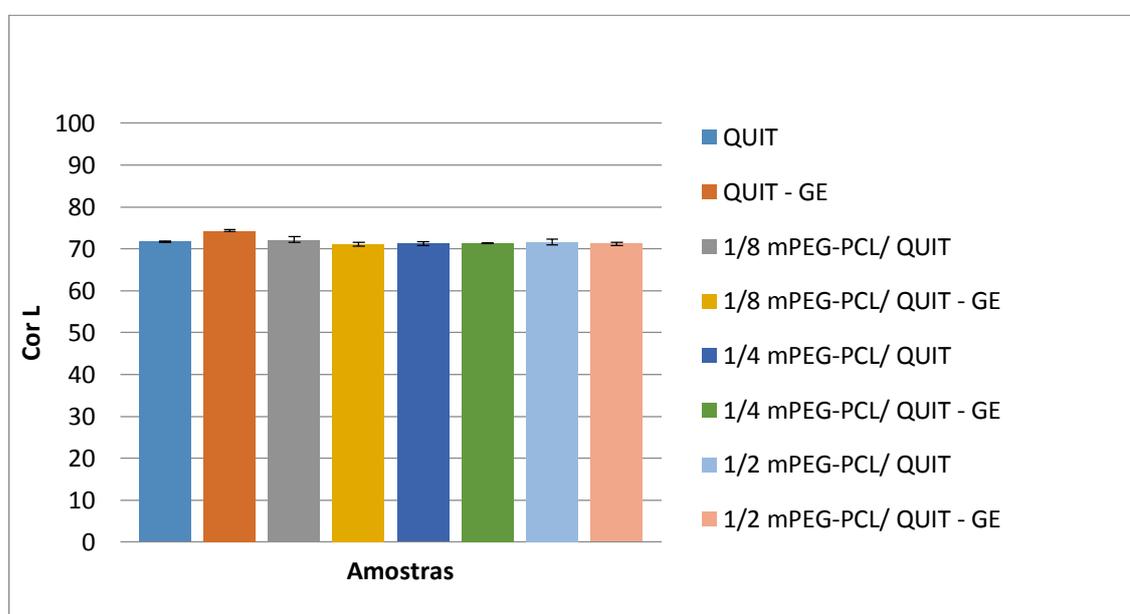


Figura 10 - Gráfico referente à cor L\* das membranas.

Fonte: Da autora.

Em relação ao parâmetro a\*, gráfico da Figura 11, vê-se que houve uma pequena diferença nas membranas de mesma formulação após a incorporação de gentamicina, porém não significativa. Entretanto, todas as membranas apresentaram valores negativos, ou seja, tendendo mais para a cor verde do que para a vermelha.

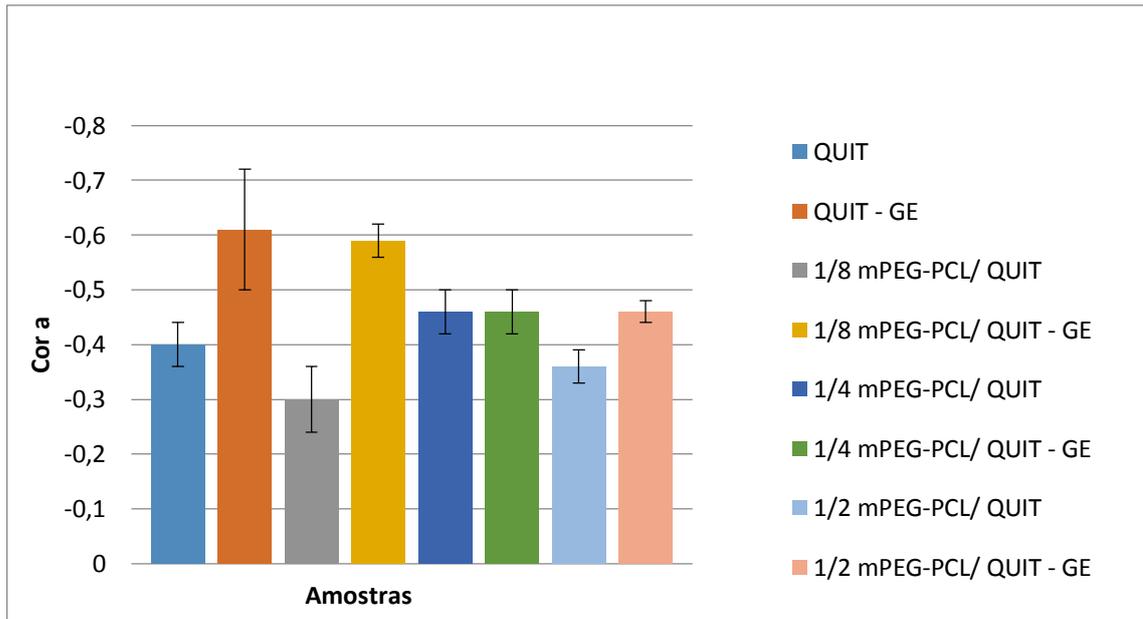


Figura 11 - Gráfico referente à cor a\* das membranas.

Fonte: Da autora.

Já em relação ao parâmetro b\*, gráfico da Figura 12, que varia de azul a amarelo, percebe-se que adicionando a solução de gentamicina e o componente mPEG-PCL há uma pequena variação dessa cor em relação à membrana QUIT, havendo apenas uma exceção, que é a membrana 1/8 mPEG-PCL/QUIT que obteve um valor ainda menor relacionado a QUIT. A membrana 1/2 mPEG-PCL/QUIT-GE é a que apresenta maior tendência para a cor amarela. As membranas QUIT, QUIT – GE e 1/8 mPEG-PCL/ QUIT foram as que apresentaram o parâmetro b\* de menor valor, tendendo menos ao amarelo.

Em relação aos parâmetros L\*, a\* e b\* verifica-se pouca variação em relação à membrana QUIT com as demais membranas, resultado esperado devido ao fato de as mesmas serem transparentes, conforme Tabela 4 a seguir.

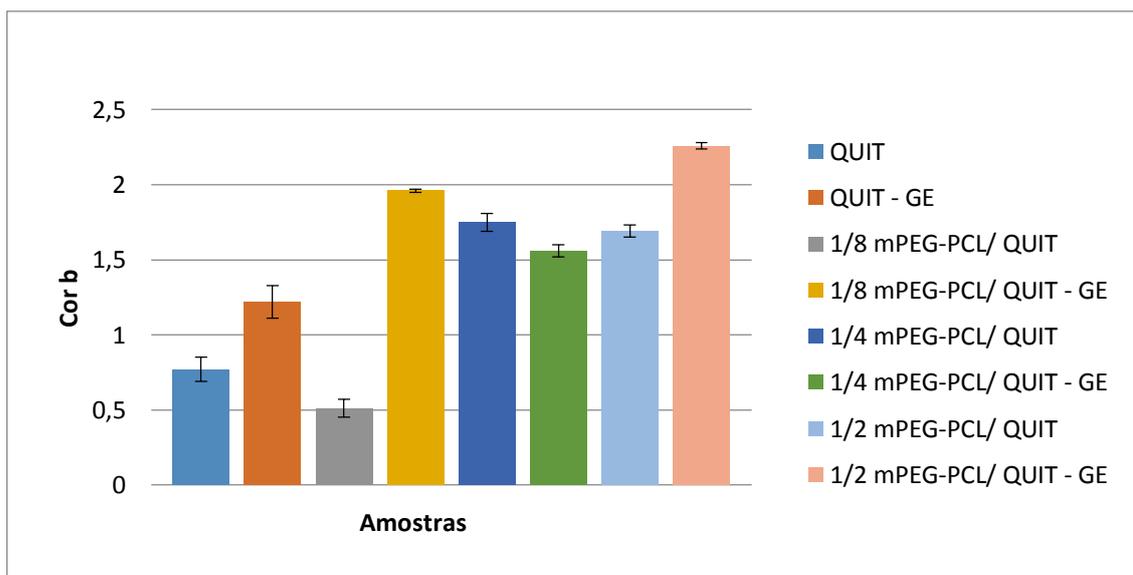


Figura 12 - Gráfico referente à cor b\* das membranas.

Fonte: Da autora.

Tabela 4 - Parâmetros de cor L\*, cor a\* e cor b\*.

Membranas	Cor L*	Cor a*	Cor b*
QUIT	71,71 ± 0,20	- 0,40 ± 0,04	0,77 ± 0,08
QUIT - GE	74,34 ± 0,21	- 0,61 ± 0,11	1,22 ± 0,11
1/8 mPEG-PCL/ QUIT	72,21 ± 0,71	- 0,30 ± 0,06	0,51 ± 0,06
1/8 mPEG-PCL/ QUIT - GE	71,17 ± 0,46	- 0,59 ± 0,03	1,96 ± 0,01
1/4 mPEG-PCL/ QUIT	71,23 ± 0,44	- 0,46 ± 0,04	1,75 ± 0,06
1/4 mPEG-PCL/QUIT - GE	71,34 ± 0,13	- 0,46 ± 0,04	1,56 ± 0,04
1/2 mPEG-PCL/ QUIT	71,60 ± 0,72	- 0,36 ± 0,03	1,69 ± 0,04
1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE	71,24 ± 0,39	- 0,46 ± 0,02	2,26 ± 0,02

Fonte: Da autora.

A diferença total de cor, quando uma amostra e um padrão são comparados em um espaço de cor uniforme, é representada pela distância entre eles ( $\Delta E$ ). Na Tabela 5, segue valores de  $\Delta E^*$  para as membranas, este que representa a diferença numérica de cor de um padrão e a amostra. Os cálculos foram feitos de acordo com a equação (1). Verifica-se de acordo com os resultados que não houve grande diferença de cor entre as membranas.

Considerando como padrão a membrana QUIT, percebeu-se que a maior diferença de cor ocorre com a amostra QUIT – GE.

Os fatores que afetam o brilho de um polímero estão relacionados com o índice de refração do material, o ângulo da luz incidente e a topografia de sua superfície. Depende também da morfologia do polímero, sendo afetado pela cristalinidade e pelo tamanho dos cristais. A presença de cargas, bem como do tamanho das partículas e seu índice de refração em relação à matriz também contribuem com a luz refletida (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

De acordo com o trabalho de Bierhalz et al., (2010) que fez biofilmes à base de pectina e alginato incorporados com natamicina, que possui uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, houve um aumento significativo de luminosidade das amostras, comprovando a transparência das mesmas.

As membranas obtiveram valor de  $\Delta E$  próximos aos valores de cor  $L^*$ , isso se deve ao fato de as mesmas serem translúcidas, visto que a cor  $L^*$  varia de 0 (preto) a +100 (branco).

Tabela 5 – Diferença total de cor.

Amostras	$\Delta E^*$
QUIT	71,72
QUIT - GE	74,35
1/8 mPEG - PCL/ QUIT	72,21
1/4 mPEG - PCL/ QUIT	71,25
1/2 mPEG - PCL/ QUIT	71,62
1/8 mPEG - PCL/ QUIT - GE	71,20
1/4 mPEG - PCL/ QUIT - GE	71,36
1/2 mPEG - PCL/ QUIT - GE	71,28

Fonte: Da autora.

### 4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A figura 13 apresenta as imagens obtidas por MEV para as amostras QUIT, QUIT – GE, 1/2 mPEG-PCL/ QUIT e 1/2 mPEG-PCL/ QUIT – GE. Foi possível observar a incorporação do mPEG-PCL na matriz de quitosana (figura 13b) de forma

uniforme. Nas figuras 13c e 13d observou-se cristais de sulfato de gentamicina na superfície das membranas, sugerindo a incorporação do antibiótico nas mesmas, o que foi comprovado nas análises de FTIR.

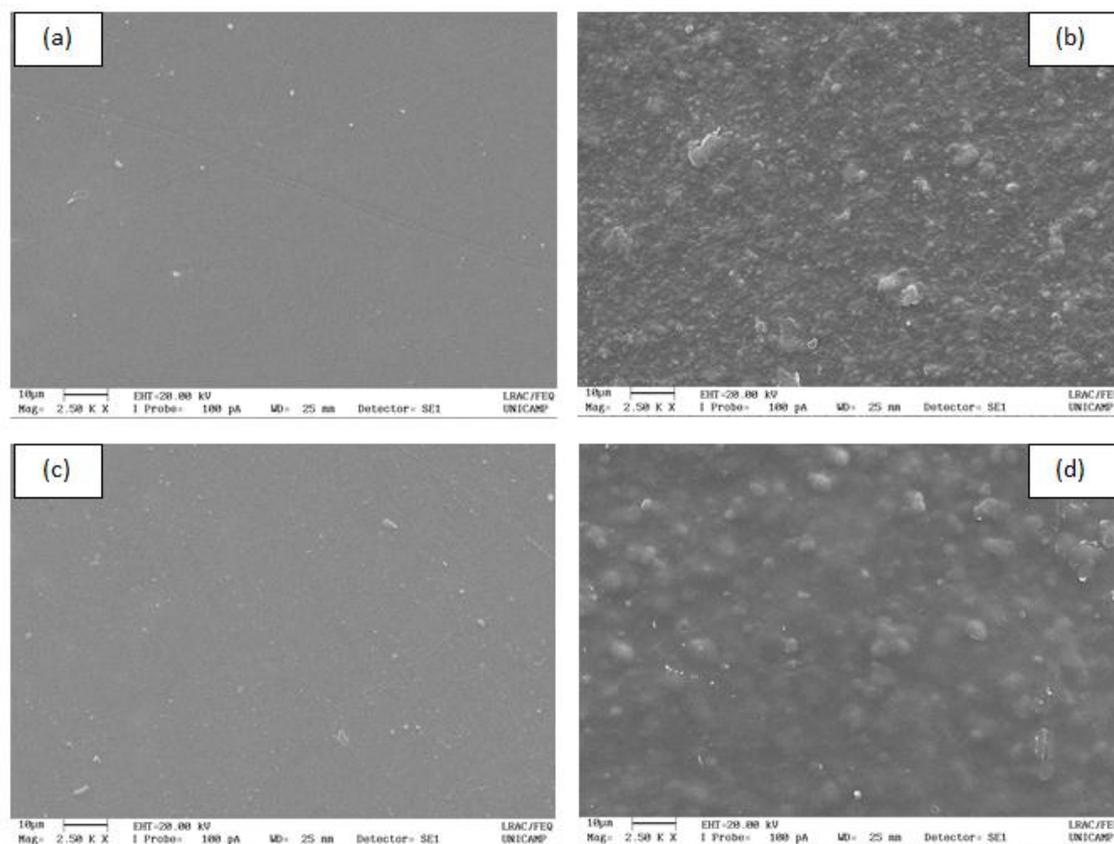


Figura 13 - Imagens de Microscopia eletrônica de varredura para as amostras:

- (a) QUIT;
- (b) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT;
- (c) QUIT – GE;
- (d) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE.

Fonte: Da autora.

#### 4.4 ANÁLISE DE INFRAVERMELHO

A análise de FTIR da figura 14, mostra as bandas correspondentes para os componentes mPEG-PCL pó, quitosana pó e solução de gentamicina.

De acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2007) a banda correspondente à amina da quitosana (N-H) está entre  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Ainda de acordo com Yao *et al.* (2013), o pico característico da quitosana é encontrado em  $1655\text{ cm}^{-1}$ , conforme encontrado na análise. Cetonas, que são grupos funcionais característicos da PCL (C=O) mostram uma banda intensa entre  $1870\text{ cm}^{-1}$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$ , mais especificamente absorvem em  $1715\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2013).

Verifica-se também que a banda correspondente à amina da gentamicina está entre  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , coincidindo com o pico da quitosana, porém sendo de uma intensidade um pouco maior. Para a solução de gentamicina há uma banda intensa correspondente ao grupo OH entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

Há uma banda de baixa intensidade em  $3442\text{ cm}^{-1}$  atribuída à água e o grupo hidroxila da PEG. As bandas entre  $2946\text{ cm}^{-1}$  e  $2888\text{ cm}^{-1}$  são referentes aos grupos orgânicos (CH e  $\text{CH}_2$ ) do PEG e PCL. Do grupo éster (-OC = O) foi observada uma banda em  $1725\text{ cm}^{-1}$  (MARQUES *et al.*, 2014).

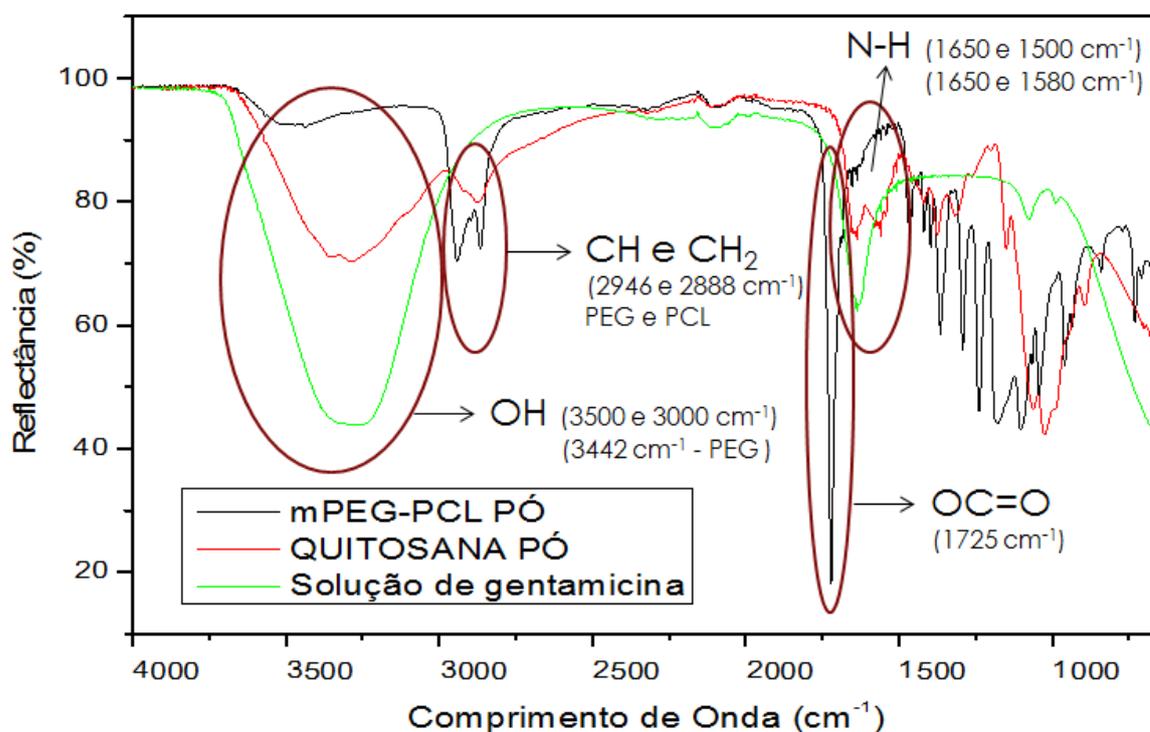


Figura 14 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para os componentes mPEG-PCL em pó, quitosana em pó e solução de gentamicina 5,6 mg/mL.

Fonte: Da autora.

Na figura 15 são mostradas as análises de FTIR para as amostras sem gentamicina. Verifica-se de acordo com a literatura que foi possível identificar a presença de quitosana e mPEG-PCL nas amostras. A banda correspondente a quitosana (N-H) é de baixa intensidade, já a banda correspondente ao PCL (C=O) aparece de forma intensa.

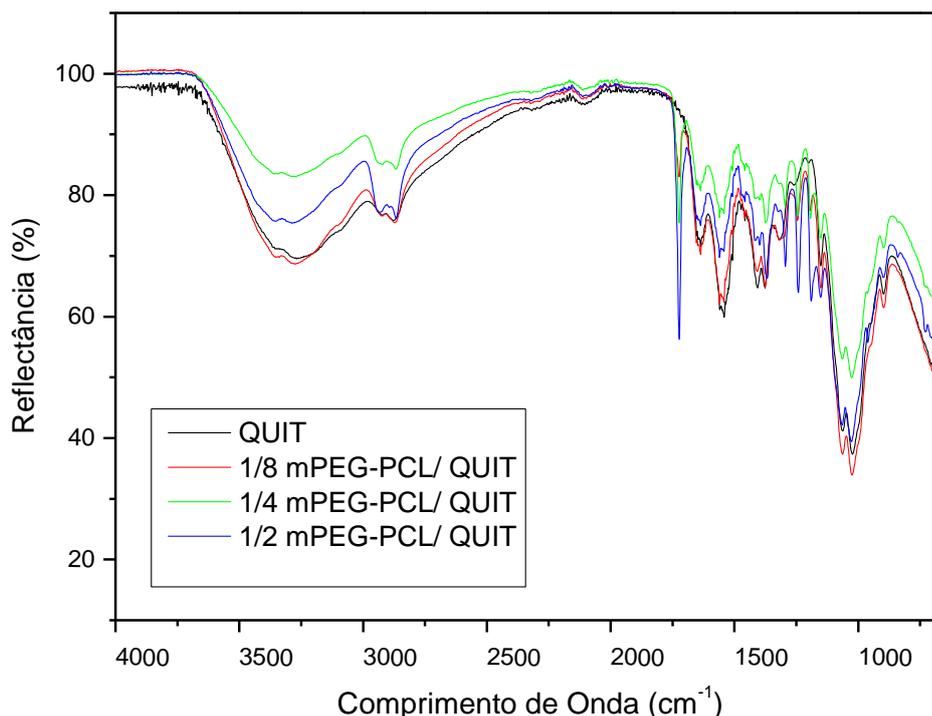


Figura 15 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para as membranas sem gentamicina.

Fonte: Da autora.

Já na figura 16, são mostradas as análises de FTIR para as amostras com gentamicina. Verifica-se de acordo com a literatura que na análise aparecem todos os picos característicos de cada componente utilizado na preparação das amostras.

Percebe-se um aumento nas bandas do grupo hidroxila (OH) comparando-se com as amostras das membranas sem gentamicina e também um aumento na banda característica da gentamicina (grupo amina).

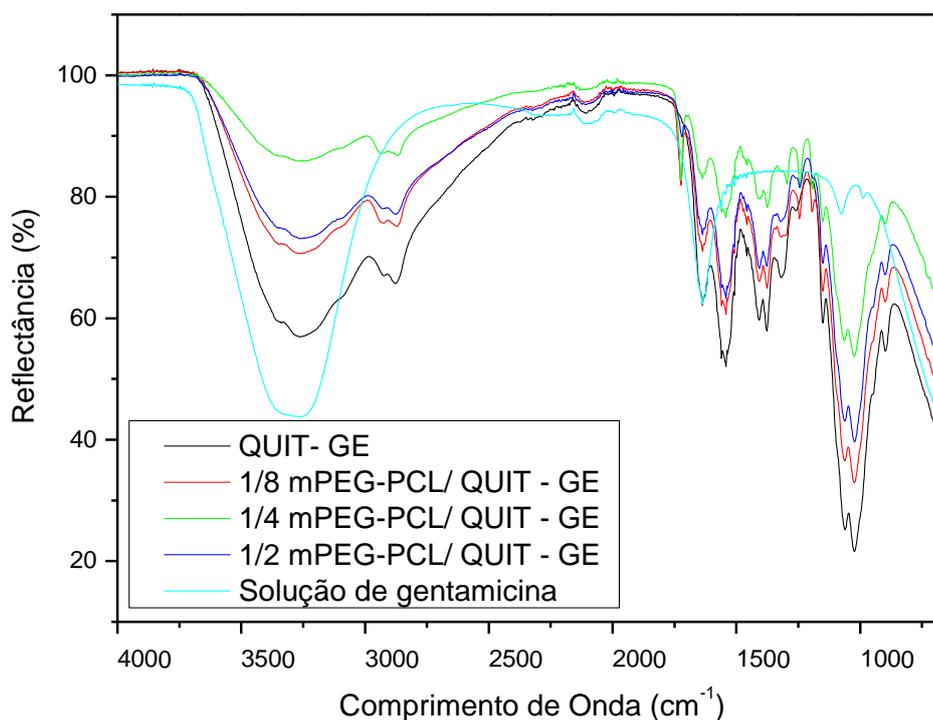


Figura 16 - Curvas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para as membranas com gentamicina.

Fonte: Da autora.

#### 4.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG)

As análises de termogravimetria estão apresentadas na Figura 17. Percebe-se uma grande perda de massa, de 93%, do componente mPEG-PCL pó, entre as temperaturas de 300°C a 400°C, ou seja restam apenas 7% de massa residual. O componente quitosana pó possui uma perda de massa de 70%, entre o intervalo de 250°C a 400°C, restando então uma massa residual de 30%. A membrana de quitosana (QUIT) teve uma perda de massa de 58%. A membrana com 1/8 mPEG-PCL/ QUIT teve uma perda de massa de 59%. A membrana 1/4 mPEG-PCL/ QUIT teve uma perda de massa de 76%, esta foi a que teve a maior perda de massa, comparada as outras duas membranas com mPEG-PCL. A membrana 1/2 mPEG-PCL/ QUIT teve uma perda de 68%. Essas perdas mais significativas para as membranas ocorreram no intervalo de temperatura entre 250°C a 450°C. O alto valor de massa residual da quitosana e das membranas de quitosana com mPEG-

PCL comparados ao mPEG-PCL pó se deve ao fato de a quitosana ser um material natural de origem animal e o mPEG-PCL ser um material sintético. Segue na Tabela 6 as porcentagens de perda de massa.

Tabela 6 - Porcentagem de perda de massa.

	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
mPEG-PCL pó	300 a 400	93
Quitosana pó	250 a 400	70
QUIT	250 a 450	58
1/8 mPEG - PCL/ QUIT	250 a 450	59
1/4 mPEG - PCL/ QUIT	250 a 450	76
1/2 mPEG - PCL/ QUIT	250 a 450	68

Fonte: Da autora.

Comparando-se os componentes mPEG-PCL pó e quitosana pó nota-se uma maior perda de massa do mPEG-PCL devido ao seu caráter hidrofóbico, porém numa temperatura acima da temperatura em que a quitosana pó começa a se degradar (250°C), ou seja, a mesma tem menor perda de massa, mas possui menor temperatura de degradação. Em seu trabalho, Cooper et al. (2011), encontra um pico de degradação da quitosana por volta de 220°C e da PCL em 390°C.

Ainda de acordo com o trabalho de Cooper et al. (2011) verifica-se que há uma pequena perda de massa da membrana de quitosana por volta de 100°C e isso está relacionado à quantidade de água ligada na quitosana que não foi totalmente removida.

A PCL de acordo com Huang et al. (2003) possui alta temperatura de decomposição (350°C) e se degrada lentamente devido a sua alta hidrofobicidade e cristalinidade. De acordo com Gautam et al. (2013), a PCL apresenta apenas uma única fase de degradação entre 376°C e 460°C e sua perda de massa foi cerca de 88% em seu trabalho.

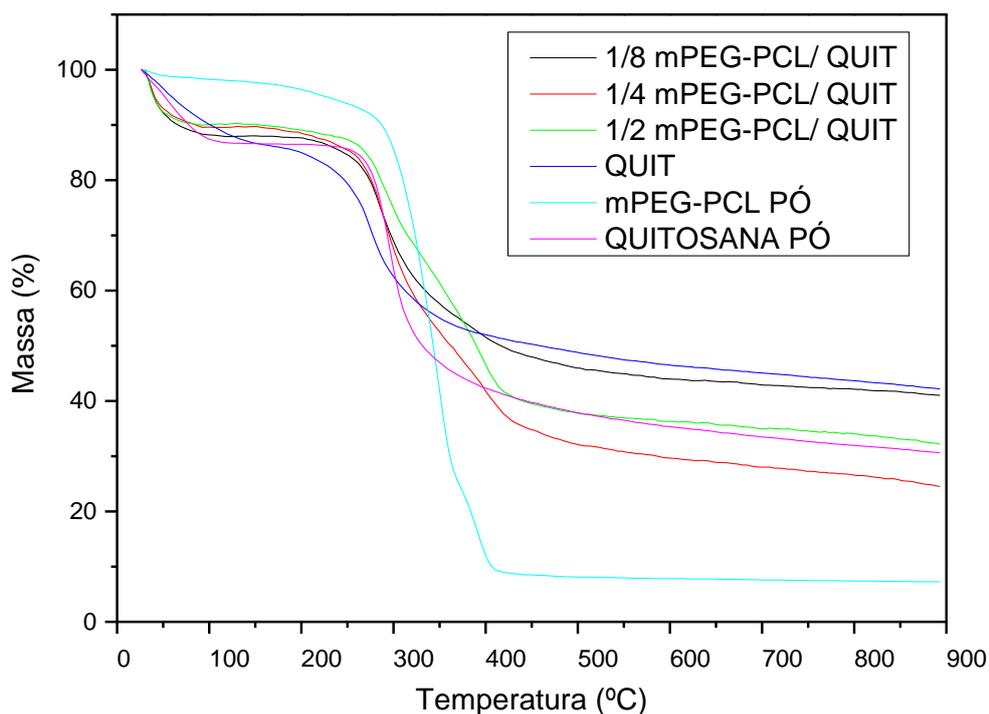


Figura 17 - Curvas de análise termogravimétrica para as membranas sem gentamicina e para os componentes mPEG-PCL pó e quitosana pó.

Fonte: Da autora.

Já na termogravimetria derivada veem-se exatamente os picos de perda de massa com suas respectivas temperaturas, estas seguem na figura 18.

Vê-se pelo gráfico que na temperatura de 400°C a taxa de perda de massa é diretamente proporcional a quantidade de mPEG-PCL nas membranas, ou seja, quanto maior a quantidade desse componente, maior a taxa de perda de massa. As membranas que tiveram maior taxa de perda de massa nessa temperatura são 1/2 mPEG-PCL/ QUIT, 1/4 mPEG-PCL/ QUIT E 1/8 mPEG-PCL/ QUIT, respectivamente, o que já era esperado pelo fato de o componente mPEG-PCL ser o que tem maior perda de massa comparado a quitosana.

De acordo com Niamsa et al., (2008) o pico de perda de massa para o mPEG foi encontrado em 418°C e a temperatura de decomposição da PCL foi observada em 360°C, coincidindo com a faixa de temperatura onde foram observadas as perdas de massa das membranas contendo mPEG-PCL .

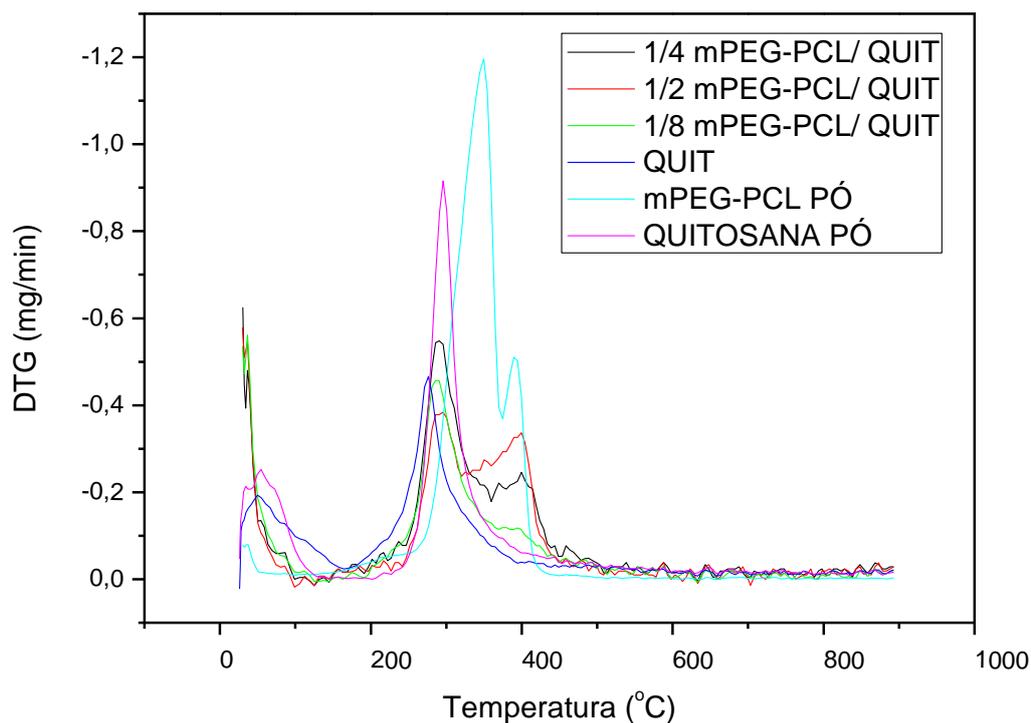


Figura 18 - Curvas de termogravimetria derivada para as membranas sem gentamicina e para os componentes mPEG-PCL e quitosana pó.

Fonte: Da autora.

#### 4.6 ANÁLISE TÉRMICA

Os resultados da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC): temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e variação de entalpia para as membranas sem gentamicina e seus componentes podem ser observados na Tabela 7. Já na figura 19 estão representados os picos referentes a temperatura de fusão das membranas QUIT, quitosana pó, 1/8 mPEG-PCL/ QUIT, 1/4 mPEG-PCL/ QUIT e 1/2 mPEG-PCL/ QUIT.

Tabela 7 - Resultados de calorimetria diferencial exploratória (DSC).

Amostra	Resultados	
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH (J/g)
QUIT	63,00	575,0
QUITOSANA EM PÓ	51,81	552,8
1/8 mPEG-PCL / QUIT	57,32	516,2
1/4 mPEG-PCL/ QUIT	52,12	358,5
1/2 mPEG-PCL/ QUIT	53,49	458,9
mPEG-PCL EM PÓ	44,14	65,8

Fonte: Da autora.

As membranas obtidas apresentaram pontos de fusão (T<sub>m</sub>) bem acima da temperatura corpórea que é 37°C. Além disso, obteve-se um pico bem definido para o mPEG-PCL em pó, devido à pureza da amostra. Já para a quitosana em pó, obteve-se uma banda larga, devido à natureza e polidispersividade do material.

Nas membranas de quitosana e mPEG-PCL, foram obtidas bandas largas e pouco definidas, sugerindo a presença de mais de um tipo de polímero/peso molecular.

A temperatura de fusão das membranas foi intermediária entre a membrana de quitosana e do copolímero mPEG-PCL. De acordo com Aroguz et al. (2010), a PCL é um polímero semicristalino que se funde a 60°C. De acordo com Xie et al. (2007), os valores encontrados de T<sub>m</sub> para o mPEG e PCL foram de 56,4°C e 47,5 °C, respectivamente. Verifica-se então que quando se tem o copolímero mPEG-PCL, a temperatura de fusão diminui em relação ao polímero PCL, fato que pode ser explicado pelo fato do polímero mPEG ser hidrofílico e apresentar menor ponto de fusão.

Percebe-se ainda, de acordo com as temperaturas de fusão das membranas, que quanto maior a concentração de mPEG-PCL, menor o ponto de fusão das mesmas. Isto se deve ao fato da temperatura de fusão do mPEG-PCL ser inferior ao da quitosana. Assim, dentre as membranas com mPEG-PCL, a maior temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) foi obtida para a amostra 1/8 mPEG-PCL / QUIT, devido ao fato de a mesma ter a menor concentração de mPEG-PCL. As outras membranas tiveram valores de T<sub>m</sub> intermediários entre os valores da membrana de quitosana (QUIT) e da quitosana em pó.

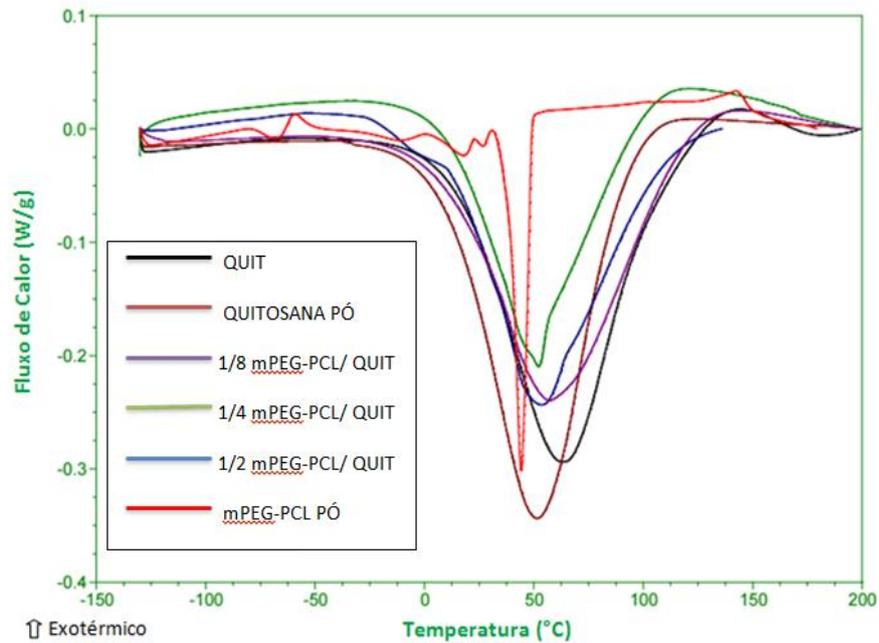


Figura 19 - Curva da calorimetria diferencial exploratória (DSC) para as membranas sem gentamicina, para a quitosana pó e mPEG-PCL.

Fonte: Da autora.

Na figura 19 também foi possível observar as temperaturas de transição vítrea da PCL por volta dos  $-65^{\circ}\text{C}$ , bem como do mPEG em torno dos  $20^{\circ}\text{C}$  (RATNER et al., 2013).

#### 4.7 ABSORÇÃO DE ÁGUA

A absorção de água pelas membranas é uma característica importante para aplicação como recobrimento de feridas, uma vez que no processo de cicatrização se deve manter o local da ferida úmido. As porcentagens de absorção de tampão pelas membranas obtidas foram calculadas de acordo com a equação (3) e estão apresentadas na figura 20.

Vê-se de acordo com o gráfico que todas as membranas tiveram valores de absorção próximos, variando entre 80% e 90% da massa inicial.

A membrana QUIT apresentou absorção de  $93\% \pm 0,28$ . De acordo com Campos et al. (2005), a porcentagem de intumescimento encontrada para as membranas de quitosana 1,5% foi de aproximadamente 95%, valor próximo ao encontrado para a membrana QUIT, que apresenta 1% de quitosana.

O efeito da incorporação do mPEG-PCL nas membranas de quitosana só foi observado para as membranas com a maior concentração de mPEG-PCL (1/2 mPEG-PCL e 1/2 mPEG-PCL – GE), que mostraram grau de intumescimento significativamente inferior as demais membranas ( $85\% \pm 0,84$  e  $82\% \pm 0,54$ , respectivamente). Tal redução pode ser atribuída ao fato de a PCL ser um polímero hidrofóbico. Entretanto, não houve diferença significativa na porcentagem de intumescimento entre as amostras QUIT, 1/4 mPEG-PCL e 1/8 mPEG-PCL.

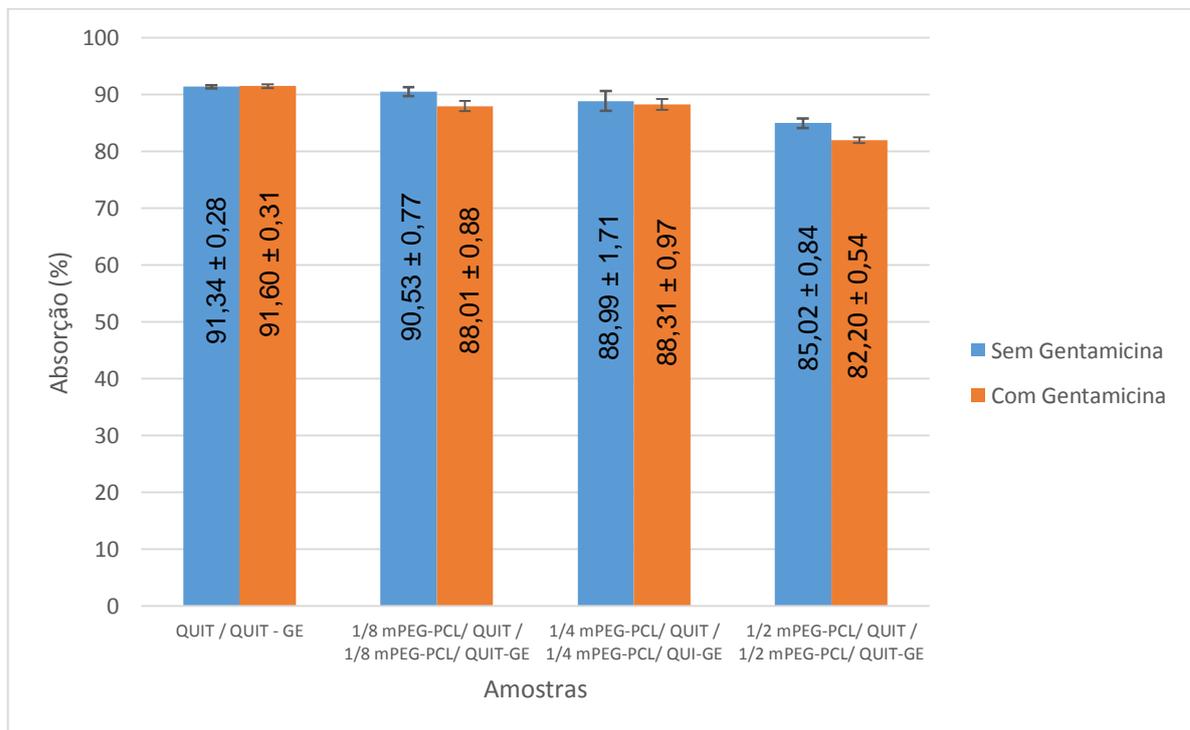


Figura 20 - Porcentagem de intumescimento das membranas à 37°C.

Fonte: Da autora.

#### 4.8 UMIDADE

A PCL é um polímero hidrofóbico, a quitosana e o mPEG são polímeros hidrofílicos. Devido a sua natureza hidrofílica, os polissacarídeos são altamente receptivos à umidade (KUREK et al, 2012). Filmes de quitosana são capazes de absorver até 40% de umidade dependendo das condições (AGUIRRE-LOREDO et al., 2016). Entretanto, uma grande porcentagem de umidade pode ser desfavorável, pois pode acelerar a degradação da membrana por ataque de micro-organismos.

A porcentagem de umidade das membranas pode ser observada nas Tabelas 8 e 9. Estas foram calculadas de acordo com a equação (2).

Não foi possível estabelecer uma tendência da umidade em função da concentração de mPEG-PCL nas membranas, bem como em função da presença de gentamicina. Entretanto, todas as membranas apresentaram valores similares aos reportados para membranas de quitosana na literatura (CAMPOS et al., 2009).

Tabela 8 - Teor de umidade para as membranas sem gentamicina.

Amostra	Umidade (%)
QUIT	13,39 ± 0,43
1/8 mPEG-PCL/ QUIT	13,23 ± 0,36
1/4 mPEG-PCL/ QUIT	14,60 ± 0,76
1/2 mPEG-PCL/ QUIT	16,38 ± 0,57

Fonte: Da autora.

Tabela 9 - Teor de umidade para as membranas com gentamicina.

Amostra	Umidade (%)
QUIT - GE	16,06 ± 0,73
1/8 mPEG-PCL/ QUIT - GE	16,11 ± 0,41
1/4 mPEG-PCL/ QUIT - GE	14,24 ± 0,73
1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE	14,56 ± 0,27

Fonte: Da autora.

#### 4.9 ANÁLISE ANTIBACTERIANA

Os resultados para o teste antibacteriano utilizando a bactéria *Escherichia coli* estão mostrados na figura 21. Não foi possível observar zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor das membranas sem a incorporação do antibiótico. Entretanto, em uma das triplicatas observou-se a formação de um halo de inibição de 0,2 cm ao redor da membrana QUIT. De acordo com o trabalho de Dutta et al. (2009), que fez um trabalho sobre as perspectivas de quitosana baseado em filmes antimicrobianos para embalagens de alimentos, a mesma possui elevada atividade antimicrobiana contra organismos patógenos incluindo fungos e bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas. O mesmo encontrou halos de inibição em filmes de amido de trigo puro e incorporados com quitosana e ácido láurico. Chung et al. (2003) desenvolveu um trabalho para avaliar a capacidade da quitosana como um desinfetante natural e avaliou sua atividade antimicrobiana contra bactérias, adicionou diferentes quantidades de solventes ácidos, íons metálicos e EDTA no polímero e seus resultados mostraram que a quitosana é um ótimo bactericida sob diversas condições ambientais. Embora a quitosana tenha ação antimicrobiana, esta propriedade não pôde ser comprovada neste trabalho, provavelmente devido à baixa concentração de quitosana utilizada na confecção das membranas.

Após 24 h, todas as membranas incorporadas com gentamicina inibiram o crescimento bacteriano, havendo formação de um halo de inibição entre 1,0 cm e 1,5 cm. Através da análise pode-se verificar que houve a liberação do antibiótico no meio de cultura, já que houve formação de halo nas membranas com antibiótico.

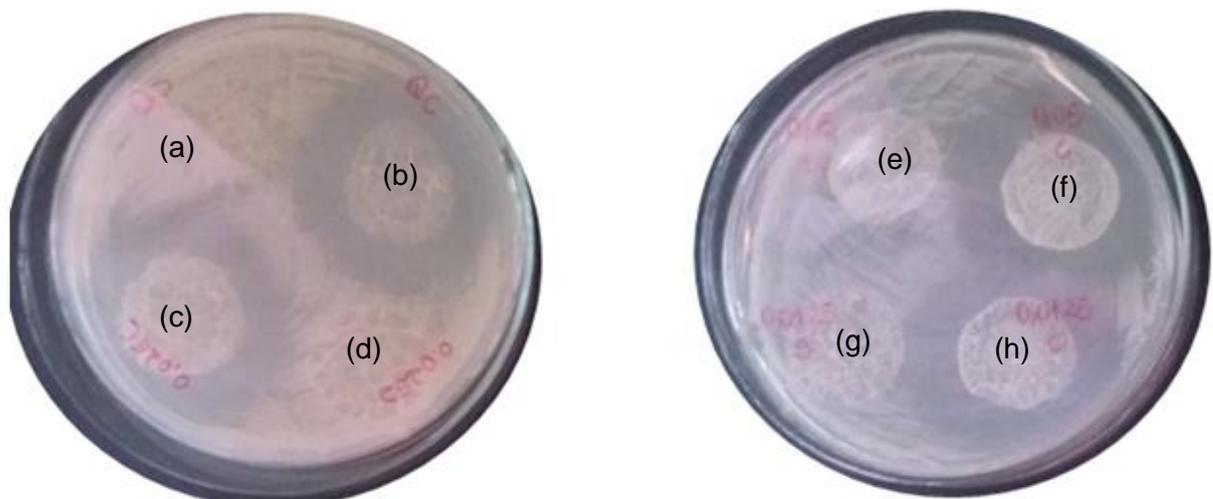


Figura 21 - Resultado da atividade antimicrobiana das membranas nas placas cultivadas

*Escherichia coli* :

- (a) QUIT;
- (b) QUIT – GE;
- (c) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT – GE;
- (d) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT;
- (e) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT;
- (f) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT – GE;
- (g) 1/8 mPEG-PCL/ QUIT;
- (h) 1/8 mPEG-PCL/ QUIT – GE.

Fonte: Da autora.

Na figura 22, foi possível observar, nas imagens de MEV, os espaços vazios referentes à liberação da gentamicina nas membranas QUIT – GE e 1/2 mPEG-PCL/ QUIT – GE, após o ensaio de atividade antimicrobiana utilizando a bactéria *E. coli*.

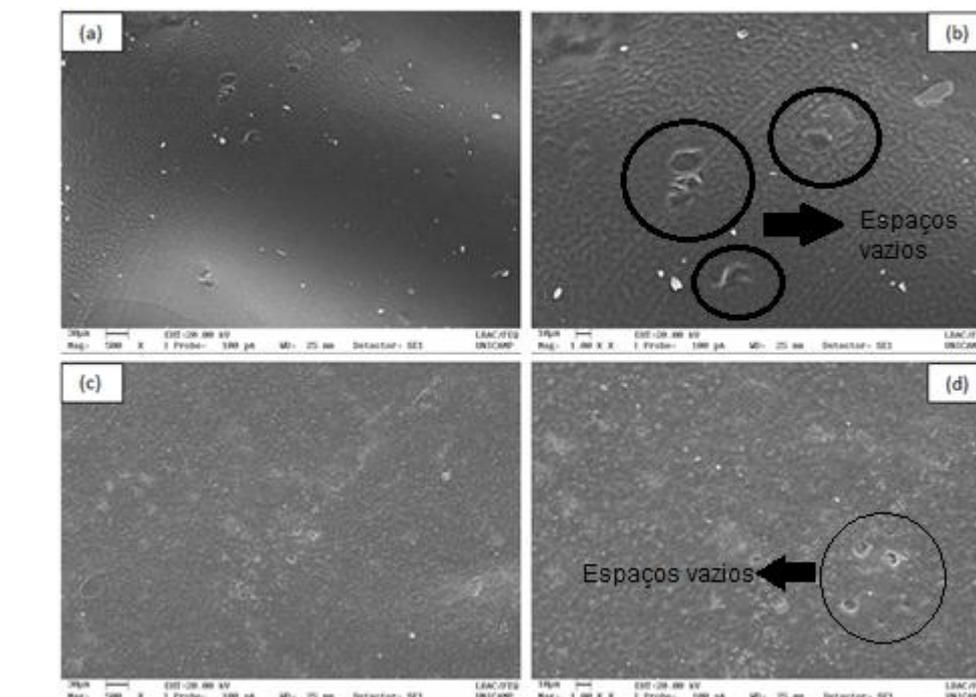


Figura 22 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura para as membranas após ensaio:

- (a) QUIT - GE (500x);
- (b) QUIT - GE (1000x);
- (c) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT - GE (500x);
- (d) 1/2 mPEG-PCL - GE (1000x).

Fonte: Da autora.

A figura 23 é referente à análise de atividade antimicrobiana utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus*. O mesmo comportamento observado para a *E. coli* ocorreu com essas bactérias: não houve formação de halo nas membranas sem gentamicina, havendo apenas a formação do halo de inibição para as membranas com gentamicina e os mesmos variaram entre 1,0 cm e 1,5 cm, comprovando assim que houve novamente a liberação do antibiótico no meio.

No trabalho de Moskowitz et al. (2010), foi analisada a liberação de gentamicina de polieletrólitos multicamadas no tratamento de *Staphylococcus*

*aureus* e o mesmo comprovou que os filmes inibiram o crescimento antibacteriano sobre a superfície do implante, apresentando zona de inibição de 2,5 cm.

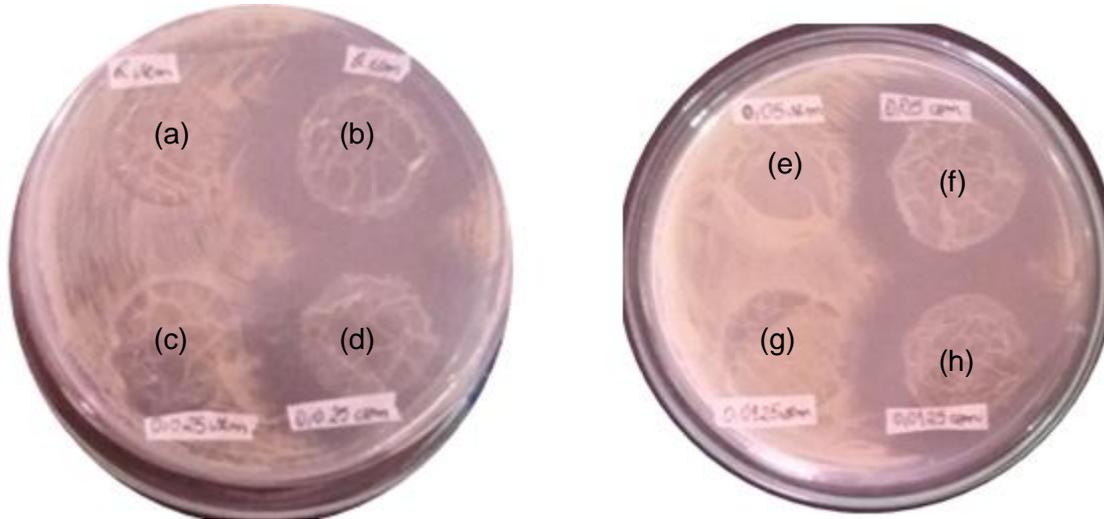


Figura 23 - Resultado da atividade antimicrobiana das membranas nas placas com *Staphylococcus aureus*:

- (a) QUIT;
- (b) QUIT – GE;
- (c) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT – GE;
- (d) 1/4 mPEG-PCL/ QUIT;
- (e) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT;
- (f) 1/2 mPEG-PCL/ QUIT – GE;
- (g) 1/8 mPEG-PCL/ QUI;
- (h) 1/8 mPEG-PCL/ QUIT – GE.

Fonte: Da autora.

Para análise da sensibilidade dos antimicrobianos em relação a alguns grupos de bactérias, existe um teste chamado de antibiograma. Neste método (aprovados pela FDA), discos de papel impregnados com o antibiótico são colocados na superfície do ágar que deve estar semeado com o micro-organismo. Há então a formação de um gradiente de concentração pela difusão do antibiótico do disco para o ágar, havendo a inibição do crescimento de um micro-organismo (RIBEIRO; SOARES, 2005).

Ainda de acordo com Ribeiro e Soares (2005) existe a forma correta de interpretação dos halos, e estes são divididos em duas categorias principais:

resistentes e sensíveis. A segunda categoria é dividida em sensibilidade intermediária e sensível. Quando as bactérias não respondem à terapêutica com o antibiótico são consideradas resistentes. A sensibilidade intermediária é dada quando as bactérias são sensíveis à terapêutica de infecções e o antibiótico se concentra na urina ou nos tecidos. É sensível quando a bactéria é sensível a doses mais comuns. Para uma concentração de gentamicina no disco de 10µg considera-se que a bactéria é resistente se houver a formação de um halo de 12 mm ou menos. A mesma é intermediária se o halo estiver entre 13 e 14 mm e é considerada sensível se o halo for de 15 mm ou mais.

A seguir Tabela 10 com valores dos halos formados para as duas bactérias analisadas.

Tabela 10 - Tamanho dos halos nas membranas.

Membrana	Halo (cm) – E. coli	Halo (cm) – S. aureus
QUIT	-	-
QUIT - GE	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1/8 mPEG - PCL/ QUIT	-	-
1/4 mPEG - PCL/ QUIT	-	-
1/2 mPEG - PCL/ QUIT	-	-
1/8 mPEG - PCL/ QUIT - GE	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1
1/4 mPEG - PCL/ QUIT - GE	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1/2 mPEG - PCL/ QUIT - GE	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1

Fonte: Da autora.

Os resultados obtidos mostram que houve halos de inibição próximos aos citados no antibiograma, porém não se podem comparar os mesmos devido ao fato de que no antibiograma o antibiótico é colocado diretamente no papel, já no caso das membranas o antibiótico está incorporado entre as cadeias poliméricas, sendo mais difícil sua difusão pelo meio. Além disso, a concentração de gentamicina utilizada no antibiograma é diferente daquela presente nas membranas.

#### 4.10 CURVA PADRÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE GENTAMICINA

Através das leituras de absorbância das amostras contendo concentrações conhecidas de solução de gentamicina obteve-se uma curva padrão que pode ser observada na figura 24. A curva padrão foi feita através do método colorimétrico que é baseado na reação da ninidrina com as aminas primárias e secundárias da gentamicina. Esta reação produz uma coloração purpúrea (FRUTOS et al., 2000).

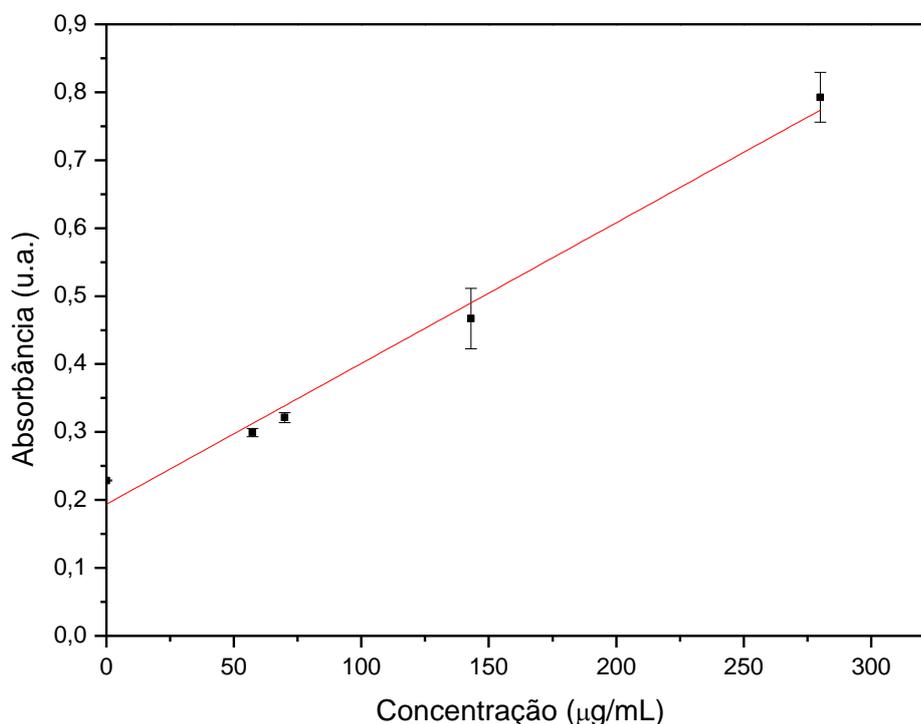


Figura 24 - Curva padrão de absorbância (u.a.) x concentração (µg/ml) para a solução de gentamicina.

Fonte: Da autora.

De acordo com os resultados, o modelo linear entre a absorbância e a concentração é dado pela equação  $y = 0,00207x + 0,19376$  e  $R^2 = 0,983$ , em que  $x$  seria a concentração e  $y$  a absorbância obtida, obtendo-se assim um valor de  $R^2$  maior do que 0,95, indicando um ajuste satisfatório da equação aos dados obtidos.

Através da equação da reta que foi obtida pela curva padrão foram calculados os valores de concentrações de gentamicina liberados nos ensaios de liberação *in vitro*, que foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, foi medida a

liberação de gentamicina durante 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora até 5 horas, valores mostrados abaixo na figura 25.

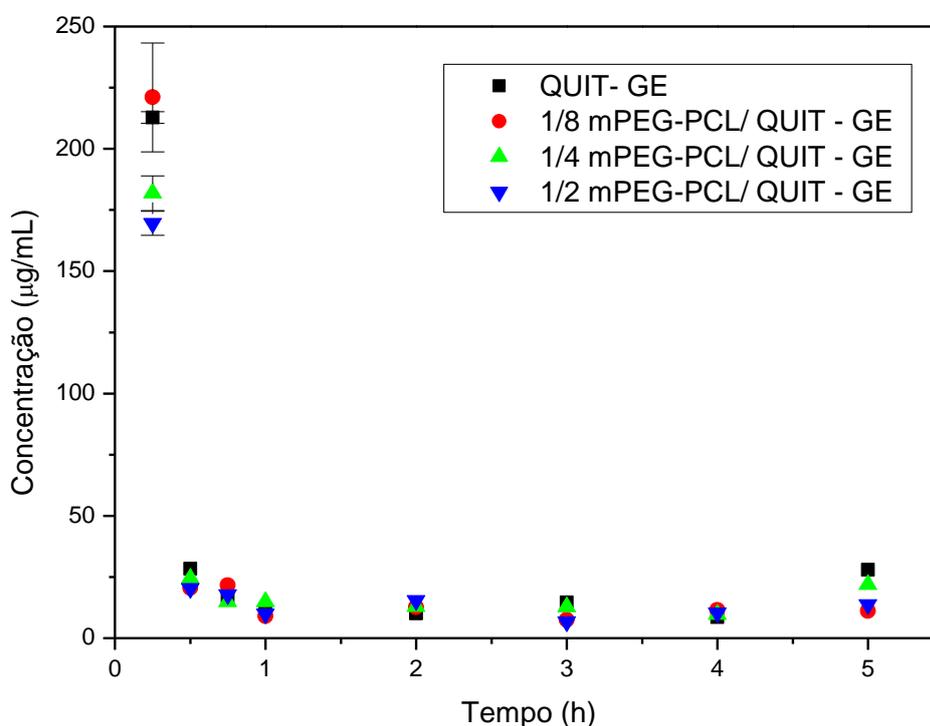


Figura 25 - Gráfico de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) x tempo (h) para liberação controlada de solução de gentamicina até 5 horas.

Fonte: Próprio autor.

Analisando o gráfico acima observa-se, nos primeiros 15 minutos, maior liberação de gentamicina, confirmando a presença da mesma na superfície das membranas, conforme observado nas imagens obtidas por MEV (Figura 13). Após este período, a liberação ocorre através do processo de difusão da gentamicina nas membranas para o meio, ou seja, do local de maior concentração para o de menor concentração. Outro aspecto importante e de grande interesse no trabalho é o fato de a membrana com maior quantidade de mPEG-PCL ter sido a que menos liberou durante os 15 minutos iniciais, provando então que o material pode ser eficaz para retardar o processo de liberação.

De acordo com a literatura verifica-se que é importante se ter uma taxa de liberação alta nas primeiras horas, pois é nesse período que se tem a maior proliferação de bactérias. Depois que as mesmas foram eliminadas é importante se

manter uma liberação mais lenta apenas para que não haja nova proliferação das mesmas na ferida (Campos et al., 2009).

Na segunda etapa, foram obtidos os valores de concentração de gentamicina liberados de 1 a 7 dias, estes seguem na figura 26.

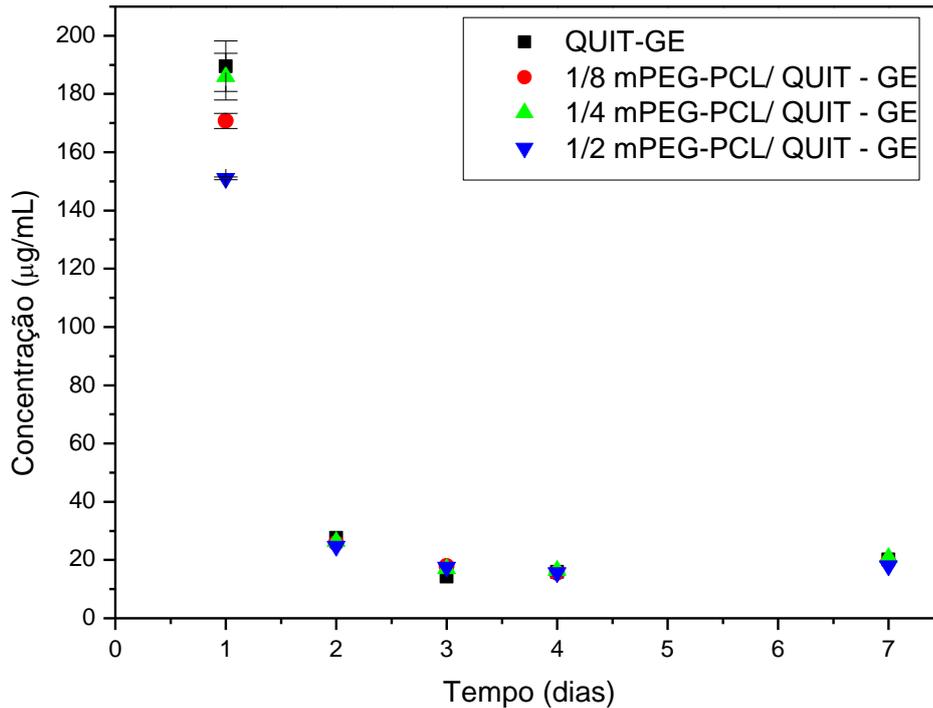


Figura 26 - Gráfico de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) x tempo (dias) para liberação controlada de solução de gentamicina até 7 dias.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a figura 26, se percebe o mesmo efeito da liberação inicial da gentamicina superficial nas primeiras 24 horas, porém se percebe uma diminuição na concentração liberada comparando-se com os primeiros 15 minutos. Novamente, a membrana com maior concentração de mPEG-PCL liberou a menor concentração inicial de gentamicina. Entretanto, a partir de 48 horas, não houve diferença significativa na concentração de gentamicina liberada pelas membranas. Ainda, todas as membranas liberaram concentração de gentamicina superior as concentrações mínimas inibitórias do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* ( $8,0 \mu\text{g/mL}$  e  $1,0 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) durante todo o período analisado. (SKUNDRIC et al., 2002 apud Campos et al. 2009).

## 5 CONCLUSÃO

Abaixo serão descritas algumas conclusões a respeito da pesquisa.

- a) A distribuição do copolímero mPEG-PCL na matriz de quitosana foi uniforme e foram obtidas são translúcidas, o que facilita a visualização da ferida, podendo ser usadas como recobrimentos de feridas de pele.
- b) As membranas são capazes de absorver fluidos, que é uma propriedade importante para aplicação como recobrimento, já que o local da ferida deve ser mantido úmido.
- c) As temperaturas de fusão das membranas são superiores a temperatura corpórea e a perda de massa das membranas ocorre em temperaturas elevadas, o que não afetaria sua aplicação nas feridas.
- d) A liberação inicial da gentamicina *in vitro* foi menor na membrana com maior concentração de mPEG-PCL, sugerindo que dependendo da concentração da PCL na membrana, a taxa de liberação do antibiótico pode ser reduzida.
- e) Houve formação de halo de inibição ao redor das membranas incorporadas com gentamicina, comprovando a liberação do antibiótico no meio.
- f) Todas as membranas liberaram, *in vitro*, gentamicina em concentração superior a concentração mínima inibitória das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, durante todo o período estudado, resultado importante para o tratamento prolongado de feridas.
- g) As membranas de quitosana e mPEG-PCL carregadas com gentamicina tem potencial para aplicação como recobrimento de feridas, porem outros testes *in vitro*, além de testes *in vivo* devem ser realizados para comprovar a biocompatibilidade e a eficiência destas membranas no tratamento de feridas.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Segue abaixo algumas sugestões para trabalhos posteriores:

- a) Aumentar a concentração de mPEG-PCL nas membranas;
- b) Verificar se as membranas provocam alergia a pacientes com alergia a crustáceos;
- c) Fazer testes com antibióticos hidrofóbicos;
- d) Fazer testes biológicos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- A.D.A.M. Camadas da pele. 2 dez. 2013. Disponível em: <http://default.adam.com/content.aspx?productId=125&pid=70&gid=8912>. Acesso em 24 jun. 2015.
- ADAM, J. et al. Cutaneous wound healing: mechanisms of disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.
- AGUIRRE-LOREDO, R. Y. et al. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. **Food Chemistry**. London, p. 560-566, set. 2015.
- ALVES, H.; MACHADO, M. T.; NORONHA, A. N. W. Análise quantitativa do processo de reparo em cicatriz cirúrgica de ratos tratados com extrato de *Musa sapientum*, *Aloe vera*, colagenase e placebo. **Revista Ciências em Saúde**, v.1, n. 2, 2011.
- AROGUZ, A. Z. et al. Preparation, characterization and swelling and drug release properties of a crosslinked chitosan-polycaprolactone gel. **Journal Of Applied Polymer Science**, Turkey, p. 2885-2894, 2010.
- BASKAR, D.; KUMAR, T.s. Sampath. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, India, p. 767-772, jun. 2009.
- BIERHALZ, A. C. K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e de pectina BTM/alginato reticulados com cálcio**. 2010. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2010.
- CAMPOS, M. G .N. et al. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromol. Symp.**, v. 229, p. 253-257, 2005.
- CAMPOS, A.C.L.,BRANCO,A.B.,GROTH,A.K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- CAMPOS, M.; CORDI, L.; DURAN, N.; MEI, L. et al. Antibacterial activity of chitosan solutions for wound dressing. **Macromol. Symp.**, v. 245-246, p. 515-518, 2006.
- CAMPOS, M.G.N.; RAWLS, H. R.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; SATSANGI, N. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. **J Mater Sci: Mater Med.**, 20, p. 537-542, 2009.
- CANEVAROLO JUNIOR, S. V.. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber, 2004.

CHUNG, Ying-chien et al. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. **Bioresource Technology**, p. 179-184, 2003.

COOPER, Ashleigh; BHATTARAI, Narayan; ZHANG, Miqin. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, p. 149-156, 2011.

DELFOSSÉ, V. et al. Clinical investigation of local implantation of gentamicin-impregnated collagen sponges in dogs. **Can Vet J**, v. 52, p.627-630, 2011.

DUTTA, P.k. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, p. 1173-1182, 2009.

FERREIRA F.R. **Síntese, caracterização e aplicação biológica de hidroxiapatita: em presença de gelatina e associada a sulfato de gentamicina**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas Cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicina. **J. PHARM. Biomed. Anal.**, v. 21, p. 1149, 2000.

GAUTAM, Sneha et al. Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. **J Mater Science**, p. 1076-1089, out. 2013.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, Germany, p. 352-366, 2011.

GU, C. et al. Preparation of polysaccharide derivatives chitosan-graft-poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery. **Colloids Andsurfacesb:biointerfaces.**, p. 745-750, 2014.

HOEMANN, C. D. et al. Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Improve Hyaline Cartilage Repair in Ovine Microfracture Defects. **The Journal Of Bone & Joint Surgery - Jbjs.org.**, p. 2671-2686, 2005.

HUANG, Ming-hsi et al. Synthesis and Characterization of Block Copolymers of  $\epsilon$ -Caprolactone and DL-Lactide Initiated by Ethylene Glycol or Poly(ethylene glycol). **Macromol. Chem. Phys.**, p. 1994-2001. ago. 2003.

IGNACIO, C. et al. In vivo tests of a novel wound dressing based on biomaterials with tissue adhesion controlled through external stimuli. **J Mater Sci: Mater Med.**, p. 1357-1364, 2011.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, Sadegh et al. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. **Carbohydrate Polymers**, p. 2058-2062,2012.

KUREK, M. et al. Barrier properties of chitosan coated polyethylene. **Journal Of Membrane Science**, p. 162-168, 2012.

LISTONI, A. J. **Estudo do Potencial de Diferenciação de Células Tronco Mesenquimais Equinas Oriundas do Sangue da Medula Óssea Cultivadas sobre um Filme Multicamadas de Biopolímeros: Quitosana, HA e CMC**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu, 2013.

Li, X. et al. In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethylene glycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application. **Carbohydrate polymers**, p. 84-90, 2012.

LIU, Ning-hua et al. Electrospinning of poly (ε-caprolactone-co-lactide)/Pluronic blended scaffolds for skin tissue engineering. **J Mater Science**, p. 7253-7362. jul. 2014.

LIU, Li et al. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). **Carbohydrate Polymers**, p. 401-407,2009.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 1999.

MARQUES, R. F. C. et al. Magnetic Nanoparticles Surface Modified with Biodegradable Polymers for Controlled Methotrexate Delivery in Cancer Therapy. **Journal Of Nanopharmaceutic Drug Delivery**. São Paulo, p. 1-8. set. 2014.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. **Biomaterials**, Manchester, v. 28, p.5100-5113, 2007.

MINOLTA Co., Ltd. **Precise Color Communication: color control from perception to instrumentation**, 1998.

MINOLTA Co., Ltd. **Precise Color Communication: color control from perception to instrumentation**, 1998.

MOSKOWITZ, J. et al. The Effectiveness of the Controlled Release of Gentamicin from Polyelectrolyte Multilayers in the Treatment of Staphylococcus aureus Infection in a Rabbit Bone Model. **Biomaterials**, p. 6019-6030, 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: Fases e Fatores de Influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p.267-271, 2012.

NIAMSA, Noi et al. Preparation and Characterization of Biodegradable Chitosan and Methoxy Poly(ethylene glycol)-b-Poly (ε-caprolactone) Blend Homogeneous Films. **Journal Of Applied Polymer Science**. Thailand, p. 418-423. jan. 2008.

QU, X.; WIRSÉN, A.; ALBERTSSON, A.-c.. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. **Polymer: Polymer**. Sweden, p. 4589-4598, 2000.

RATNER, B. D. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 3. ed. Oxford: Elsevier Inc, 2013.

RIBEIRO, Mariangela Cagnoni; SOARES, M. M. R.. **Microbiologia prática roteiro e manual: bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

SAHOO, S. et al. Synthesis and Characterization of Chitosan- Polycaprolactone Blended with Organoclay for Control Release of Doxycycline. **Journal Of Applied Polymer Science**, p. 3167-3175, 2010.

NEVES, Sara C. et al. Chitosan/Poly(E-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair: Chitosan/Poly(3-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. **Biomaterials**, p. 1068-1079, 2011.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. CETEA/ITAL, 2002.

SIGMA ALDRICH. Chitosan: médium molecular weight. 2015. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/419419?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 24 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Gentamicin sulfate. 2015. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/g1914?lang=pt&region=BR>. Acesso em 24 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Policaprolactone. 2016. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744?lang=pt&region=BR>. Acesso em 20 jan. 2016.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química. Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.  
SORENSEN, T. S.; SORENSEN, A. I. Bactericidal activity of gentamicin against *S. aureus*: In vitro study questions value of prolonged high concentrations. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, p. 82-84, 2009.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306 - 312, 2005.

VUOLO, J. H. **Fundamentos da teoria de erros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1996.

XIE, Weihui; ZHU, Weipu; SHEN, Zhiquan. Synthesis, isothermal crystallization and micellization of mPEGePCL diblock copolymers catalyzed by yttrium complex. **Polymer**, p. 6791-6798, jul. 2007.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. **Progress In Polymer Science**, p. 1217-1256, 2010.

YAO, Q. et al. Bioglass®-based scaffolds incorporating polycaprolactone and chitosan coatings for controlled vancomycin delivery. **Ceramics International**, China, v. 39, p.7517-7522, 2013.

ZHANG, P.; CAO, M. Preparation of a novel organo-soluble chitosan grafted polycaprolactone copolymer for drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, p. 21-27, 2014.

## APÊNDICE A – Curvas de calorimetria diferencial exploratória.

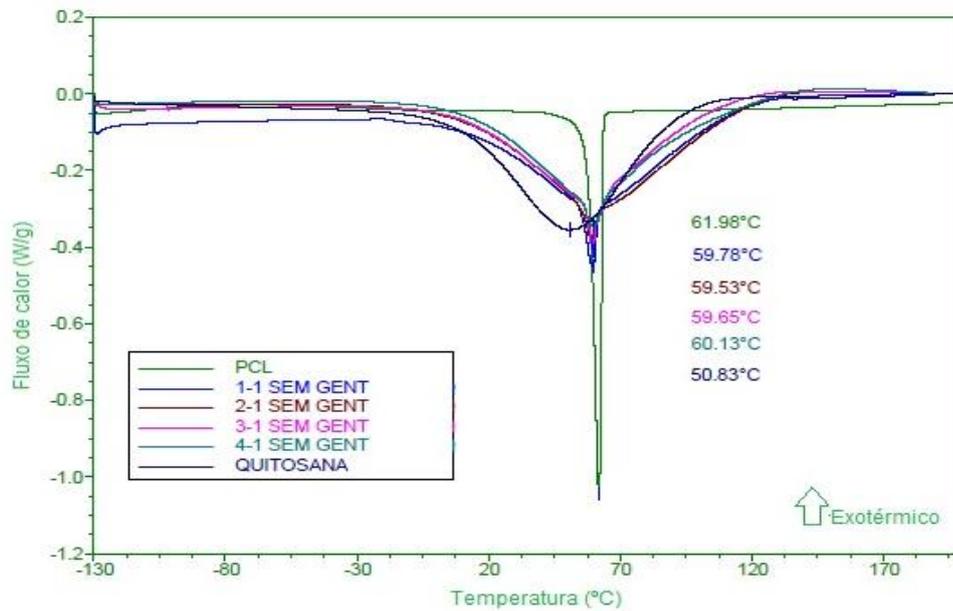


Figura 27 - Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória para as amostras sem gentamicina.

Fonte: Da autora.

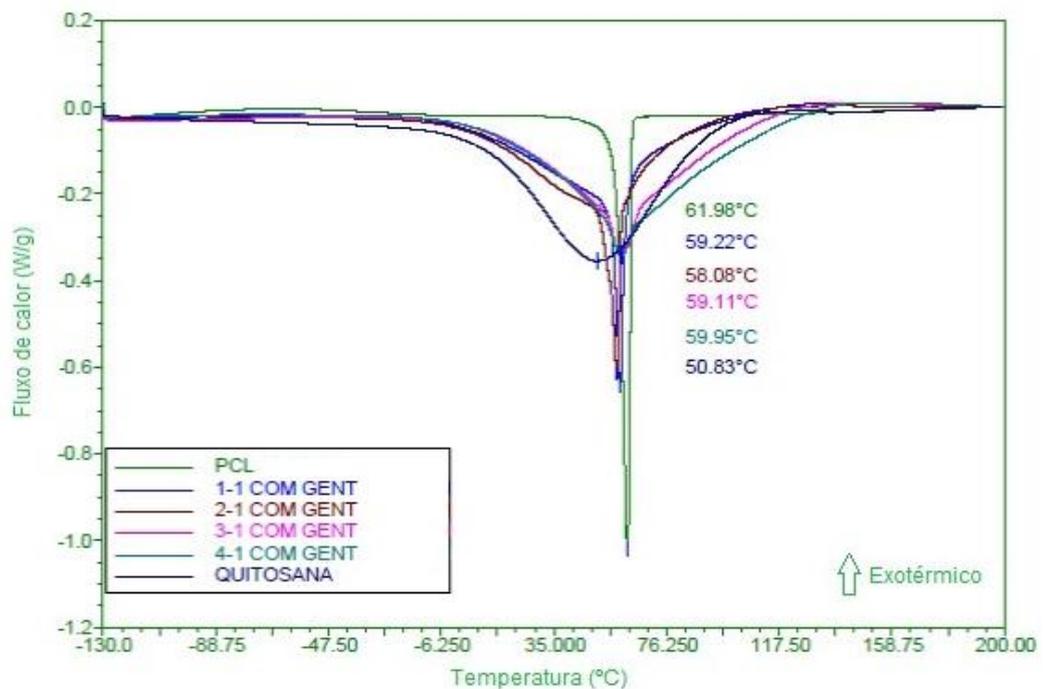


Figura 28 - Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória para as amostras com gentamicina.

Fonte: Da autora.