



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENG. QUÍMICA E ENG. DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO
EM MEMBRANAS DE QUITOSANA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE**

LEIDIANI MÜLLER

**FLORIANÓPOLIS
2013**

LEIDIANI MÜLLER

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO
EM MEMBRANAS DE QUITOSANA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Cabral
Kuhnen

FLORIANÓPOLIS
2013

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

Müller, Leidiani

Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade antimicrobiana e cicatrizante / Leidiani Müller ; orientador, Nivaldo Cabral Kuhnen - Florianópolis, SC, 2013.

96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. polímero natural. 3. membrana de quitosana. 4. atividade antimicrobiana. 5. atividade cicatrizante. I. Kuhnen, Nivaldo Cabral . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO EM
MEMBRANAS DE QUITOSANA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA E
ANTIMICROBIANA**

Por

Leidiani Müller

Dissertação julgada e aprovada para obtenção do título de Mestre em **Engenharia Química** pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen Prof. Dr. Ricardo
Antonio Francisco Machado
Orientador
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. Elita Urano de Carvalho Frajndlich Prof. Dr
Humberto Gracher Riella

Prof. Dr. Elidio Angioletto

Dedico este trabalho à minha mãe, Loni, por todo amor. Meu maior exemplo de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen pelo conhecimento.

Agradeço ao prof. Dr. Humberto Gracher Riella pelo acompanhamento no decorrer destes dois anos de pesquisa.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª Rozangela Curi Pedrosa por gentilmente ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) para a pesquisa de cicatrização. E a mestra Valdelúcia Grinevicius pela parceria nesta pesquisa, por ter realizado toda a parte de aplicação e cuidado dos camundongos.

Agradeço a Prof. Dr^ª. Elita Urano de Carvalho Frajndlich por gentilmente ter aceito fazer parte desta banca examinadora.

Agradeço ao Prof. Dr. Elidio Angioleto do Laboratório de Desenvolvimento de Biomateriais e Materiais Antimicrobianos da UNESC, pelo conhecimento compartilhado a respeito dos ensaios antimicrobianos, pelo grande auxílio nas análises microbiológicas e também por ter aceito fazer parte desta banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Bruno Szpoganicz do Laboratório de Equilíbrio Químico do Departamento de Química e ao Prof. Alfredo Tibúrcio Nunes do Laboratório de Materiais Poliméricos do Departamento de Química pela colaboração na caracterização da quitosana.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado do Laboratório de Controle de Processos e a Prof^ª Dr^ª Regina de Fátima Peralta de Muniz Moreira do Laboratório de Energia e Meio Ambiente por terem auxiliado nas análises de caracterização.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSC por todo suporte e ajuda ao longo deste trabalho.

Agradeço a toda equipe LABMAC, Jarina, Andréia, Laura, Janaina, Marivone, Daniel, Rose, Camila, Vítor pelo convívio, amizade e troca de conhecimentos. A participação de vocês foi fundamental no trabalho.

Agradeço especialmente a Andréia por toda ajuda durante este estudo e dissertação. Seu jeito sempre me passou tranquilidade no decorrer do trabalho.

À Janaina e Laura pela correção da dissertação e pelo grande apoio no trabalho.

À Jarina pela grande amizade e companhia nos cafés, finais de semana de trabalho e não menos importantes momentos de descontração.

Agradeço aos meus amigos Micheli, Nice, Jôssie, Moisés e Geison que são minha família aqui e tornam meus finais de semana mais felizes. A Bruna pela grande amizade, convívio e apoio diário.

Agradeço a minha família pelo incentivo, sabedoria, força e compreensão. E mesmo longe se fazerem o mais presente possível.

À todos os que, de alguma maneira, estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado.”*

Isaac Newton

*“Pode-se vencer pela inteligência, pela
habilidade ou pela sorte, mas nunca sem
trabalho.”*

Auguste Detoef

RESUMO

A quitosana é um polímero que tem sido amplamente estudado por ser biocompatível, biodegradável e atóxico. Este polímero apresenta uma grande capacidade de interação com substâncias orgânicas e inorgânicas. Dentre as substâncias orgânicas, temos os óleos essenciais que são amplamente conhecidos por suas propriedades antimicrobianas. Desta forma, a primeira etapa deste estudo consistiu em avaliar a capacidade bacteriostática dos óleos essenciais de alecrim, cravo e orégano. Esta avaliação foi realizada através do teste de difusão em ágar frente às bactérias *Staphylococcus aureus* do grupo gram-positivo e *Escherichia coli* do grupo gram-negativo. O óleo essencial com o melhor resultado bactericida foi incorporado na solução de quitosana 1,5% (m/v) e foram preparadas membranas de quitosana:óleo através da técnica de *casting* em diferentes temperaturas a 25 e 50°C, e diferentes relações de concentração de quitosana:óleo, 6:1, 8:1, 10:1 e 12:1 (v/v). As membranas com melhores resultados de incorporação, bem como a membrana 100% de quitosana também foram avaliadas mediante sua capacidade bacteriostática através do teste de difusão em ágar e capacidade bactericida pelo método de concentração bactericida mínima. As membranas de quitosana e quitosana:óleo, com melhor resultado antimicrobiano, foram caracterizadas e aplicadas em camundongos para avaliação do potencial de cicatrização.

Palavras-chave: quitosana, óleo essencial, incorporação, atividade antimicrobiana, atividade cicatrizante

ABSTRACT

Chitosan is a polymer that has been extensively studied because it is biocompatible, biodegradable and nontoxic. This polymer has a great ability to interact with organic and inorganic substances. Among the organic substances, there are the essential oils that are widely known for its antimicrobial properties. Thus, the first step of this study was to evaluate the bacteriostatic ability of the essential oils of rosemary, clove and oregano. This review was performed using the agar diffusion test on the bacteria *Staphylococcus aureus* of the gram-positive group and *Escherichia coli* of the gram-negative group. The essential oil with bactericidal best result was incorporated in chitosan solution 1.5% (m / v) and membranes were prepared chitosan:oil through the casting technique at different temperatures of 25 and 50 °C, and different concentration ratios of chitosan:oil, 8:1, 10:1 and 12:1 (v / v). The membranes with the best results of, as well as 100% of chitosan membrane were also evaluated by their ability bacteriostatic by agar diffusion test and bactericidal ability minimum bactericidal concentration method. The membranes of chitosan and chitosan:oil, with better antimicrobial results, were characterized and applied in mice to evaluate the potential of cicatrization.

Keywords: chitosan, essential oil, incorporation, antimicrobial activity, healing activity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 Objetivos	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.1 Objetivos Específicos.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 Quitina e quitosana.....	25
3.2 Propriedades físico-químicas da quitosana.....	27
3.2.1 Grau de desacetilação da quitosana.....	27
3.2.2 Massa molar.....	28
3.2.3 Solubilidade.....	29
3.3 Propriedades biológicas.....	30
3.3.1 Atividade antimicrobiana.....	30
3.3.2 Aceleração de cicatrização.....	32
3.4 Aplicações da quitosana.....	33
3.4.1 Membranas de Quitosana.....	35
3.5 Óleos Essenciais.....	37
3.5.1 Óleo Essencial de Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>).....	38
3.5.2 Óleo Essencial de Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	40
3.5.2 Óleo Essencial de Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	42
3.5.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Reagentes.....	45
4.1.2 Equipamentos.....	45
4.2 Análise dos óleos de alecrim, cravo (talo) e orégano.....	45
4.3 Preparação das membranas de quitosana (QTS) e quitosana com óleo incorporado (QTS:Óleo).....	46
4.4 Análise gravimétrica.....	47
4.5 Análise de diferentes razões de QTS:Óleo de cravo nas membranas.....	47
4.6 Ensaio Microbiológicos.....	48
4.6.1 Método de difusão em ágar.....	48
4.6.2 Teste de concentração bactericida mínima (CBM).....	49
4.7 Métodos de caracterização da quitosana <i>in natura</i> , óleo essencial de cravo, membranas de QTS e QTS:Óleo.....	50
4.7.1 Grau de desacetilação (GD).....	50
4.7.2 Massa molar.....	51
4.7.3 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR).....	52

4.7.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	52
4.7.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
4.8	Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	53
4.8.1	Procedimentos do modelo de excisão de pele.....	54
4.8.1.1	Procedimentos anestésico e analgésico.....	54
4.8.1.2	Procedimento Cirúrgico e pós-operatório.....	54
4.8.2	Grupos experimentais.....	55
4.8.3	Morfometria da lesão.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Análise dos óleos de alecrim, cravo (talo) e orégano.....	57
5.3	Análise gravimétrica.....	58
5.4	Análise de diferentes razões de QTS:Óleo de cravo nas membranas.....	61
5.5	Teste de concentração bactericida mínima (CBM).....	65
5.6	Caracterização da quitosana <i>in natura</i> , óleo essencial de cravo e membranas de QTS e QTS:Óleo.....	66
5.6.1	Grau de desacetilação.....	66
5.6.2	Massa molar.....	68
5.6.3	Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR).....	69
5.6.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	72
5.6.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX).....	75
5.7	Avaliação da atividade cicatrizante das membranas de QTS e QTS:Óleo.....	77
6	CONCLUSÃO	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima de quitosana contra bactérias.....	31
Tabela 2 - Áreas de emprego da quitosana.....	33
Tabela 3 - Porcentagem dos componentes do óleo essencial de <i>S. aromaticum</i>	40
Tabela 4 - Principais componentes dos óleos essenciais.....	46
Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² de avaliação do potencial bacteriostático das membranas de QTS:Óleo.	48
Tabela 6 - Níveis de variáveis utilizadas no planejamento fatorial. .	48
Tabela 7 - Medida dos halos para os óleos essenciais de alecrim, cravo (talo) e orégano.....	57
Tabela 8 - Resultados da incorporação de óleo essencial de cravo na membrana de QTS.....	59
Tabela 9 - Potencial bacteriostático dos filmes de QTS:Óleo obtidos através do planejamento experimental 2 ²	61
Tabela 10 – Resultado do crescimento de bactérias para as membranas.	65
Tabela 11 - Porcentagem de redução das lesões dos camundongos. .	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da celulose, quitina e quitosana.....	25
Figura 2 - Representação do processo de desacetilação da quitina, para a produção de quitosana.	26
Figura 3 - Resultado do método de difusão em ágar para o óleo essencial de cravo (talo):	58
Figura 4 - Incorporação de óleo essencial de cravo na membrana de QTS.	60
Figura 5 - Gráficos da análise do efeito de: a) QTS:Óleo e b) Temperatura sobre o tamanho do halo para <i>S. aureus</i> e efeito de: c) QTS:Óleo e d) Temperatura sobre o tamanho de halo para <i>E. coli</i> . ..	62
Figura 6 - Resultado do método de difusão em ágar para: a) membrana de QTS e b) membrana de QTS:Óleo 12:1 para <i>S. aureus</i> e c) membrana de QTS e d) membrana de QTS:Óleo 12:1 para <i>E. coli</i>	64
Figura 7 - Curva de titulação potenciométrica da quitosana.	67
Figura 8 - Curva da concentração das soluções de quitosana em relação à viscosidade específica.	68
Figura 9 - Espectros de infravermelho para membranas de QTS e QTS:Óleo (12:1 v/v).....	70
Figura 10- Espectros de infravermelho para o óleo essencial de cravo.	71
Figura 11 - Curva de análise termogravimétrica para a) quitosana <i>in natura</i> e b) óleo essencial de cravo.	72
Figura 12 - Curva de análise termogravimétrica para as membranas de a) QTS e b) QTS:Óleo.	74
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da membrana de QTS.	75
Figura 14 - Micrografias da membrana de QTS:Óleo 12:1.....	76
Figura 15 - Representação da média das áreas das feridas dos camundongos dos grupos CN, AA, Óleo, QTS e QTS:Óleo.....	78
Figura 16 - Tamanho da lesão nos dias 0: a) animais tratados com QTS, c) Óleo e e) QTS:Óleo; e tamanho da lesão no dia 12: b) QTS, d)Óleo e f) QTS:Óleo.....	79

NOMENCLATURA

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CBM	Concentração bacteriana mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
F _A	Fração Molar dos grupos N-acetil-D-glicosamina ou grau médio de acetilação
FTIR	Espectroscopia a região do infravermelho
GD	Grau de desacetilação
ISO	International Standard Organizations
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NADH	Adenina dinucleotídeo reduzida
PCA	Plate count ágar
QTS	Quitosana
TG	Temogravimetria

1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo atóxico composto por cadeias em que predominam unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, derivado da quitina pela desacetilação parcial. Este polímero linear por ser biodegradável e biocompatível tem sido um dos mais investigados nos mais diversos campos da ciência, como por exemplo, no tratamento de água, agricultura, cosméticos e biomaterial (CAETANO, 2012).

O grau de desacetilação e a massa molecular são importantes fatores a serem determinados na caracterização deste polímero (MUZZARELLI, 1997). Estes fatores acabam influenciando na solubilidade da quitosana (SANTOS, 2006).

A quitosana apresenta baixa toxicidade em mamíferos, e por esta razão seu potencial antimicrobiano tem sido amplamente estudado, comprovando que este polímero apresenta um amplo espectro de ação, superando a de alguns agentes químicos (RABEA *et al.*, 2003).

Dentro das aplicações biomédicas destacam-se o revestimento de feridas atuando como barreira mecânica e como aceleradora do processo de cicatrização (RAVI KUMAR, 2000). Como curativo é capaz de acelerar o processo cicatricial ao ativar macrófagos funcionais, aumentar a quantidade de fibroblastos na região da lesão e estimular a reepitelização da pele (HEIN, *et al.*; 2008). O seu potencial antimicrobiano contra as bactérias gram-negativas e gram-positivas, também favorece o processo de cicatrização ao controlar a carga de micro-organismos no local da lesão.

Atualmente os investigadores têm estudado as potenciais aplicações das membranas de quitosana produzidas através do chamado “*casting*”, onde a solução do biopolímero é colocada em um suporte, deixando-se evaporar podendo depois remover-se o filme formado. As membranas obtidas possuem baixa espessura e propriedades de barreira e mecânicas aceitáveis (SANTOS, 2006). Estudos enfatizam a combinação da quitosana com outros materiais com o objetivo acelerar o processo de cicatrização em relação à cicatrização com a quitosana pura (KHOR e LIM, 2003).

O presente trabalho buscou combinar a quitosana com óleo essencial buscando melhorar suas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes. Os óleos essenciais são utilizados há séculos como flavorizantes em alimentos, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente

sobre micro-organismos; além de serem naturais e biodegradáveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

O componente majoritário do óleo essencial de cravo é o eugenol com ampla capacidade antimicrobiana frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas (COSTA *et al.*, 2011). Este constituinte do óleo essencial de cravo é responsável pela degradação da parede celular e lise das células bacterianas (BARBOSA, 2010).

Neste trabalho, foram preparadas membranas de quitosana e membranas de quitosana com óleo essencial de cravo incorporado em diferentes concentrações. Avaliou-se a capacidade de incorporação deste óleo essencial na membrana de quitosana. As membranas com melhores resultados de incorporação foram caracterizadas pela análise termogravimétrica, espectrometria no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Foram realizadas análises da atividade bacteriostática pelo método de difusão em ágar e atividade bactericida pelo método de concentração bactericida mínima. E a membrana com os melhores resultados foi aplicada em camundongos para a verificação de sua capacidade de acelerar o processo de cicatrização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana para a avaliação de sua atividade cicatrizante e antimicrobiana.

2.1 Objetivos Específicos

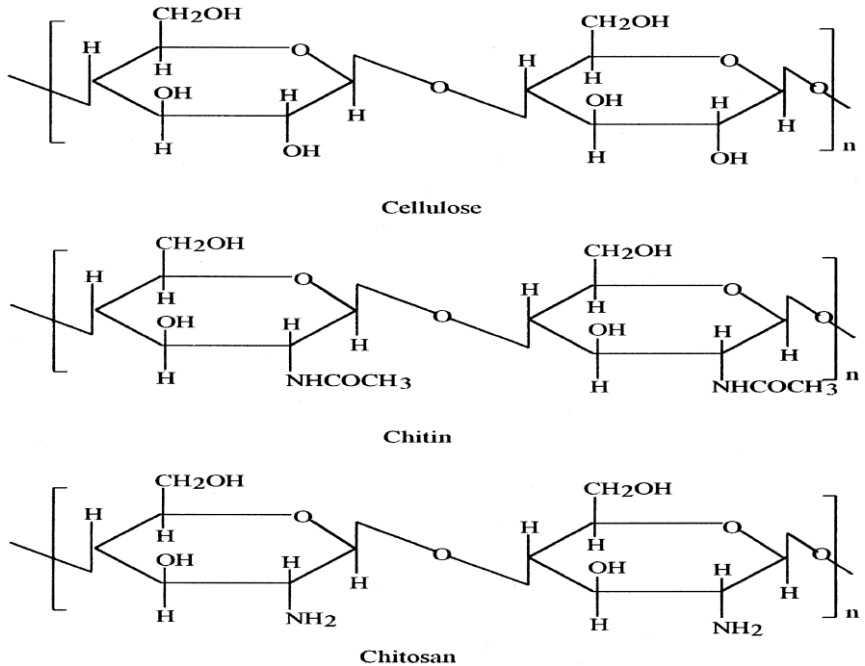
- Caracterizar a quitosana *in natura* através de seu grau de desacetilação, massa molar e termogravimetria;
- Avaliar a capacidade bacteriostática de diferentes óleos essenciais através do método de difusão em ágar;
- Testar a capacidade de incorporação de óleo essencial na solução de QTS e a influência na atividade antimicrobiana;
- Verificar o efeito da temperatura na formação das membranas e no seu potencial antimicrobiano;
- Avaliar a incorporação de óleo nas membranas de QTS;
- Analisar a atividade bacteriostática e bactericida da membrana de QTS e QTS:Óleo;
- Avaliar o potencial cicatrizante das membranas de quitosana puras e incorporadas com óleo essencial de cravo em camundongo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quitina e quitosana

A quitina é constituída pela sequência linear de açúcares monoméricos β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina), apresentando a estrutura semelhante à das fibras de celulose. Ambas as estruturas são diferenciadas nos grupos localizados na posição dois do monômero da subunidade glicosamina, que na celulose apresenta o grupo hidroxila, na quitina o grupo acetamido e na quitosana o grupo amino (GIL; FERREIRA, 2006; HOLANDA, 2011; CRAVEIRO *et al.*, 2004). Conforme se observa na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da celulose, quitina e quitosana.



Fonte: KUMAR, 2000.

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose. Esta é encontrada principalmente no

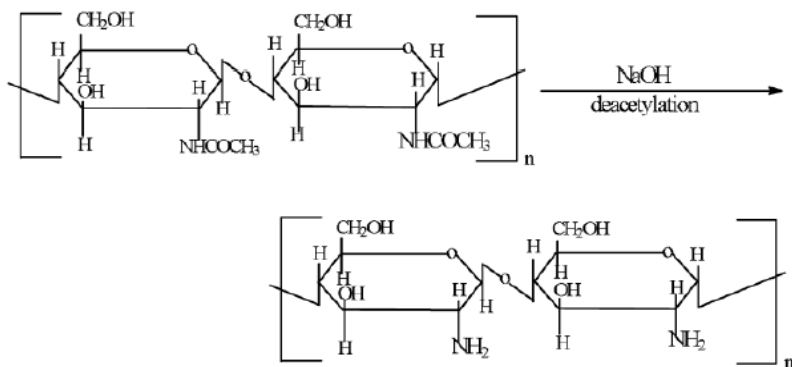
exoesqueleto de artrópodes (crustáceos, moluscos e insetos) e em paredes de células fúngicas (THARANATHAN e KITTUR, 2003; TORRES, *et al.*, 2009).

A quitina proveniente do exoesqueleto dos crustáceos passa por uma purificação devido a sua associação à proteínas, lipídeos, pigmentos e material inorgânico como CaCO_3 , ou seja, passa por uma desproteinização com NaOH ; desmineralização com HCl e despigmentação em etanol, meio ácido ou EDTA (ROBERTS, 1992; ALMEIDA, 2009).

A quitosana pode ser encontrada em pequenas quantidades em alguns fungos do gênero *Mucor* e *Zygomycetes* (LOPES, 2007; DAMIAN *et al.*, 2005), ou pode ser obtida por processos enzimáticos que possuem alto custo e baixa produtividade, inviabilizando a produção em escala industrial (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007). Ou ainda, pode ser obtida industrialmente pela desacetilação alcalina da quitina (THARANATHAN e KITTUR, 2003).

A quitosana foi obtida pela primeira vez em 1859, quando Rouget descobriu a forma desacetilada da quitina. O pesquisador colocou quitina em ebulição com solução de hidróxido de sódio, resultando em um material solúvel em ácidos orgânicos (TRINDADE NETO, 2008; DANCZUK, 2007). Figura 2.

Figura 2 - Representação do processo de desacetilação da quitina, para a produção de quitosana.



Fonte: KUMAR, 2000.

Durante a desacetilação alcalina da quitina em quitosana, percebe-se a transformação parcial dos grupos acetamidos (NHCOCH_3) em grupos aminos (NH_2), fazendo com que a quitosana apresente características físico-químicas interessantes como possuir melhor solubilidade e apresentar maior reatividade. A amina primária da quitosana reage facilmente e se faz responsável pela obtenção de muitos novos compostos e derivados (CAMPANA FILHO, 2007; ALMEIDA, 2009).

A quitina e a quitosana são copolímeros de unidades β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e β -(1-4) 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose distribuídas aleatoriamente ou em blocos por toda a cadeia polimérica. O percentual destas unidades ao longo da cadeia quitina/quitosana é denominado grau de acetilação (ALMEIDA, 2009).

3.2 Propriedades físico-químicas da quitosana

3.2.1 Grau de desacetilação da quitosana

O termo quitosana se refere a um amplo número de polímeros diferenciados entre si pelo seu grau de N-desacetilação que pode variar de 40 a 98% (DODANE e VILIVALAM, 1998; TRINDADE NETO, 2008). A completa desacetilação da quitina em quitosana dificilmente acontece por envolver diversas reações consecutivas, que favorecem sua despolimerização. O grau médio de desacetilação define a porcentagem de unidades de 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose presentes na cadeia do polímero (HOLANDA, 2011).

O grau de desacetilação varia de acordo com as condições de processamento e obtenção da quitina tais como: concentrações das soluções ácidas, temperatura e presença de oxigênio (SANTOS 2006).

Os processos químicos de desacetilação acontecem em soluções aquosas concentradas (40 – 60%) de NaOH ou KOH, por tempo variável (0,5 – 24h), à temperatura também variável (50 – 130 °C). Desta forma, as características da quitosana obtida dependem da razão quitina/solução alcalina e concentração da solução alcalina, temperatura, tempo, atmosfera de reação e tamanho das partículas de quitina (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007).

Quando o grau de desacetilação alcançado é superior a 50%, a quitosana se torna solúvel em meio aquoso ácido. A solubilização acontece pela protonação do grupo amino (NH_2) sobre o carbono 2 da unidade de repetição da D-glicosamina. Logo, ocorre a conversão do

polissacarídeo em polieletrólito. Quando dissolvida em meio ácido a quitosana possui alta carga positiva sobre os grupos $-\text{NH}_3^+$. Desta forma, adere às superfícies carregadas negativamente, agregando-se a compostos polianiônicos e quelando os íons de metal pesado. Ambas as características, tanto de solubilidade em meios aquosos ácidos quanto agregação com poliânions conferem à quitosana propriedades específicas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, tornando-a inofensiva (COSTA JÚNIOR, 2008).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na determinação do grau de desacetilação, dentre elas as mais utilizadas são: titulação potenciométrica, espectroscopia ultravioleta (COSTA JUNIOR, 2008), espectroscopia de infravermelho (ALMEIDA, 2009), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) de estado líquido (RINAUDO *et al.*, 1992) e de carbono (RMN ^{13}C) no estado sólido (RAYMOND *et al.*, 1993), cromatografia de permeação em gel e cromatografia líquida de alta pressão (SANTOS, 2006).

3.2.2 Massa molar

De acordo com Roberts (1992), tanto o grau de desacetilação quanto a massa molecular da quitosana são diretamente influenciados pelas condições de processamento da quitina, variando de acordo com as concentrações das soluções ácidas, temperatura, tempo e presença de oxigênio. Naturalmente a massa molecular da quitina está acima de 1×10^6 Da, já a massa molecular da quitosana comercial fica acima de 1×10^5 Da.

A massa molecular da quitosana possui interferência direta em diversas propriedades funcionais deste polímero. Quitosana com elevada massa molecular formam soluções com elevada viscosidade (SANTOS, 2006).

A massa molecular também apresenta influência no efeito bactericida da quitosana tanto nas bactérias gram-positivas quanto nas gram-negativas. No primeiro grupo de micro-organismos, a quitosana com elevada massa molecular forma uma película ao redor da célula bacteriana, inibindo a absorção de nutrientes. No segundo grupo, a quitosana com baixa massa molecular penetra facilmente nestas bactérias alterando e causando distúrbios no metabolismo destes micro-organismos (GARCIA, 2011).

Diversos estudos de quitosana com aplicação na área farmacêutica demonstram a influência da massa molecular. Estas

pesquisas comprovam que polímeros de baixa massa molecular apresentam melhores resultados nesta área (GOMES, 2007)

Assim como o grau de desacetilação, a massa molecular é um importante fator a ser determinado na caracterização deste polímero. Porém, a maior dificuldade desta determinação está na solubilização da amostra e dissociação de agregados presentes nas soluções deste polímero (MUZZARELLI, 1997).

Vários métodos são utilizados para esta caracterização, entre eles a viscosimetria, dispersão de luz e cromatografia de permeação de gel (GPC). A viscosimetria e GPC são as técnicas mais utilizadas e com custo relativamente baixo. Os resultados obtidos estão empiricamente relacionados com a massa molecular (SANTOS, 2006).

3.2.3 Solubilidade

De acordo com Gomes (2007), a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) ao longo da cadeia da quitosana possui influência direta na solubilidade deste polímero. Quanto maior a quantidade de amino protonados maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias, conseqüentemente maior será a solvatação em água. O aumento da quantidade de grupos amino livres, potencialmente ionizáveis, fazem com que a quitosana seja solúvel em soluções ácidas de pH <6 (SANTOS, 2006).

A solubilidade da quitosana depende do grau de desacetilação, massa molecular, força iônica do meio e pH da solução. Sendo a quitosana solúvel em ácido acético, clorídrico e fórmico (SANTOS, 2006; BERGER *et al.*, 2004). Na literatura, as soluções de ácido acético de 1 a 3% são as mais utilizadas para a solubilização deste polissacarídeo.

Ainda de acordo com Santos (2006) quando o grau de desacetilação diminui, a gama de solubilidade aumenta por duas razões. Primeiro, por apresentar um menor número de grupamentos amino livres e depois pelo aumento do valor do pK intrínseco. Como consequência, quitosanas com graus de desacetilação perto de 50% são solúveis em água.

De acordo com Rinaudo (2006) a quantidade de ácido necessariamente depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de prótons necessária é no mínimo igual à concentração de unidades $-\text{NH}_2$ envolvidas.

A maioria dos polissacarídeos aumenta a viscosidade do meio aquoso onde se incorporam, devido à sua elevada massa molecular. Este é o caso da quitosana, formam soluções com elevada viscosidade com vários ácidos orgânicos (RINAUDO *et al.*, 1993).

3.3 Propriedades biológicas

3.3.1 Atividade antimicrobiana

Por apresentar baixa toxicidade em mamíferos, o potencial antimicrobiano da quitosana tem sido amplamente estudado, comprovando que este polímero apresenta um amplo espectro de ação, superando a de alguns agentes químicos (RABEA *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada pelo grau de desacetilação, massa molecular, pH e temperatura. Estas variáveis atuam modificando a estrutura química da quitosana, logo, o potencial de ligação às membranas celulares (GOMES, 2007). Temos ainda que, estes fatores atuam de forma ordenada e independente para cada tipo de micro-organismo (BADAWI, 2011).

O mecanismo de ação da quitosana frente às bactérias tem sido amplamente estudado. Dentre os mecanismos propostos, o mais aceito se refere às interações entre as cargas positivas da quitosana com moléculas aniônicas da superfície celular. Acarretando alterações vitais na permeabilidade da membrana e comprometendo o metabolismo do micro-organismo, podendo em alguns casos, levar a lise da célula (LIU *et al.*, 2004).

Para Goy, Brito e Assis (2009) a atividade antimicrobiana da quitosana é explicada por três mecanismos: 1) A interação superficial iônica entre a quitosana e o micro-organismo resultando em vazamento de eletrólitos e outros constituintes protéicos de baixa massa molecular pela parede celular; 2) A penetração da quitosana no núcleo dos microorganismos inibindo a síntese de RNA e proteínas e 3) A formação de uma barreira externa que acaba inibindo a absorção de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

Para Mussarelli *et al.* (1997), a quitosana pode ainda quelar oligo-elementos essenciais ou nutrientes do meio inibindo o crescimento bacteriano. Alguns pesquisadores afirmam que a sensibilidade das bactérias gram-negativas está relacionada à quantidade de moléculas aniônicas na superfície celular (LIU *et al.*, 2004).

Dentre os demais polissacarídeos a quitina e a quitosana se diferenciam por apresentar atividade antimicrobiana especialmente

contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidemis*, *Bacillus subtilis* do grupo de bactérias gram-positivas; e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* do grupo das bactérias gram-negativas. Sendo que estes bacilos estão presentes em lesões retardando o processo de cicatrização pela liberação de toxinas e degradando o tecido em processo de epitelização (KIM *et al.*, 1997; GARCIA, 2011).

Bactérias gram-positivas apresentam maior sensibilidade à quitosana de elevada massa molecular, enquanto as bactérias gram-negativas apresentam maior sensibilidade à quitosana de baixo peso molecular. Esta sensibilidade está relacionada à maior permeabilidade do polímero através da membrana celular (ZHENG, ZHU; 2003). Observe a Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima de quitosana contra bactérias.

Bactéria	Reação de Gram	CIM (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	100
<i>Bacillus cereus</i>	+	1000
<i>Corynebacterium michiganence</i>	+	10
<i>Erwinia</i> sp.	-	500
<i>Erwinia carotovora subsp.</i>	-	200
<i>Escherichia coli</i>	-	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	700
<i>Micrococcus luteus</i>	+	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	500

Fonte: RABEA *et al.*, 2003.

Conforme Qi *et al.* (2004), através de micrografias eletrônicas, pode-se observar que a membrana da bactéria *S. aureus* (gram-positiva) na presença de quitosana foi enfraquecida, e algumas vezes

fragmentada, enquanto a bactéria *E. coli* (gram-negativa) apresentou seu citoplasma concentrado.

3.3.2 Aceleração de cicatrização

No estudo de aplicação de quitosana como agente cicatrizante, este polímero apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade e bioatividade, além de ser atóxica, bactericida, fungicida e biodegradável. Destacando-se em relação aos polímeros sintéticos que em sua grande maioria são tóxicos (TOMIDA *et al.*, 2009).

De acordo com Silva *et al.* (2006) a quitosana possui a capacidade de ativar os macrófagos o que explica sua capacidade imunomoduladora, seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, e ainda, a biodegradabilidade deste polímero no organismo. As lisozimas produzidas por macrófagos hidrolisam e modificam a quitosana, formando oligômeros de quitosana de baixa massa molecular. Estes oligômeros da quitosana ativam os macrófagos que liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influência na estrutura do colágeno. Os macrófagos liberam N-acetilglicosaminidase que são capazes de hidrolisar a quitosana à monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina. Estas unidades de açúcares são necessárias na biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. E também promovem a migração de neutrófilos, induzindo a resposta inflamatória.

Feridas tratadas com quitosana apresentam menor grau de fibrose, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa (GOY *et al.*, 2009). Tem-se ainda, que a quitosana apresenta excelente capacidade umectante e apresenta melhor aderência que ácido hialurônico, além de ser economicamente mais viável (MUZZARELLI, 1997). Além disso, as capacidades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que estes polímeros podem prevenir infecções quando aplicados diretamente no local da lesão (KOIDE, 1998).

A quitosana apresenta os seguintes mecanismos de ação cicatrizante: aceleração da infiltração das células polimorfonucleares na região machucada, no aumento da retirada dos feixes de fibrina, no aumento da migração de fibroblastos para a área lesada, no estímulo da migração de macrófagos, no estímulo da proliferação de fibroblastos, na ativação de células inflamatórias e na produção de colágeno (GARCIA, 2011). A quitosana na forma de membranas ou gel é um excelente veículo para fármacos no tratamento de lesões cutâneas, acelerando o processo de cicatrização. (GARCIA, 2011).

3.4 Aplicações da quitosana

As propriedades biológicas e físico-químicas da quitosana permitem este polímero ter várias aplicações em diferentes campos: agricultura, processamento de alimentos, tratamento de água não potável, cosméticos e aplicações biomédicas (ALMEIDA, 2009). Esta lista de aplicações da quitosana (Tabela 2) pode ser ainda maior quando são incluídos os vários derivados de quitosana obtidos em reações químicas através das quais são inseridos diferentes grupos funcionais às suas estruturas, conferindo diferentes propriedades e aplicações (KUMAR, 2000).

A quitosana pode ser adicionada a ração de animais, diminuindo o colesterol e melhorando o funcionamento do intestino. Por este polímero apresentar a capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, acaba por interferir na absorção intestinal destas gorduras reduzindo os níveis de colesterol e triglicérides (KOIDE, 1998).

Já em tratamentos de água a quitosana é aplicada como quelante de remoção de metais pesados, compostos aromáticos como o fenol, e corantes. A afinidade por metais provém do grande número de grupos amino na molécula e depende do pH, do tempo e temperatura nos quais as reações ocorrem (CARVALHO, 2006).

Para aplicações cosméticas, os ácidos orgânicos são geralmente bons solventes. A quitosana é o único polímero catiônico natural que se torna viscoso ao ser solubilizado com ácido. Esse material é usado em cremes, loções e vários derivados de esmaltes para unhas (RAVI KUMAR, 2000).

Quando adicionada a produtos como condicionadores, cremes e xampus, a quitosana forma filmes com a queratina do cabelo, que, comparados com os filmes formados por polímeros sintéticos, são muito mais estáveis em alta umidade, de modo que os cabelos mostram menor tendência à adesão, menor carga estática e, conseqüentemente, uma melhoria na escovação e penteado em relação aos cabelos tratados com fixadores convencionais (CRAVEIRO *et al.*, 1999).

Tabela 2 - Áreas de emprego da quitosana.

Área	Emprego
Biomédica	Biomembranas artificiais

	Sutura cirúrgica
	Agente cicatrizante
	Aditivo de medicamentos
Farmacêutica	Liberação controlada de drogas
	Controle de colesterol
	Lente de contato
	Umectante
Cosmética	Fungicida
	Bactericida
	Aditivos alimentares
	Nutrição animal
Indústria de alimentos	Embalagem biodegradável para alimentos
	Imobilização de enzimas e de células
	Separação de proteínas
Biotecnologia	Cromatografia
	Agente antibactericida
	Tratamento de superfície
Indústria têxtil e de papel	Tratamento de efluentes
Papel para indústria fotográfica	Filmes

Fonte: ANTONINO, 2007.

Em diversos estudos a quitosana têm demonstrado sua capacidade de modificar o metabolismo de defesa vegetal em diversas culturas. O efeito protetor de plantas é comprovado pela indução de marcadores bioquímicos como proteínas-RP, fitoalexinas, inibidores de proteases, além de compostos estruturais como lignina e calose. O polissacarídeo apresenta, portanto, efeito duplo, pois além de ativar

vários mecanismos de defesa nos tecidos das plantas, pode atuar diretamente sobre patógenos (COQUEIRO, 2010).

Devido a biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, e em conjunto com suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, a quitosana têm sido amplamente estudada no campo biomédico no reparo da pele, osso, cartilagem (ALMEIDA, 2009). Testes clínicos com quitosana não demonstram qualquer tipo de inflamação ou reação alérgica seguida de implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano (KHOR, LIM, 2003).

A quitosana possui a capacidade de estimular o sistema imune do organismo contra infecções virais e bacterianas (PELUSO *et al.*, 1994). Apresenta propriedades de cura de feridas e favorece a regeneração de tecidos moles (pele) e duros (osso) (MUZARELLI *et al.*, 1994).

Diversas linhas de pesquisa estudam o desenvolvimento de suportes para a imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Onde a quitosana é utilizada como matéria-prima no desenvolvimento de membranas, filtros e microsferas, os quais podem ser usados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL *et al.*, 2005).

3.4.1 Membranas de Quitosana

Membranas são finas camadas de um material, de forma a originar uma barreira seletiva a passagem de gases, vapores e solutos, enquanto oferecem também proteção mecânica (KROCHTA, 1997).

Atualmente os investigadores têm estudado as potenciais aplicações das membranas de quitosana. Este polímero é muito explorado como filme de revestimento, ou ainda, permite a obtenção de membranas através do chamado “*casting*”, onde a solução do biopolímero é colocada em um suporte, deixando-se evaporar podendo depois remover-se o filme formado por destacamento. As membranas obtidas possuem baixa espessura e propriedades de barreira e mecânicas aceitáveis (SANTOS, 2006).

As propriedades das membranas de quitosana, como nas soluções, variam de acordo com o processo de obtenção. O tipo de ácido utilizado na solubilização da quitosana também afeta as propriedades do filme. Quitosana solubilizada com ácidos acético ou fórmico resultam num filme com maiores forças de tensão seguidos de quitosanas solubilizadas com ácido láctico ou cítrico (ZIVANOVIC, 2005).

A maioria das membranas contém pelo menos um polímero de elevada massa molecular. O polímero com esta característica é importante para manter a matriz da membrana com a força coesiva necessária. O aumento da força coesiva resulta geralmente na redução da flexibilidade, porosidade, permeabilidade a gases, vapores e solutos. Uma distribuição uniforme dos grupos polares ao longo da cadeia do polímero aumenta a coesão pelo aumento aparente das pontes de hidrogênio e das interações iônicas entre as cadeias (SANTOS, 2006).

Por outro lado, para Park et al. (2002) o aumento da massa molecular da quitosana também resulta no aumento da força coesiva dos filmes, porém, não afeta significativamente a permeabilidade ao vapor de água e permeabilidade ao oxigênio. Sendo que estes dois parâmetros são importantes para a avaliação dos filmes, principalmente quando utilizados como embalagens de alimentos.

Quitosana com elevado grau de desacetilação, torna-se mais eficiente na modulação da mitogênese dos fibroblastos, acelerando o processo de cicatrização (HOWLING *et al.*, 2001). Este mesmo aumento do grau de desacetilação provoca um aumento na adesão e proliferação celular tanto para os queratinócitos quanto para os fibroblastos. Isso acontece porque mesmo em pH neutro, existem sítios catiônicos nas cadeias de quitosana, desta forma, ocorre a interação eletrostática das cargas negativas das membranas celulares com a quitosana. Logo, aumentando o grau de desacetilação, aumenta a densidade das cargas na superfície, aumentando a adesão (CHATELET *et al.*, 2001).

No passado, a função dos curativos era permitir a evaporação dos exsudatos e prevenir a entrada de bactérias na ferida. Atualmente os curativos, baseiam-se no conceito de criar um ambiente favorável para a movimentação das células epiteliais, promovendo a cicatrização. Este ambiente ótimo de cicatrização inclui: umidade ao redor da lesão, circulação efetiva de oxigênio para a regeneração das células, dos tecidos e reduzir a quantidade de bactérias. Para isso, características como aderência à ferida, porosidade, macroestrutura, propriedades mecânicas, taxa de biodegradação e ausência de antigenidades são fundamentais (FERNANDES, 2009).

Por ser biodegradável, adesiva, atóxica, bactericida, bacteriostática, fungistática e hemostática a quitosana se revela um ótimo material para o tratamento de feridas (FERNANDES, 2009). Estudos mostram que a membrana de quitosana não é citotóxica quando testadas com fibroblastos (SILVA *et al.*, 2008) e queratinócitos

(CHATELET *et al.*, 2001). E em estudos clínicos, feridas tratadas com membranas de quitosana cicatrizam mais rápido (SANTOS *et al.*, 2007).

Outros estudos enfatizam a combinação da quitosana com outros materiais tendo como objetivo acelerar o processo de cicatrização em relação à cicatrização com a quitosana pura (KHOR e LIM, 2003). Estas combinações buscam membranas com maior estabilidade a variações de pH ou potencializar o efeito bacteriostático e bactericida para acelerar o fechamento de feridas em camundongos (FERNANDES, 2006).

3.5 Óleos Essenciais

De acordo com a ISO (International Standard Organization) óleos essenciais são definidos como produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste de vapor da água. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odíferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, etéreos ou essências. A principal característica dos óleos essenciais é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis (ALMEIDA, 2006).

Estes óleos possuem uma solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar estas soluções que recebem o nome de hidrolato. Possuem sabor geralmente acre (ácido) e picante, quando recém extraídos são geralmente incolores ou amarelados. Em geral, óleos essenciais por serem voláteis, não são muito estáveis na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (TAVARES, 2007).

Na constituição dos óleos essenciais pode se encontrar cetonas, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, éteres, ésteres, fenóis entre outros, mas predomina uma mistura de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os óleos essenciais das plantas são constituídos principalmente por uma mistura de lipídios chamados terpenos. E o aroma destes óleos se deve a uma complexa mistura de substâncias voláteis, terpenos, sesquiterpenos de derivados oxigenados (DIAZ-MAROTO *et al.*, 2002).

Os terpenos são hidrocarbonetos, e estes compostos são mais frequentes nos óleos essenciais na forma de monoterpenos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Já os derivados oxigenados são denominados terpenóides (SIMÕES e SPITZER, 2001).

Ainda de acordo com Simões e Spitzer (2001) os óleos voláteis podem ser acumulados em diversos órgãos de uma mesma planta; porém, as características físico-químicas e odores podem variar de

acordo com a localização na mesma planta. E a composição química de um óleo volátil extraído do mesmo órgão de um vegetal pode variar de acordo com a época de colheita, condições climáticas e solo. O ambiente de desenvolvimento do vegetal como temperatura, umidade relativa, exposição ao sol também exercem influência direta sobre a composição química dos óleos voláteis. Sobretudo aqueles que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Já nos vegetais com estruturas de acúmulo mais profundas, os óleos apresentam características mais constantes.

Em alguns vegetais o óleo essencial se forma unicamente como um resultado da reação enzimática natural ocorrida quando o tecido da planta é molhado e apertado por maceração. Eles são removidos da planta primeiramente por destilação a vapor - embora alguns possam ser pelo frio, destilação seca, ou destilação a vácuo. (OURIVES, 1997).

Os óleos essenciais têm algumas vantagens em suas aplicações: não contribuem na cor do produto final, geralmente são uniformes na qualidade do sabor e são livres de taninos e enzimas. Porém, eles frequentemente fornecem um perfil de sabor incompleto porque nele não está incluído o composto não volátil. Isto é bem notado no óleo essencial de gengibre e pimenta, que fornece mais gosto nessas ervas aromáticas, mas faltam a pungência contribuída pelos não voláteis, gingerol e piperina, respectivamente. Além disso, alguns óleos essenciais sofrem o processo de oxidação rapidamente devido às frações terpenos e sesquiterpenos, e é destruído o antioxidante natural presente nas ervas aromáticas (OURIVES, 1997).

Os óleos essenciais são utilizados há séculos como flavorizantes em alimentos, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre micro-organismos. Outro aspecto é que pelo fato de serem naturais e biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e por poderem atuar sobre várias moléculas alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármacos sintéticos. Assim, tornam-se substâncias chave para a pesquisa de novos medicamentos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

3.5.1 Óleo Essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim é um arbusto verde e é uma das espécies de ervas da família *Labiatae*. É um vegetal nativo do Mediterrâneo, transplantado para a China e atualmente cultivado no mundo todo (FLAMINI *et al.*,

2002). Encontra-se pelo mundo diferentes espécies de alecrim: *R. officinalis*, *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus*, e *R. laVandulaceus*. e o *R. officinalis* L. que é o único que cresce naturalmente nas regiões Mediterrâneas (ANGIONE *et al.*, 2004). As partes utilizadas da planta são as folhas e as sumidades floridas de onde é obtido o óleo essencial (FARIA, 2005).

O alecrim possui emprego culinário, medicinal, farmacêutico e cosmético. Proporciona um dos aromas mais refrescantes e menos caros, sendo uma das ervas mais importantes no emprego de alimentos (GENENA, 2005; SANTURIO, 2011).

Já na área da medicina o alecrim é amplamente pesquisado por apresentar poder antisséptico, analgésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, antioxidante, digestivo tônico e vasodilatador (GENENA, 2005; FARIA, 2005).

De acordo com Santoyo *et al.* (2005) foram identificados 33 compostos químicos no óleo essencial de alecrim. Os principais constituintes são: α -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo.

O rendimento do óleo essencial das folhas é acima de 2%, com odor característico de cânfora. Este óleo é composto por: 16-20% borneol, 27-30% cineol, 10% cânfora, 2-7% acetato de bornil e baixas porcentagens de α -pineno, canfeno, terpineol e verbenone (OURIVES, 1997).

Alguns destes componentes conferem características específicas ao óleo como, cineol é responsável pelo aroma refrescante, α -pineno pela queimadura, aroma de pinho, cânfora aroma de menta e o borneol pelo gosto acre (SVOBODA *et al.*, 1992).

Nos estudos de Leal *et al.* (2003), foram testados os potenciais antioxidante e antimicrobiano dos extratos de alecrim. E o poder antioxidante dos extratos foi superior ao poder bactericida contra as bactérias *M. tuberculosis*. As propriedades antioxidantes do alecrim se devem ao alto teor fenólico diterpênico (THORSEN *et al.*, 2003).

Os compostos terpenóides são os principais responsáveis pela capacidade antimicrobiana do alecrim. Estes compostos incluem: borneol, cineol, pineno, canfeno e cânfora (BURT, 2004).

Inouye *et al.* (2001) testaram o efeito bactericida dos principais constituintes do *R. officinalis* (α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, cânfora, terpineol-4-ol e α -terpineol) e encontraram que o terpineol-4-ol foi altamente efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli*.

As concentrações de alecrim necessárias para exercer efeitos antibacterianos, são maiores que as utilizadas em alimentos como flavorizantes. No entanto, associados a outros agentes, podem contribuir para o controle do crescimento bacteriano e impedir a rancificação de alimentos (HENTSZ e SANTIN, 2007).

3.5.2 Óleo Essencial de Cravo (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia, como é popularmente conhecido, pertence à família *Myrtaceae* e possui o nome científico de *Syzygium aromaticum*. É uma árvore de grande porte que pode atingir até 15 metros de altura, e pode chegar até 100 anos de idade. É uma especiaria nativa da Indonésia, e no Brasil apenas o estado da Bahia produz esta especiaria de forma comercial (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A extração do óleo essencial do cravo se dá a partir dos botões florais, folhas e talos. Chá feito a partir dos botões florais de óleo de cravo com função carminativa e estimulante de digestão é muito comum no uso popular. O cravo-da-índia é amplamente utilizado como aromatizante de molhos na gastronomia, ou ainda, na produção de cigarros perfumados. Existem diversos estudos que comprovam sua capacidade como antioxidante natural, anestésico e também sua capacidade biológica como fungicida, sendo uma alternativa no tratamento pós-colheita, capacidade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (de OLIVEIRA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011).

O componente majoritário do *S. aromaticum* é o eugenol, quimicamente designado como 4-alil-2-metoxifenol. A concentração de fenilpropanóides, em especial o eugenol varia de acordo com a porção do vegetal analisada e a região na qual a planta foi cultivada (AFONSO, *et al.*, 2012). Na Tabela 3 pode ser observado os principais constituintes do óleo de cravo:

Tabela 3 - Porcentagem dos componentes do óleo essencial de *S. aromaticum*.

Componentes	% área				
	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*

Eugenol	82,47	87,07	82,64	90,41	88,38
β -Cariofileno	10,78	8,29	10,45	3,61	0,64
α -Humuleno	1,44	1,08	1,63	0,60	-
Acetato de eugenila	1,89	-	-	3,76	10,98
Óxido de cariofileno	0,47	-	0,51	-	-
Classes	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
Fenilpropanóides	84,36	87,07	82,64	94,17	99,36
Sesquiterpenos não oxigenados	12,22	9,37	12,08	4,21	0,64
Sesquiterpenos oxigenados	0,47	-	0,51	-	-
Total identificado (%)	97,05	96,44	95,23	98,38	100,00

*FF: Folhas frescas; FSS: Folhas secas ao sol; FSE: Folhas secas em estufa, Pen: Pedúnculos e BFS: Botões florais secos de *S.*

aromaticum

Fonte: de OLIVEIRA *et al.*, 2009.

O principal constituinte do óleo de cravo apresenta ponto de fusão em $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ebulição em $253\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diante do contato prolongado com o ar, apresenta instabilidade aumentando sua viscosidade e alterando sua cor de amarelada para avermelhada. Este composto apresenta baixa solubilidade em água, sendo solúvel em clorofórmio, álcool etílico, gordura e éter. Sua alta lipossolubilidade possibilita uma fácil absorção através das membranas lipídicas e rápido acesso ao local de ação. É capaz de penetrar nas membranas biológicas e atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias, onde inibe a oxidação do nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), diminuindo os níveis de adenosina trifosfato ATP (LINARD, 2008).

Devido a sua estrutura molecular complexa, o eugenol possui diversas ações farmacológicas comprovadas, sendo utilizado em práticas odontológicas como antisséptico tópico, analgésico e anestésico local. O eugenol apresenta ainda, efeito anti-inflamatório, cicatrizante e é eficaz no combate e diminuição de bactérias presentes na boca além de

conferir propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canais, visto ter ação bactericida, portanto, eficaz no tratamento de algumas enfermidades infecciosas na cavidade bucal (ESCOBAR, 2002).

3.5.2 Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare*)

O *Origanum vulgare*, popularmente conhecido como orégano ou ainda, como manjerona brava, pertence à família *Lamiaceae*. Esta planta é originária dos países mediterrâneos, amplamente cultivada em regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa e também cultivada no Brasil. É uma planta herbácea, perene, ereta, aromática de hastes algumas vezes arroxeadas de 30-50 cm de altura (SANTURIO, 2011; BARBOSA, 2010)

A importância do estudo desta planta não está limitada ao seu uso como condimento, mas também na medicina, principalmente por suas propriedades biológicas como bactericida, fungicida e antioxidante. Seu óleo essencial é conhecido por suas propriedades expectorante, antioxidante, diurética, antisséptica, antigases, calmante e tônico digestivo. E seu óleo é rico em polifenóis que protegem as células e inibem o envelhecimento. Porém, seu uso é limitado na perfumaria e cosméticos (SANTURIO, 2011; RODRIGUES, 2002).

Os principais componentes do óleo essencial de orégano são o carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999). Em alguns óleos de orégano, o timol é o principal ingrediente proporcionando o aroma e gosto, e em outros o carvacrol é predominante. A eficácia da atividade bactericida do óleo pode variar em função dos teores de timol e carvacrol presentes, que dependem de fatores abióticos como tipo de solo, clima, práticas agrícolas, variedade do orégano e processo de extração do óleo essencial (SILVA *et al.*, 2010)

O óleo essencial do gênero contém mais de 34 compostos ativos, sendo que suas propriedades são atribuídas à presença dos maiores constituintes. Entretanto, os princípios ativos secundários (linalol, acetado linalil, α -terpenol, insoborneol, entre outros) dessa espécie têm demonstrado significativa relevância, visto que a eficiência do carvacrol e timol isolados, não atingem a mesma eficiência do óleo essencial (ZENG *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais de orégano e manjerição foram anteriormente estudados por Moreira *et al.* (2005) em relação a sua atividade antimicrobiana frente a diferentes linhagens de *E. coli*. Obteve-se os valores de concentração inibitória mínima (CIM)

concentração bactericida mínima (CBM) de 1,8 e 2,0 mL/100 mL para orégano e de 1,9 e 2,0 mL/100 mL para manjeriço.

Santos (2010) constatou que as cepas de *S. aureus* (gram-positivas) apresentaram menores valores para CIM em relação às bactérias *E. coli*, gram-negativas quando tratadas com diversos tipos de óleos essenciais. Enquanto nos estudos de Costa (2009), observou-se que não havia diferença nos resultados de CIM entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

3.5.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é evidente, no entanto, o mecanismo de ação desta atividade ainda não é completamente entendido. Existe um consenso de que o efeito antimicrobiano acontece devido os compostos aromáticos e fenólicos. Estes atuam na membrana plasmática, alterando sua estrutura e funções (HOLEY e PATEL, 2005).

Analisando o grande número de compostos químicos presentes os óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antibacteriana não acontece por apenas um mecanismo de ação. Mas sim, que existam vários alvos na célula como: alterações da membrana plasmática, perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Estes mecanismos podem ocorrer um em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

Deve-se ainda, levar em consideração que os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção (GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009).

Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides, incluindo os compostos fenólicos (SANTOS e NOVALES, 2011).

Diversos estudos descrevem a ação dos terpenos como composto antimicrobiano. Os monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança

de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella enterica* (PROBST, 2012).

Alguns compostos e seus mecanismos de ação foram relacionados por Barbosa (2010):

- 4-Terpinenol: possui o poder de levar a inibição da respiração oxidativa, indução da deformação da membrana (dilatação) tendo como consequências mudanças na permeabilidade da membrana;

- Eugenol: concentrações de eugenol inibem a produção de amilase e protease para os *B. cereus*, degradação da parede celular e lise celular também foram encontradas;

- Carvacrol e timol: timol possui estrutura similar ao carvacrol, diferindo pela localidade do grupo hidroxila sobre o anel fenólico. As duas substâncias conseguem tornar a membrana permeável. Ambas as estruturas desintegram a membrana externa, presente na parede de bactérias gram-negativas, liberando os lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP.

Embora sejam encontrados resultados diferentes em alguns estudos, a susceptibilidade dos micro-organismos gram-positivos parece ser maior do que a dos gram-negativos em relação aos óleos essenciais, como relatado nas revisões de Burt (2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- Quitosana da empresa Purifarma (São Paulo, Brasil). A quitosana foi cedida pelo Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC;

- Hidróxido de sódio - NaOH padrão analítico. da Vetec;
- Ácido acético glacial - CH₃COOH da Synth;
- Óleo essencial de alecrim – Ferquima;
- Óleo essencial de cravo (talo) – Ferquima;
- Óleo essencial de orégano – Ferquima;
- Polisorbato 80 com nome comercial Tween 80 – Vetec.

4.1.2 Equipamentos

- pHmetro PHS-3B da PHTEK;
- Agitador mecânico M-110 da Nova Ética;
- Estufa Q316M da Quimis.

4.2 Análise dos óleos de alecrim, cravo (talo) e orégano

Na primeira etapa deste trabalho foram testados três óleos essenciais (alecrim, cravo e orégano) mediante sua capacidade bacteriostática contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus* do grupo gram-positivo e células bacterianas *Escherichia coli* do grupo gram-negativo. Os testes foram realizados pelo método de difusão em ágar (teste de halo).

Para o presente trabalho os óleos essenciais utilizados são da marca Ferquima, o laudo técnico fornecido pela empresa apresenta os principais componentes de cada óleo na Tabela 4:

Tabela 4 - Principais componentes dos óleos essenciais.

Óleo essencial	Principais componentes
Alecrim	Alfa-pineno = 13% 1,8 cineol = 46% Cânfora = 10% Beta-pineno = 5%
Cravo (talo)	Eugenol = 90 % Acetato de Eugenila = 1% Beta-Cariofileno = 8%
Orégano	Carvacrol = 71% Timol = 3,0% Gama-terpineno = 4,5% Para-cimeno: 3,5% Beta-carfiofileno: 3%

4.3 Preparação das membranas de quitosana (QTS) e quitosana com óleo incorporado (QTS:Óleo)

As membranas de quitosana foram preparadas pelo método de evaporação de solvente conhecido com *casting*, através da dissolução do polímero em uma solução de ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 1,5% (m/v), sob agitação mecânica por um período de 18 horas. Em seguida, a solução foi mantida sob agitação mecânica, onde, para se obter a completa neutralização do ácido, foi gotejado hidróxido de sódio na concentração de 1M e, monitorou-se o pH da solução, até que fosse atingida o pH= 6,0.

A solução, assim formada, foi distribuída em placas de Petri de 7,5 cm de diâmetro com um volume final em cada placa de 30 mL de solução. As placas foram submetidas à secagem em estufa à 25°C por aproximadamente 48 horas, e também foram testadas membranas submetidas à secagem em estufa à 50°C por aproximadamente 26 horas.

A incorporação do óleo de cravo (talo) foi realizada usando a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para

obtenção da membrana de QTS. Porém, após a neutralização a solução de QTS, o óleo essencial de cravo foi adicionado em diferentes proporções de QTS:Óleo: 6:1, 8:1, 10:1 e 12:1 (v/v) à diferentes temperaturas: 25 e 50°C.

No entanto, devido ao caráter hidrofóbico do óleo, fez-se necessária a adição de um surfactante para a formação da emulsão. Assim, adicionou-se 0,2% do surfactante Polisorbato 80, comercialmente chamado de Tween 80.

As emulsões foram mantidas sob agitação mecânica por 1 hora e vertidas nas placas de Petri com um volume final de 30 mL em cada placa. Em seguida foram submetidas à secagem em estufa à 25°C por 48 horas e também foram testadas membranas submetidas à secagem em estufa à 50°C por aproximadamente 18 horas, a membrana com óleo incorporado necessita menor tempo para secagem.

4.4 Análise gravimétrica

O método de gravimétrica se utiliza de operações para se determinar a quantidade de um constituinte de uma amostra, tanto por pesagem direta do elemento puro, quanto por um de seus derivados com composição conhecida e definida. Esse procedimento analítico constitui-se em um método de extensa aplicação na determinação de macroconstituintes de uma amostra.

Neste caso, as membranas com diferentes concentrações (6:1, 8:1, 10:1 e 12:1) secaram em duas diferentes temperas (25 e 50°C). Após a retirada das placas de Petri da estufa, estas foram pesadas e as membranas destacadas. Entre a membrana e a placa e na parte superior da membrana o óleo excedente foi seco com auxílio de papel toalha. Então, a placa de Petri com a membrana foi novamente pesada para se avaliar a capacidade de incorporação do óleo e se esta capacidade varia de acordo com a temperatura.

4.5 Análise de diferentes razões de QTS:Óleo de cravo nas membranas

Após a análise gravimétrica, obteve-se a máxima capacidade de incorporação do óleo essencial de cravo na membrana de quitosana. Com as duas melhores concentrações e duas diferentes temperaturas de secagem foi feito um planejamento para avaliar o potencial bacteriostático das membranas de QTS:Óleo.

As tabelas 5 e 6 apresentam a matriz do planejamento fatorial 2² em duplicata e os níveis variáveis, respectivamente, para a avaliação da influência destes fatores na atividade bacteriostática das membranas de quitosana.

Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2² de avaliação do potencial bacteriostático das membranas de QTS:Óleo.

Ensaio	QTS:Óleo	Temperatura
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1

Tabela 6 - Níveis de variáveis utilizadas no planejamento fatorial.

Parâmetro	Nível -1	Nível +1
QTS:Óleo	10:1	12:1
Temperatura (°C)	25	50

4.6 Ensaios Microbiológicos

Os testes microbiológicos foram realizados para determinar se os óleos essenciais, membranas de quitosana e membranas de quitosana com óleo incorporado são capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Desenvolvimento de Biomateriais e Materiais Antimicrobianos do IPARQUE/UNESC, em Criciúma-SC.

4.6.1 Método de difusão em ágar

O método empregado foi o de descrito por Althertum et al. (1999), que consiste na fixação de um papel filtro impregnado com um antimicrobiano ou na abertura de um poço devidamente preenchido com o antimicrobiano em questão, na superfície de um meio de cultura sólido apropriado previamente semeado com a bactéria teste, o crescimento bacteriano poderá ser inibido, formando-se então um halo de inibição em torno do disco ou poço (zona onde não há crescimento bacteriano),

cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado e a sensibilidade da bactéria. O teste avaliou a atividade bacteriostática dos óleos essenciais, das membranas de QTS e membranas de QTS:Óleo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e foram comparadas com a quitosana *in natura* (controle positivo) e ácido acético a 1% (v/v) (controle negativo) e Tween 80 a 0,2% (controle negativo).

O meio de cultura utilizado nas placas de Petri foi o ágar Plate Count Ágar (PCA), sendo que após a inoculação as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Porções 100 µL da solução com ácido acético, Tween 80, e óleos essenciais (alecrim, cravo e orégano); e membranas com diâmetro de 1cm foram depositadas assepticamente sobre a superfície dos meios inoculados, em forma de discos, os quais foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido com auxílio de uma régua milimétrica. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

4.6.2 Teste de concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM é a menor concentração em µg/mL, capaz de matar o micro-organismo em estudo (PELKZAR *et al.*, 1997). Na realização destes testes de CBM, os inóculos foram preparados utilizando células bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). O teste realizado em triplicata iniciou com o preparo dos tubos de ensaio contendo o meio de cultura LB Broth e a suspensão bacteriana. Em cada tubo de ensaio amostras de membranas de QTS, QTS:Óleo, 10:1 e 12:1 (v/v), foram pesadas e adicionadas a 4 mL do meio LB, obtendo-se as seguintes concentrações 217; 72,5; 40; 22,5 e 12,5 mg.mL⁻¹. Para o controle positivo de crescimento para cada grupo de bactérias foi utilizado um tubo livre do agente antimicrobiano. Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas com agitação constante.

Após este período de incubação, retirou-se de cada tubo a alíquota de 200 µL que foram transferidos para outro tubo contendo 200 mL de solução salina. Estes tubos passaram por agitação, e de cada tubo se retirou 20 µL que foram inoculados ao longo da superfície de uma

placa de Petri contendo ágar PCA. Cada tubo corresponde à uma placa de Petri com meio de cultura PCA.

As placas foram incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica à temperatura de 35°C. Depois desse tempo, observou-se o crescimento ou não de colônias, na presença de crescimento, conta-se as colônias com um contador de colônias quando isso é possível. A placa onde não cresce nenhuma colônia é a correspondente à CBM.

4.7 Métodos de caracterização da quitosana *in natura*, óleo essencial de cravo, membranas de QTS e QTS:Óleo

4.7.1 Grau de desacetilação (GD)

Existem diversas técnicas para quantificar o GD da quitosana, opta-se pelo método mais confiável a que se tem acesso, já que diferentes técnicas fornecem resultados distintos. A titulação potenciométrica foi escolhida neste trabalho em função da simplicidade e precisão deste método de caracterização.

Para a titulação potenciométrica foi utilizado um titulador automático Metrohm, modelo Titrino Plus 848 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl) que consiste em um sistema de célula de titulação de vidro termostatizada a 25 °C, selada e sob atmosfera inerte de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico. Nesta cela foram adicionados 40 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ para se obter uma boa dispersão do adsorvente, bem como a protonação dos grupos amino da quitosana *in natura* analisada. A força iônica da solução foi mantida com KCl 0,1 mol.L⁻¹ e o agente titulante utilizado foi uma solução de KOH 0,1 mol.L⁻¹.

A curva dos valores de pH em função do volume de titulante deve apresentar dois pontos de inflexão que correspondem a neutralização do excesso de ácido forte e dos grupos amino do polímero. A diferença entre estes dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino da quitosana. O GD das amostras foi calculado utilizando a Equação 1.

$$\%GD = \frac{M(V_2 - V_1)161}{w} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: M é a concentração da solução de KOH em mol.L⁻¹, V₁ e V₂ são os volumes de KOH (mL) utilizados para neutralizar o excesso de HCl e a quitosana protonada, respectivamente, 161 é a massa molar

da unidade monomérica da quitosana e W é a massa de amostra em mg utilizada na titulação.

4.7.2 Massa molar

A massa molar da quitosana foi determinada através da viscosidade intrínseca $[\eta]$ e o método adotado foi o proposto por Signini e Campana Filho (1998). Foram preparadas cinco soluções diluídas de quitosana *in natura*, que variaram entre 0,1 e 0,5 mg.mL⁻¹. O solvente utilizado foi uma solução tampão com 0,2 mol.L⁻¹ de acetato de sódio e 0,3 mol.L⁻¹ de ácido acético (pH ~ 4,5). As soluções foram mantidas sob agitação constante durante 15 h e após este período, cada solução foi aquecida em banho-maria por 2 min. Após atingir a temperatura ambiente, as soluções foram filtradas em membrana com porosidade 0,45µm. Alíquotas de 10 mL foram colocadas em viscosímetro capilar de Ostwald da Schott-Geräte o qual foi introduzido em banho termostatizado em $25 \pm 0,1$ °C. Os tempos de escoamento foram determinados através de um viscosímetro AVS-350 da mesma marca do capilar e correspondem à média de quatro determinações independentes que apresentaram variação menor do que 0,1%. Estes valores foram utilizados para obter a viscosidade específica de cada solução diluída de quitosana como mostrado na Equação 2.

$$\eta_{esp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \frac{k \rho t}{k \rho_0 t_0} - 1 = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{Equação 2}$$

onde η é a viscosidade da solução diluída, η_0 é a viscosidade do solvente puro, k é uma constante do viscosímetro, ρ a densidade do líquido, t o tempo de escoamento da solução diluída e t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro.

Plotando-se uma curva das concentrações das soluções diluídas (C) pela η_{esp}/C e extrapolando-se os dados de η_{esp}/C para concentração zero se tem a viscosidade intrínseca $[\eta]$. Finalmente, através da equação de Staudinger-Mark-Houwink (Equação 3) calcula-se a massa molar do polímero (M) onde $K = 0,074$ e $a = 0,76$ (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 1998). Os valores de K e a são específicos para a mistura de 0,3 mol.L⁻¹ de ácido acético e 0,2 mol.L⁻¹ de acetato de sódio, a 25 °C.

$$[\eta] = K M^a \quad \text{Equação 3}$$

As análises para a determinação da massa molar da quitosana foram realizadas no Laboratório de Materiais Poliméricos do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC.

4.7.3 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

A radiação infravermelha se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, chamados de níveis vibracionais. A radiação infravermelha provoca, vibração de átomos ou grupos de átomos no composto e estas vibrações podem ter amplitudes e velocidades diferentes. Como as energias das vibrações são quantizadas, existem determinadas quantidades de energia que fazem os grupos vibrarem (BARBETTA e MAGINI, 2006).

As intensidades das bandas podem ser expressas como transmitância (T) ou absorvância (A) e as vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e deformações angulares.

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas para as membranas de QTS e QTS:Óleo. As membranas foram dispostas nas celas para a leitura. Os espectros no infravermelho foram obtidos em ampla região, de 400 a 4000 cm^{-1} , em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21 com transformada de Fourier. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC, Florianópolis, SC.

4.7.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

Em uma análise termogravimétrica (TGA), a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (em geral linearmente com o tempo). Um gráfico de massa ou do percentual da massa em função do tempo é chamado *termograma* ou *curva de decomposição térmica*.

As curvas termogravimétricas foram obtidas através de um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 com um programa de temperatura de 25-500 °C, taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e vazão de 50 mL min^{-1} , sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas pela Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, Florianópolis, SC.

4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações, fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies (HOLANDA, 2011).

Para a obtenção das imagens do filmes QTS, que não é condutora, fez-se necessário o recobrimento com uma película micrométrica de material condutor - ouro, sob o qual é emitido sinal de eletro secundário a uma tensão de 10KV para a obtenção das imagens.

Porém, esta técnica quando aplicada na membrana de QTS:Óleo acabava rompendo os bolsões de óleo da membrana, impedindo a visualização nas imagens. Portanto, para estas amostras foi realizado MEV sem o recobrimento com ouro, e as imagens foram geradas por sinal retro espalhado, onde se observa a topografia da membrana a uma tensão de 5KV.

As imagens das superfícies das amostras de membrana de QTS e membranas de QTS/Óleo foram geradas com ampliações de 50 a 800 vezes. Os ensaios de MEV foram realizados no Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Jeol, modelo JSM – 6390 LV, pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, Florianópolis, SC.

4.8 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

Para execução desta pesquisa o projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo mesmo sob o número PP00744.

Os ensaios para avaliação da atividade cicatrizante foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade. Os experimentos foram realizados com camundongos de linhagem isogênica Balb/c (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do LABIOEX/UFSC.

Os animais foram mantidos conforme recomendações de *Guidelines* reconhecidos internacionalmente e destinados para a criação e o manejo de animais para a pesquisa. Assim, os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro -

escuro de 12 h, à temperatura de 25 ± 2 °C e 60% de umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum* (BUITRAGO *et al.*, 2008).

4.8.1 Procedimentos do modelo de excisão de pele

Os procedimentos realizados para a remoção ou excisão da pele foram baseados em modelo experimental padronizado previamente no biotério setorial do LABIOEX/ BQA (OLIVEIRA *et al.*, 2000/2001; PEREIRA, 2010).

4.8.1.1 Procedimentos anestésico e analgésico

Todos os animais foram submetidos a procedimento anestésico prévio, com administração via intraperitoneal de cetamina 10% (100 mg.kg⁻¹), xilazina 1% (10 mg.kg⁻¹) e maleato de acepromazina 1% (3 mg.kg⁻¹).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram transferidos para gaiolas individuais. Durante todo o período pós-operatório foram administradas diariamente duas doses de 20 mg.kg⁻¹ de analgésico (dipirona sódica), via oral por gavagem, para minimizar a dor causada pelo procedimento cirúrgico. O analgésico utilizado, bem como a dose e a via de administração foram selecionados tendo como base sugestões estabelecidas por Mezdari *et al.* (2004) e Buitrago *et al.* (2008). Ao final de 12 dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados através de aplicação dos anestésicos já mencionados, no triplo da dose terapêutica (superdosagem), para coleta do tecido cicatricial para análise dos parâmetros bioquímicos.

4.8.1.2 Procedimento Cirúrgico e pós-operatório

Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear e assepsia da pele com álcool 70% e delimitação da área de 1 cm², procedendo à excisão desta área de tecido epitelial dorsal com tesoura cirúrgica (OLIVEIRA *et al.*, 2000/2001). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Diariamente as gaiolas foram higienizadas para redução de contaminação nas lesões e na tentativa de manter um ambiente limpo e adequado durante o período experimental.

4.8.2 Grupos experimentais

Os animais tratados receberam aplicações tópicas imediatamente após o procedimento cirúrgico de excisão de pele (PEREIRA, 2010), que foi considerado como o dia 0. A cada três dias os camundongos receberam nova aplicação da substância avaliada no grupo. Foram avaliados diferentes grupos de tratamento com seis animais cada (n=3). Seguem os grupos:

- a) Grupo controle negativo não tratado (CN): este grupo não recebeu nenhuma aplicação tópica;
- b) Grupo controle positivo com ácido acético: este grupo recebeu tratamento com aplicação tópica de ácido acético (AA) 1%;
- c) Grupo membrana de QTS;
- d) Grupo membrana de QTS:Óleo;

4.8.3 Morfometria da lesão

Esse parâmetro inclui a porcentagem de redução da lesão medida através da comparação entre a área lesionada no dia do procedimento cirúrgico e a área cicatrizada. Para determinar a redução da lesão, as feridas foram fotografadas com distância padronizada imediatamente após a cirurgia em intervalos de três dias, até o 12º dia de tratamento (PEREIRA, 2010). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software ImageJ, a partir das fotografias obtidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos óleos de alecrim, cravo (talo) e orégano

Os óleos de alecrim, cravo (talo) e orégano da marca Ferquima foram testados mediante sua capacidade bacteriostática, utilizando-se o método de difusão em ágar (teste de halo) em duplicata. O óleo essencial de cravo apresentou maiores halos para as bactérias *S. aureus*, enquanto o óleo essencial de orégano apresentou um maior halo para as bactérias *E. coli*. Tabela 7:

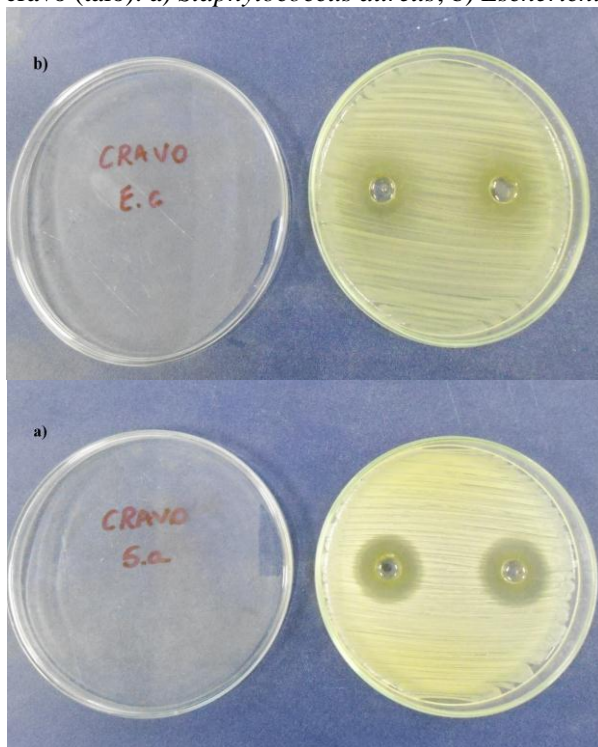
Tabela 7 - Medida dos halos para os óleos essenciais de alecrim, cravo (talo) e orégano.

Óleo essencial	<i>S. aureus</i> (cm)		<i>E. coli</i> (cm)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Alecrim	1,1	1,1	1,5	1,4
Cravo (talo)	3,2	3,1	1,7	1,7
Orégano	1,0	1,1	3,6	3,5

Fica evidente o potencial antibacteriano dos três óleos essenciais. Porém, o óleo de alecrim teve resultados inferiores tanto para as bactérias gram-positivas quanto para as gram-negativas. Deste modo, o óleo essencial escolhido para a incorporação em membranas de quitosana foi o óleo de cravo por apresentar uma média geral superior aos demais óleos.

De acordo com Silva et al. (2009), o óleo essencial de cravo foi mais efetivo em inibir os *S. aureus* do que *E. coli*, porém, a atividade bacteriostática foi constatada para os dois micro-organismos. A atividade antibacteriana se deve aos terpenos, e a eficácia do óleo essencial de cravo está associada ao eugenol presente em 90% na amostra deste trabalho, este alto teor de eugenol se deve ao fato do óleo ser proveniente do talo do cravo. Segundo de Oliveira et al. (2009) o talo é a região da planta com maior concentração de eugenol. Figura 3.

Figura 3 - Resultado do método de difusão em ágar para o óleo essencial de cravo (talo): a) *Staphylococcus aureus*; b) *Escherichia coli*.



5.3 Análise gravimétrica

A capacidade de incorporação de óleo na membrana foi quantificada pela pesagem do óleo residual presente na placa de Petri após a secagem. Esta análise gravimétrica foi realizada em vinte e cinco repetições, e destas repetições foi feita uma média do peso de óleo residual. Levando em consideração a densidade do óleo essencial de cravo que é de $1,053\text{g/cm}^3$ à temperatura de 25°C , a partir do óleo remanescente em cada placa obtivemos o volume de óleo incorporado em cada membrana. A Tabela 8 apresenta a média de volume de óleo incorporado em cada membrana com volume inicial de 30 mL de emulsão.

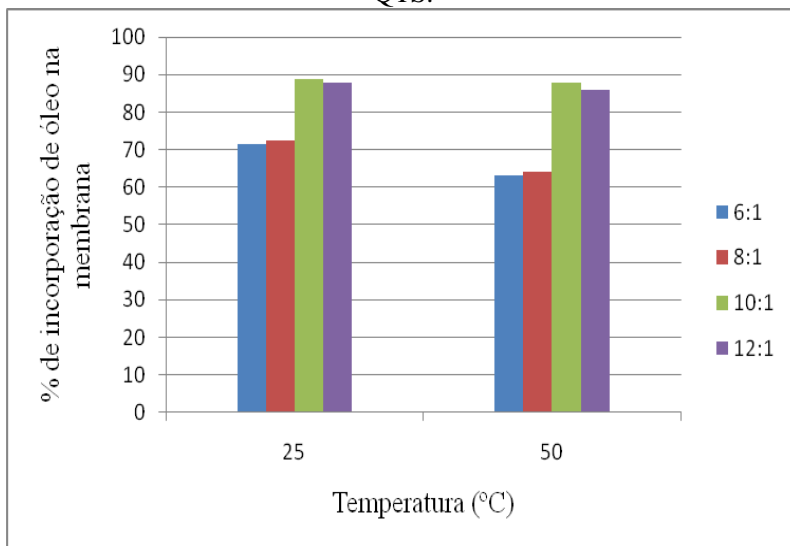
Tabela 8 - Resultados da incorporação de óleo essencial de cravo na membrana de QTS.

Concentração	VQTS* (mL)	Vóleo* (mL)	Média de óleo incorporado			
			25°C		50°C	
			V* (mL)	%	V* (mL)	%
6:1	25,7	4,3	3,08	1,62	2,72	63,255
8:1	26,7	3,3	2,39	2,42	2,12	64,24
10:1	27,3	2,7	2,395	8,70	2,374	87,92
12:1	27,7	2,3	2,019	7,78	1,978	86,0

*VQTS: volume de QTS; Vóleo: volume óleo; V: volume

Através da Tabela 8, percebe-se o elevado teor de óleo não incorporado à membrana nas concentrações de 6:1 e 8:1 chegando a 36%. Nestas concentrações o percentual de óleo remanescente é semelhante entre si à 25°C e a 50°C. Pode-se observar que na concentração de 6:1, a diferença de óleo incorporado nas diferentes temperaturas chega a aproximadamente 8%; o mesmo aconteceu para a concentração de 8:1, o que evidencia a influência da temperatura na formação da membrana. A 25°C o processo acontece lentamente chegando a 48 horas, resultando numa maior incorporação do óleo, Figura 4. Enquanto o processo de secagem das membranas com óleo a 50°C aconteceu em 18 horas.

Figura 4 - Incorporação de óleo essencial de cravo na membrana de QTS.



Ao final da secagem na temperatura de 50°C, observou-se uma quantidade maior de óleo remanescente tanto em cima da membrana quanto em baixo dela, entre a membrana e a placa de Petri, nas concentrações de 6:1 e 8:1. Enquanto, nas concentrações de 10:1 e 12:1, o volume de óleo remanescente é praticamente o mesmo, localizado apenas abaixo da membrana. Esta quantidade de óleo facilita a remoção da membrana da placa de Petri.

A capacidade máxima de incorporação do óleo essencial de cravo na membrana foi de 88,7%, a 25°C, o que aconteceu na concentração de 10:1. Porém, percebe-se que a 25° e a 50°C, os maiores percentuais de incorporação de óleo de cravo acontecem para as concentrações de 10:1 e 12:1. A total incorporação de óleo em 12:1 não aconteceu devido a quantidade mínima de óleo de 0,3 mL que sempre esteve presente no fundo da placa como uma camada de revestimento da mesma.

Percebe-se na Figura 4 que dentre as concentrações testadas ocorre um menor desperdício do óleo essencial em 10:1 e 12:1, sendo estas as concentrações escolhidas para a continuidade do trabalho.

5.4 Análise de diferentes razões de QTS:Óleo de cravo nas membranas

O óleo essencial de cravo possui poder antimicrobiano tanto frente à bactérias do grupo gram-positivas quanto do grupo gram-negativas (COSTA *et al.*, 2011). Neste trabalho o poder antimicrobiano foi avaliado em membranas com duas diferentes concentrações (10:1 e 12:1). E de acordo com a análise gravimétrica a temperatura tem influência na quantidade de óleo que permanece incorporado na emulsão durante a secagem. A Tabela 9 apresenta a influência destes fatores na atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar das membranas de QTS:Óleo.

Tabela 9 - Potencial bacteriostático dos filmes de QTS:Óleo obtidos através do planejamento experimental 2².

Ensaio	QTS:óleo	T(°C)	Halo <i>S. aureus</i> (cm)	Halo <i>E. coli</i> (cm)
1	(-) 10:1	(-) 25	2,48±0,03 ^a	2,63±0,04 ^{ab}
2	(-)10:1	(+) 50	2,74±0,6 ^{ab}	2,77±0,18 ^{ab}
3	(+) 12:1	(-) 25	2,59±1,2 ^{ab}	2,75±0,14 ^{ab}
4	(+) 12:1	(+) 50	2,91±0,7 ^b	2,85±0,14 ^{ab}

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, (p≥0,05).

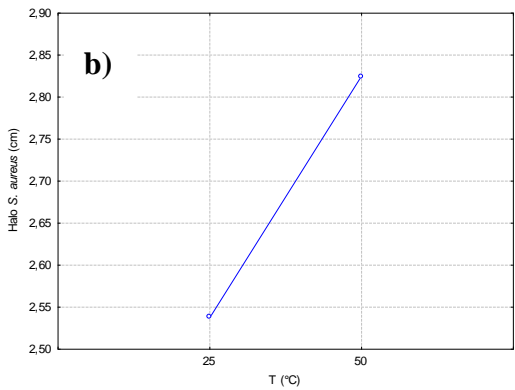
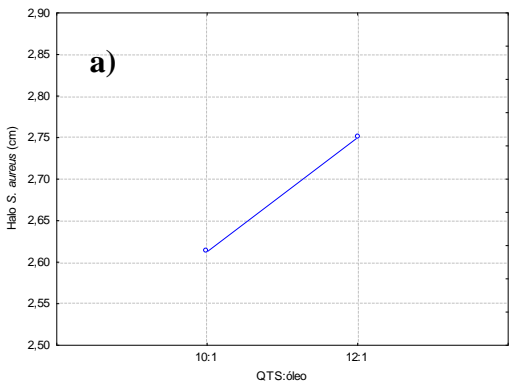
Através da Tabela 9 com nível de significância de 5%, nota-se que para a inibição das células bacterianas de *E. coli* a concentração e a temperatura não influenciaram significativamente no potencial bacteriostático da membrana de QTS:Óleo.

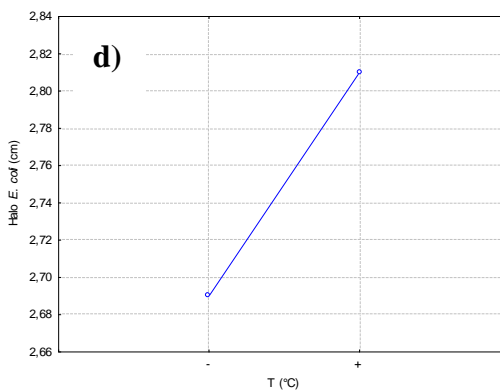
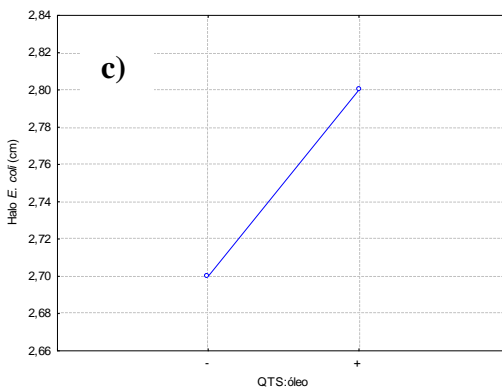
Os gráficos da análise de efeito apresentados na Figura 5 permitem a visualização de qual das variáveis teve efeito mais significativo no potencial bacteriostático através do método de difusão em ágar.

Apesar da temperatura e da concentração não apresentarem diferença significativa para o grupo das bactérias gram-negativas representadas pelas *E. coli*, nota-se que na temperatura de 50°C e na concentração de 12:1 ocorreu uma maior inibição do crescimento destas bactérias. A menor concentração de óleo essencial teve um maior halo, ou seja, uma menor concentração leva a uma maior ação bacteriostática, o que pode acontecer quando: 1) ocorre a imobilização do óleo devido a

formação de micelas dificultando a interação com o meio; e ou 2) o óleo ou algum constituinte deste passa a servir de fonte energética para o desenvolvimento destas bactérias.

Figura 5 - Gráficos da análise do efeito de: a) QTS:Óleo e b) Temperatura sobre o tamanho do halo para *S. aureus* e efeito de: c) QTS:Óleo e d) Temperatura sobre o tamanho de halo para *E. coli*.





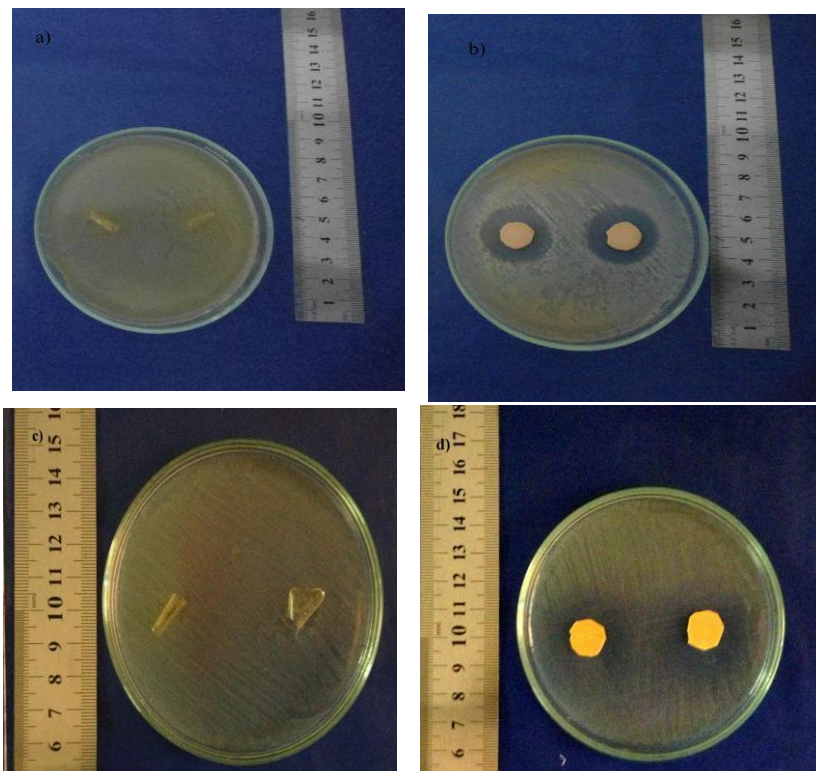
A variável temperatura está intimamente relacionada com a estabilidade da emulsão, a 50°C a membrana leva aproximadamente 18 horas para secar, enquanto à 25°C leva 48 horas. Esta diferença de tempo pode fazer com que a estabilidade da emulsão seja afetada e alguns constituintes tenham seu potencial bacteriostático igualmente afetado, porém para as *E. coli* este impacto não foi significativo.

Na Figura 5, percebe-se que a temperatura causou uma diferença significativa entre os halos de $2,48 \pm 0,03^a$ e $2,91 \pm 0,7^b$, para as células bacterianas gram-positivas representadas pelos *S. aureus*. O que representa que a temperatura tem maior influência do que a concentração na atividade bacteriostática para este grupo de bactérias. Isso pode estar relacionado com a estabilidade da emulsão onde o tempo de secagem pode estar afetando o potencial de inibição de alguns constituintes da emulsão frente às bactérias representantes deste grupo.

Com base nestes resultados os parâmetros foram fixados em temperatura de 50 °C, e concentração 12:1 (Figura 6) para a produção de membranas de QTS:Óleo. Nestas condições, o tempo de preparação da membrana é menor assim como o a quantidade de óleo essencial de cravo, diminuindo o custo da membrana.

Apesar de diversos estudos discutirem o poder antimicrobiano da quitosana, neste estudo, a membrana de QTS pura não apresentou potencial bacteriostático no método de difusão em ágar. Enquanto para a concentração QTS:Óleo 12:1 o halo é maior e fica mais definido frente aos *S. aureus*, Figura 6.

Figura 6 - Resultado do método de difusão em ágar para: a) membrana de QTS e b) membrana de QTS:Óleo 12:1 para *S. aureus* e c) membrana de QTS e d) membrana de QTS:Óleo 12:1 para *E. coli*.



5.5 Teste de concentração bactericida mínima (CBM)

O teste de concentração bactericida mínima (CBM) para a avaliação da capacidade antimicrobiana foi realizado com membrana de QTS e QTS:Óleo nas concentrações e 10:1 e 12:1 preparadas à 50°C. Este teste também foi realizado com as bactérias *S. aureus* e *E. coli* em triplicata. Neste método a placa onde não cresce nenhuma colônia é a correspondente à CBM, portanto a Tabela 10 apresenta os resultados através da presença ou ausência de crescimento de bactérias para cada membrana testada.

Tabela 10 – Resultado do crescimento de bactérias para as membranas.

Membrana	Micro-organismo	Concentração (mg.mL ⁻¹)				
		217	72,5	40	22,5	12,5
QTS	<i>S. aureus</i>	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.
	<i>E. coli</i>	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.
12:1	<i>S. aureus</i>	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Pres.
	<i>E. coli</i>	Aus.	Aus.	Aus.	Pres.	Pres.
10:1	<i>S. aureus</i>	Aus.	Aus.	Aus.	Pres.	Pres.
	<i>E. coli</i>	Aus.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.

O tubo com caldo e bactérias *E. coli* e o tubo com caldo e *S. aureus* quando semeados nas placas de Petri apresentaram resultado incontável comprovando que os micro-organismo estavam ativos e se desenvolveram no meio.

Com a tabela 10 podemos visualizar que a membrana de QTS não conseguiu matar as bactérias gram-positivas nem as gram-negativas em nenhuma concentração, ficando evidente a ausência de potencial bactericida. Apesar de diversos estudos salientarem o poder antimicrobiano da solução de quitosana, carregada positivamente. Este estudo constatou que as membranas de QTS não apresentam capacidade bacteriostática testada através do método de difusão em ágar e nem capacidade bactericida testada através da CBM. O que pode

Para a concentração de 10:1 para *S. aureus* ocorreu crescimento para as concentrações de 12,5 e 22,5 mg.mL⁻¹, nas demais concentrações a membrana matou estas bactérias gram-positivas, desta forma a CBM

de membrana para este grupo é de 40 mg.mL^{-1} , enquanto para *E. coli* foi necessária uma maior quantidade da membrana para matar as bactérias deste grupo gram-negativo, resultando numa CBM de 217 mg.mL^{-1} .

No teste de CBM referente às membranas de QTS:Óleo na concentração 12:1 (v/v) para *E. coli* a concentração mínima para eliminar estas bactérias foi de $22,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que para eliminar as bactérias gram-positivas *S. aureus*, a concentração mínima foi de $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Assim como o teste de halo pelo método de difusão em ágar o teste de CBM comprova o maior potencial antimicrobiano da membrana QTS:Óleo 12:1. No teste de halo esta membrana comprovou seu maior potencial bacteriostático enquanto na CBM a membrana comprovou também seu maior potencial bactericida e em ambos testes, comprovou-se a maior sensibilidade das bactérias gram-positivas *S. aureus* frente à membrana de QTS:Óleo.

A membrana 12:1 com a concentração de $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ representa $0,96 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo não preparado da emulsão QTS:Óleo. Lembrando da análise gravimétrica que apenas 86% deste óleo foi incorporado, temos a quantidade de $0,83 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo nesta membrana. Pode-se afirmar que $0,83 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo essencial de cravo foram responsáveis por eliminar os *S. aureus*. Enquanto $1,49 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo de cravo foram responsáveis por eliminar as *E. coli*.

O teste de CBM acontece em meio líquido e sob agitação em sua primeira etapa permitindo uma maior interação entres os constituintes do meio, da membrana e células bacterianas. Mesmo assim, na membrana com menor concentração de óleo resultou em maior atividade antimicrobiana confirmando uma possível imobilização do óleo pela formação de micelas e/ou algum constituinte do óleo estar servindo de fonte de substrato para o desenvolvimento bacteriano.

5.6 Caracterização da quitosana *in natura*, óleo essencial de cravo e membranas de QTS e QTS:Óleo

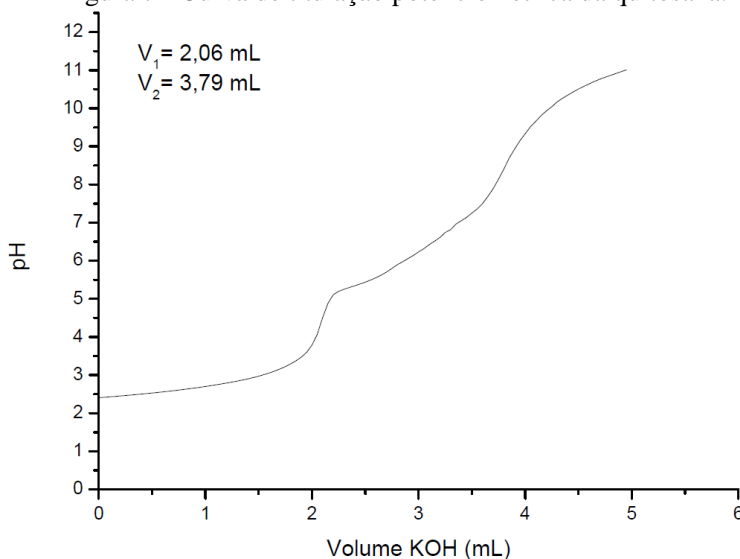
5.6.1 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação é um dos parâmetros capaz de auxiliar na definição do polímero como quitina ou quitosana. Um polímero com grau de desacetilação $\geq 50 \%$ define o material polimérico como quitosana (RINAUDO *et al.*, 2001). A determinação deste parâmetro é fundamental tendo em vista sua influência nas características físico-

químicas como solubilidade, reatividade e viscosidade da quitosana (CAMPANA FILHO, 2007).

A titulação potenciométrica (Figura 8) foi o método escolhido em função de sua simplicidade e precisão. Nesta titulação, utilizou-se o excesso de HCl pra a dissolução do polímero em solução, ocorrendo a protonação dos grupos amino da quitosana.

Figura 7 - Curva de titulação potenciométrica da quitosana.



A Figura 8 mostra a curva obtida através da titulação potenciométrica da solução de quitosana para a determinação do grau de desacetilação da quitosana. Esta curva apresenta dois pontos de inflexão, ou seja, dois pontos de equivalência, sendo o primeiro (V_1) correspondente ao volume de KOH utilizado para a neutralização de HCl que se encontra em excesso na solução; e o segundo (V_2) é o volume de base gasto para a neutralização dos grupos amino do polímero. A diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de KOH requerida para neutralizar apenas os grupos amino protonados do polímero.

Na figura acima é possível observar que os valores de V_1 e V_2 obtidos experimentalmente foram 2,06 e 3,79 mL, respectivamente. Empregando estes valores na Equação 1, com $M = 0,1$ mol L^{-1} e $W = 34$ mg, a quitosana apresentou 81,9% de grau de desacetilação, o que implica dizer que esta tem 18,1% de grupos acetilados no substituinte do

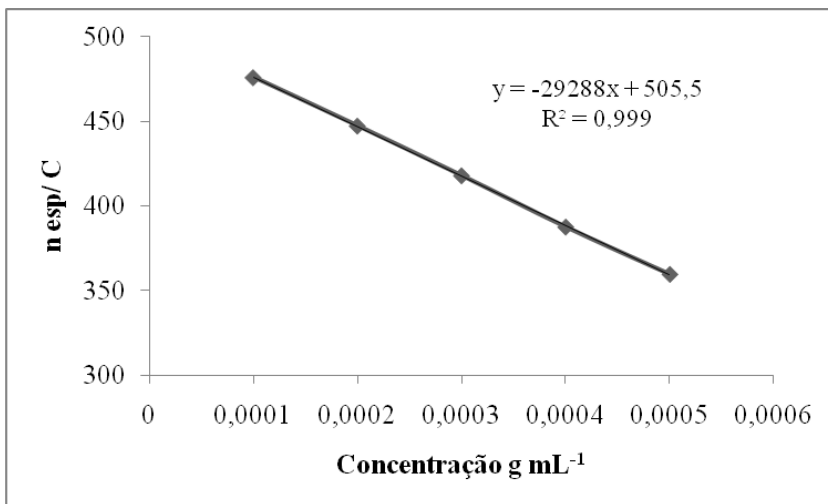
carbono 2 ou que 81,9% dos grupos ligados são amino livres e disponíveis para se ligar aos mais diversos tipos de compostos como, por exemplo, metais, óleos e fármacos.

5.6.2 Massa molar

A medida da massa molar da quitosana é importante, pois este parâmetro interfere diretamente nas propriedades funcionais da quitosana, especialmente na viscosidade, onde quitosana com elevada massa molecular resulta em soluções com elevada viscosidade (SANTOS, 2006).

A relação entre a viscosidade da solução e do solvente puro é denominada viscosidade específica (η_{esp}). Para determinar a η_{esp} , utilizou-se os valores dos tempos de escoamento medidos no viscosímetro e estes resultados foram utilizados no gráfico para a determinação da viscosidade intrínseca, como mostrado na Figura 5.

Figura 8 - Curva da concentração das soluções de quitosana em relação



à viscosidade específica.

Através da equação da reta da Figura 8 tem-se para a extrapolação da concentração de quitosana igual a zero, que a viscosidade intrínseca é de 505,5. Adicionando este valor na Equação 3, a massa molar da quitosana encontrada é de 111,01 kDa.

5.6.3 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

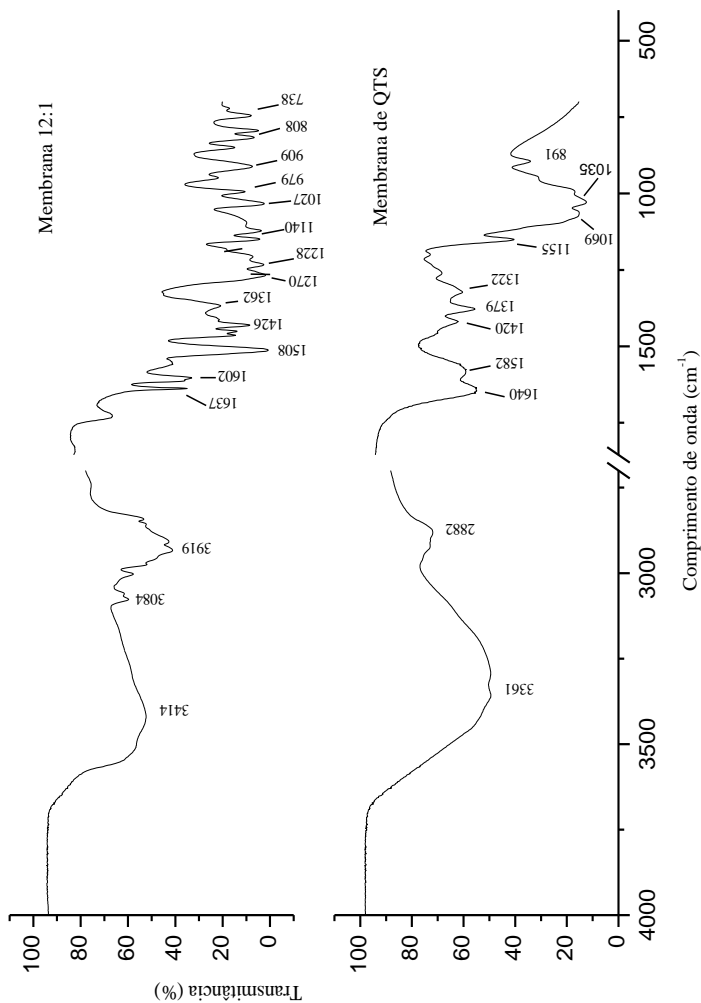
A técnica de FTIR é proposta em muitas referências como uma possível maneira de investigar a interação entre substâncias. Neste estudo, membranas de QTS, QTS:Óleo (12:1) e óleo essencial de cravo, foram analisadas por FTIR para observar a possível interação entre os grupos funcionais das moléculas que compõem essas substâncias. Figura XX.

O espectro de infravermelho das membranas de QTS e QTS:Óleo apresentam um amplo pico de absorção em 3361 e 3414 cm^{-1} que estão associados ao estiramento axial do grupo do grupo O-H, sobreposto à banda de estiramento do grupo N-H, assim como as ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias do polissacarídeo.

As bandas em 2919 cm^{-1} (membrana de QTS) e 2882 cm^{-1} (12:1) são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo C-H assimétrico e simétrico, respectivamente. Uma banda característica da deformação angular do CH_2 aparece na região de 1420 (membrana QTS) e 1426 cm^{-1} (membrana 12:1). As bandas na região de 1640 cm^{-1} a 1602 cm^{-1} correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O, enquanto as bandas de 1582 cm^{-1} (membrana de QTS) e 1508 cm^{-1} (membrana 12:1) correspondem à deformação angular das ligações N-H. A existência dessas duas bandas (C=O e N-H), conjuntamente, indicam a presença de grupos amidas (HOLANDA, 2011).

A banda na região de 1379 e 1362 cm^{-1} são características da vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil (CH_3) do grupo acetamido, dados que confirmam que a quitosana utilizada neste estudo é um produto parcialmente desacetilado (TORRES *et al.*, 2005). As bandas de absorção na região de 1155 e 891 cm^{-1} na membrana de QTS e 1140 e 808 cm^{-1} na membrana 12:1, referem-se ao estiramento de ligações C-O-C; 1069, 1035 e 1027 cm^{-1} representam vibrações de estiramento do grupo C-O que são características da estrutura sacarídica da quitosana (MINCHEVA *et al.*, 2004).

Figura 9 - Espectros de infravermelho para membranas de QTS e QTS:Óleo (12:1 v/v).



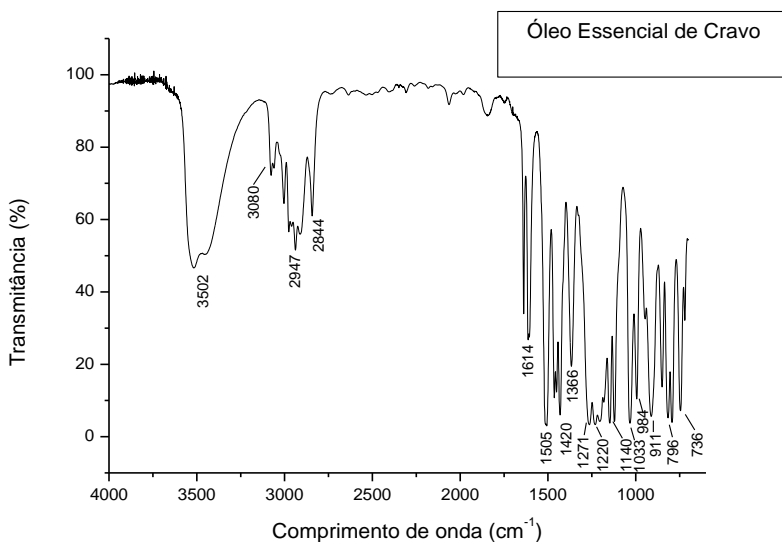
Percebe-se um aumento de bandas entre 1600 a 700 cm^{-1} na membrana de QTS:Óleo em relação a membrana de QTS, estas bandas

referem-se às bandas características do óleo de cravo incorporado, como mostra a Figura 11.

No espectro de infravermelho do óleo essencial de cravo, observa-se que as principais absorções em 3502 cm^{-1} é característica de deformação axial de O-H. As absorções em 2947 e 2844 cm^{-1} indicam o estiramento de ligações C-H, enquanto 3080 cm^{-1} é atribuído ao estiramento de C-H de aromáticos, sendo que esta banda também é encontrada na membrana de QTS:Óleo (Figura 10) em 3084 cm^{-1} , evidenciando a presença de óleo na membrana.

As bandas de 1614 e 1505 cm^{-1} são características da deformação axial de C=C de anel aromático. Absorção em 1420 cm^{-1} corresponde a deformação axial de C=C; e 1366 cm^{-1} é deformação angular plana da hidroxila O-H; 1271 cm^{-1} , refere-se ao estiramento axial C-O; 1220 à 1033 cm^{-1} corresponde à deformação axial de ligações C-O-C. E as bandas entre 911 - 736 cm^{-1} confirmam a deformação angular fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos.

Figura 10- Espectros de infravermelho para o óleo essencial de cravo.



O espectro obtido mostrou-se muito semelhante ao do padrão de eugenol obtido por Monteiro (2008), visto que, o eugenol é o

componente majoritário do óleo essencial de cravo. No espectro de infravermelho da membrana de QTS:Óleo 12:1, Figura 10, percebe-se a presença de bandas específicas da quitosana e do óleo, além do deslocamento de bandas referente aos principais grupos funcionais da quitosana comprovando que houve interação destes grupamentos com o óleo essencial de cravo na formação da membrana.

5.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

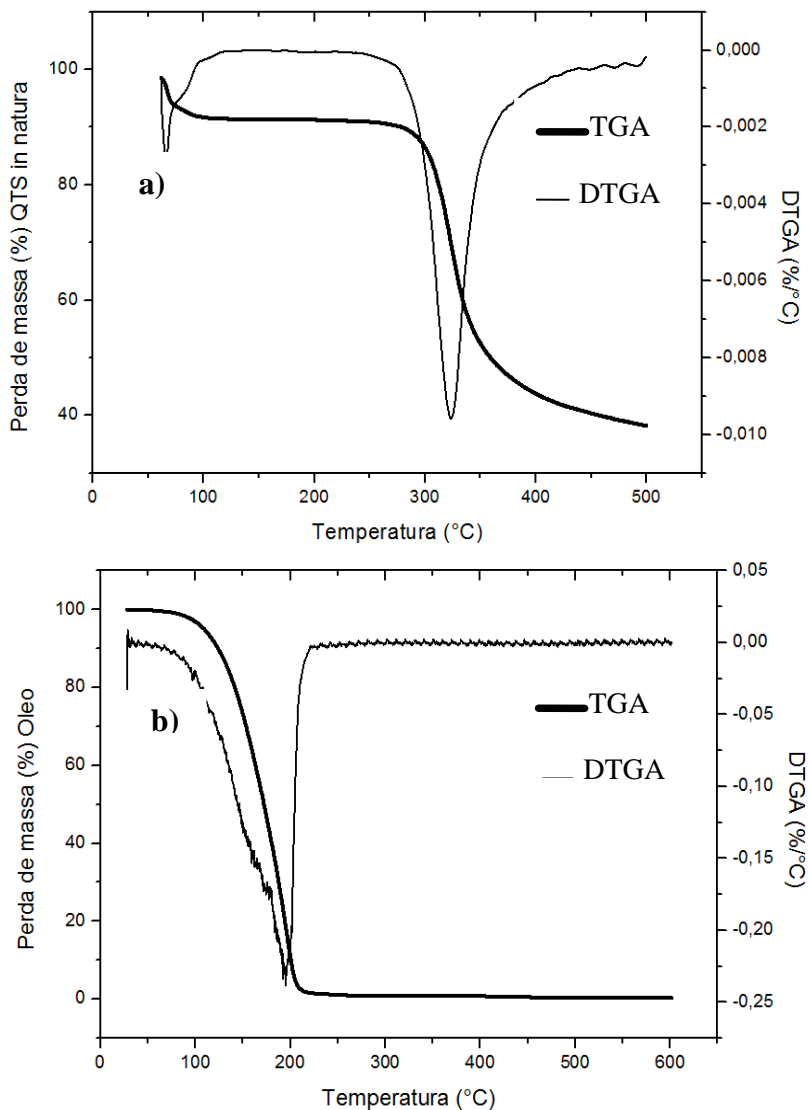
A estabilidade térmica da quitosana *in natura* e do óleo essencial de cravo foi avaliada através da análise de TGA sendo os perfis da análise apresentados na Figura 12. Esta análise é importante para o conhecimento da temperatura a partir da qual ambos começam a perder massa.

A análise de TGA mostra que a quitosana *in natura* possui perfil de degradação térmica em três estágios de perda de massa. O primeiro estágio se refere à perda de água e se iniciou na temperatura de 62,47 °C e seguiu até 186,41 °C, com o pico de perda em 65,94 °C e uma perda de massa de 7,1%.

A segunda decomposição, referente a perda de água ligada no interior da estrutura do polímero, podendo este estágio ser atribuído ao início da degradação da cadeia principal do polímero (PARIZE, 2009). Este estágio teve início em 185,39 °C até 496,49 °C com o pico de perda em 323,08 °C com uma perda de massa de 53,1%. O terceiro estágio referente a desidratação, despolimerização e decomposição pirolítica, resultando na transformação da estrutura polissacarídea em compostos mais simples como água, dióxido de carbono, metano e amônia acontece acima de 500 °C (ANTONINO, 2007).

Na Figura 11b, nota-se que a decomposição do óleo essencial de cravo teve início em 72,81 °C com pico na temperatura de 192,7 e uma perda de massa de 99,5%. E na Figura 13 podemos observar os perfis de perda de massa da membrana de QTS e QTS:Óleo.

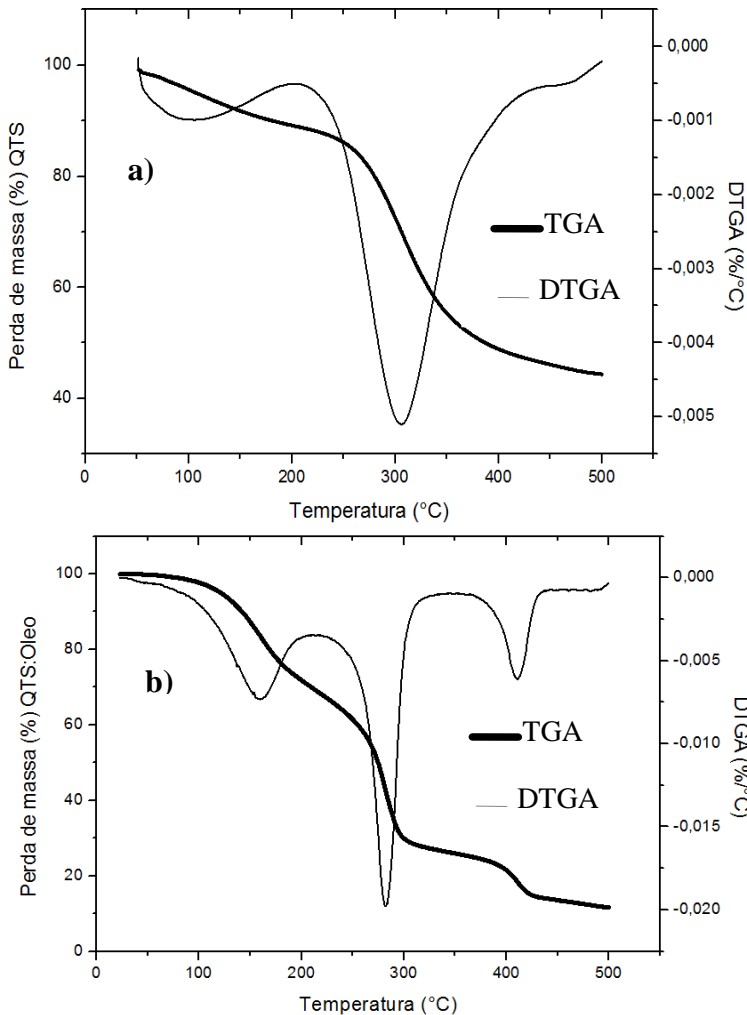
Figura 11 - Curva de análise termogravimétrica para a) quitosana *in natura* e b) óleo essencial de cravo.



Para a Figura 12a, o primeiro estágio que é o de perda de água da membrana de QTS teve início em 58,49 °C e seguiu até 209,51 °C com uma perda de massa de 9,73%. O segundo estágio, correspondente a

perda de material orgânico teve início em 209,51 °C e finalizou em 496,93 °C com uma perda de massa de 44,35%. A análise foi realizada até a temperatura de 500 °C, não contemplando o terceiro estágio.

Figura 12 - Curva de análise termogravimétrica para as membranas de
a) QTS e b) QTS:Óleo.



Na Figura 12b, observa-se a perda de massa da membrana de QTS:Óleo 12:1, onde o primeiro estágio iniciou na temperatura de 30,74 °C até 212,03 °C com um pico em 117,40 °C com uma perda de massa

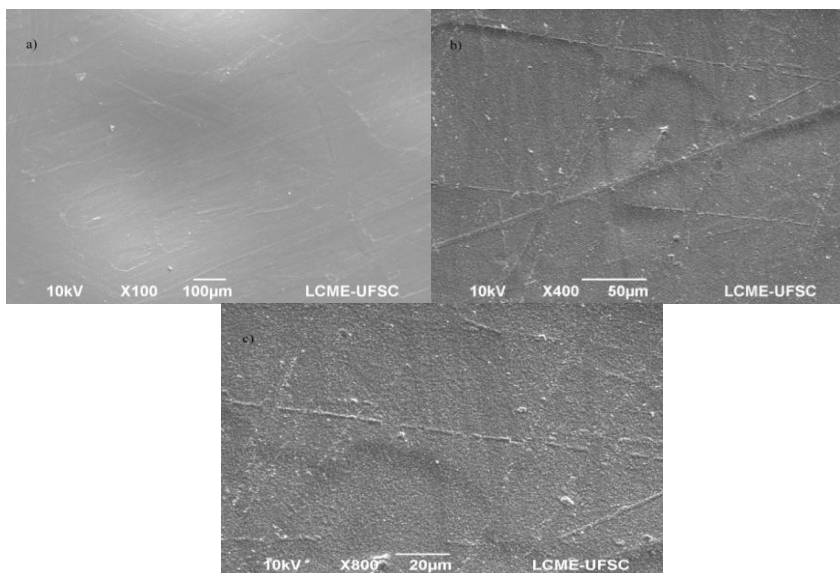
de 30,43%. Na membrana QTS:Óleo a temperatura de perda de massa reduz significativamente devido a presença do óleo essencial de cravo, que é mais volátil. O segundo estágio referente a perda de material orgânico se inicia em 212,03 °C seguindo até 345,42 °C com pico em 256,42 °C com perda de massa de 43,36%. O terceiro estágio referente a perda de material inorgânico tem início em 344,75 °C, finalizando a decomposição em 497,30 °C com uma perda de massa de 14,51%.

5.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)

O MEV foi realizado para a membrana de QTS e membrana de QTS:Óleo 12:1 com a finalidade de comprovar a incorporação do óleo essencial de cravo na membrana. As imagens da membrana de QTS foram obtidas com aumentos de 100, 400 e 800 vezes, Figura 14, apresentando uma superfície com presença de eventuais bolhas e riscos, estes últimos provenientes das ranhuras que podem ter ocorrido no processo de formação da membrana, ou na retirada destas da placa de Petri.

De acordo com Assis et al. (2003) estes pontos mais claros encontrados ao longo da membrana correspondem a aglomerados de cadeias poliméricas resultantes da interação em meio aquoso e da subsequente deposição conjunta sobre o substrato sólido.

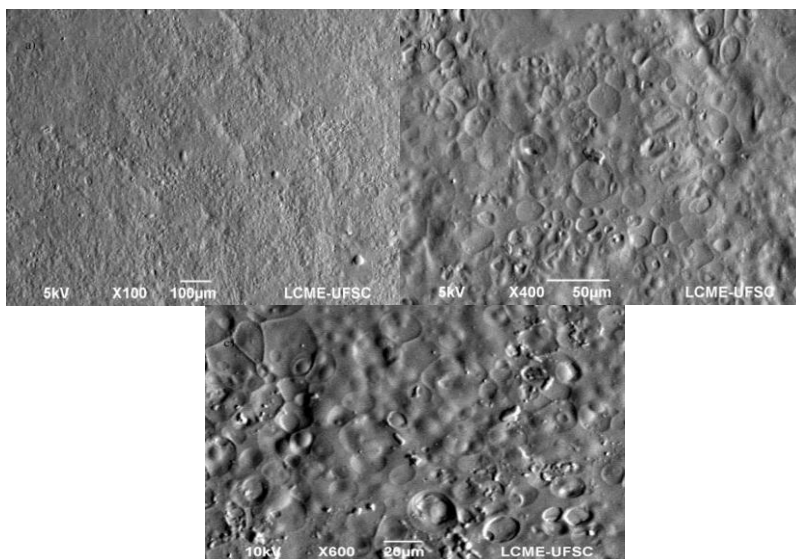
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da membrana de QTS.



As imagens obtidas da membrana de QTS:Óleo 12:1, já apresentam maior porosidade e rugosidade no aumento de 100 vezes (Figura 15). Características da morfologia que ficam ainda mais evidentes nos aumentos de 400 e 600 vezes, nota-se também, a presença de vesículas nestes aumentos. Estas vesículas presentes na superfície da membrana podem se romper facilmente liberando o óleo essencial de cravo presente.

A membrana QTS:Óleo exibe uma estrutura composta com maior rugosidade em relação à da membrana de QTS, tendo relevos maiores. Lorenzini (2009) encontrou uma morfologia semelhante à deste trabalho na preparação de membranas de quitosana contendo condroitina.

Figura 14 - Micrografias da membrana de QTS:Óleo 12:1.



5.7 Avaliação da atividade cicatrizante das membranas de QTS e QTS:Óleo

O tratamento de feridas consiste em restaurar o ambiente fisiológico no leito da lesão, regulando pH, controlando a carga bacteriana, o odor, minimizando a dor e protegendo a pele na região afetada. Estas condições ajustadas irão contribuir para o reparo e restauração da função tecidual (CAETANO, 2012).

Muitos curativos naturais e sintéticos têm sido estudados na busca de estratégias eficazes no processo cicatricial, destacando dezenas de curativos impregnados com diferentes substâncias, desde a vaselina a fatores de crescimento geneticamente produzidos, disponíveis comercialmente (ATTINGER, 2006). Neste estudo, avaliou-se a ação cicatrizante da membrana de QTS e QTS:Óleo. A Tabela 11 apresenta o percentual de redução das lesões dos camundongos nos seguintes grupos: controle negativo (CN), animais que não receberam tratamento; ácido acético (AA), que receberam tratamento com ácido acético 1%; óleo animais que receberam a aplicação do óleo essencial de cravo na concentração 12:1 v/v (12 partes de água destilada e 1 parte de óleo); membrana de QTS e membrana de QTS:Óleo na concentração 12:1 v/v.

Tabela 11 - Porcentagem de redução das lesões dos camundongos.

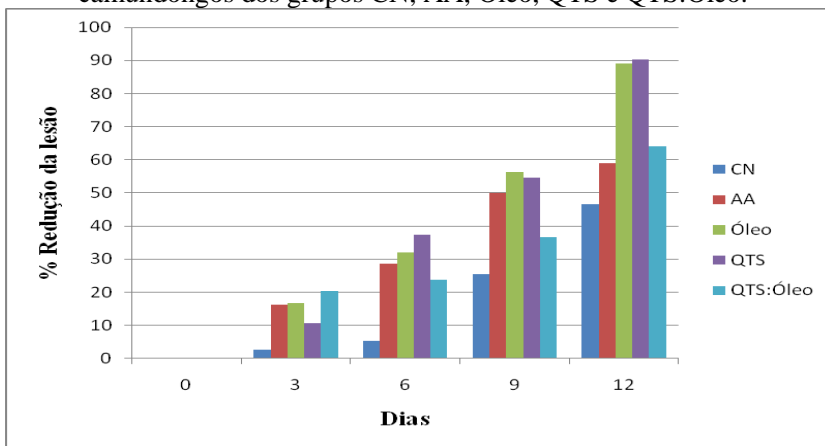
Dias	CN (%)	AA (%)	Óleo (%)	QTS (%)	QTS:Óleo (%)
0	0	0	0	0	0
3	2,7	16,3	16,8	10,6	20,3
6	5,2	28,6	32	37,3	23,8
9	25,5	50	56,3	54,6	36,7
12	46,5	59,1	89,2	90,3	64,2

De acordo com a Tabela 11 a membrana de QTS e o óleo essencial de cravo apresentaram as maiores reduções nas lesões dos camundongos ao final dos doze dias. No terceiro dia, percebe-se que a membrana de QTS:Óleo apresentou maior potencial cicatrizante em relação aos demais grupos. Porém, a velocidade do processo cicatricial para este grupo caiu drasticamente até o sexto dia, Figura 16.

No terceiro dia de tratamento nos animais tratados com óleo, QTS, QTS:Óleo e AA, percebeu-se a formação de coágulos de sangue sobre a área da lesão. De acordo com Caetano (2012), o objetivo desta coagulação plaquetária é impedir a perda sanguínea, proteger o sistema vascular para manter as funções dos órgãos vitais além de, servir de matriz temporária para a migração celular de neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais na área da lesão.

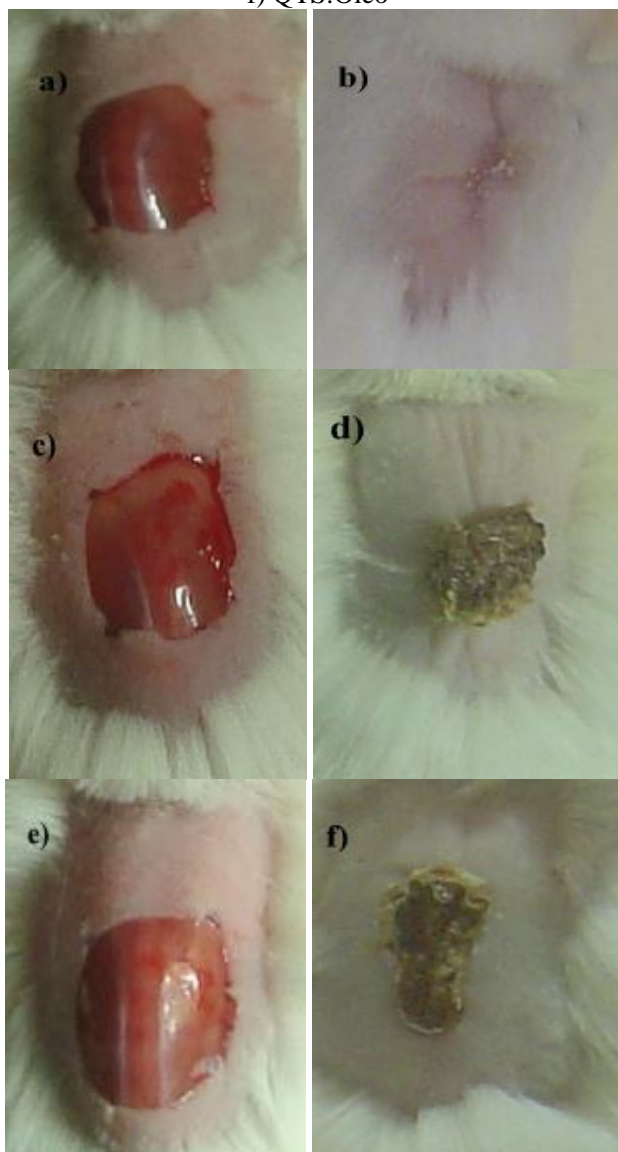
No sexto dia de tratamento, notou-se um aspecto semelhante ao do terceiro dia, porém as bordas estavam irregulares, com o início da fase de formação tecidual. Nesta fase ocorre por meio da proliferação e migração de quiratinócitos da epiderme circunjacente, no sentido das bordas para o centro por intermédio da matriz provisória de fibrina e fibrinectina (LI *et al.*, 2007).

Figura 15 - Representação da média das áreas das feridas dos camundongos dos grupos CN, AA, Óleo, QTS e QTS:Óleo.



No nono dia de tratamento, a crosta presente na área lesionada se apresentou irregular e mais espessa. Já no décimo segundo dia de tratamento, alguns animais do grupo tratados com membrana de QTS e QTS:Óleo ainda apresentavam a membrana aderida a pele e a crosta formada, indicando a forte interação da região lesionada com o curativo. Após a aplicação da anestesia, ao se retirar a membrana, percebia-se uma ferida com aspecto mais claro e liso em relação aos grupos de AA, óleo e CN, indicando uma cicatrização com menores traumas ao tecido epitelial, Figura 17. Enquanto em outros animais destes grupos, a membrana se soltou no decorrer do processo cicatricial.

Figura 16 - Tamanho da lesão nos dias 0: a) animais tratados com QTS, c) Óleo e e) QTS:Óleo; e tamanho da lesão no dia 12: b) QTS, d) Óleo e f) QTS:Óleo



No decorrer deste trabalho, percebeu-se uma grande dificuldade de adesão das membranas nos camundongos. Logo após o processo cirúrgico, em alguns animais as membranas interagiam e permaneciam fortemente aderidas a ferida. Enquanto em outros animais a membrana interagia e logo se soltava. Então, percebeu-se que quanto maior a presença de sangue no local lesionado maior era a interação e adesão das membranas.

Devido ao potencial cicatrizante da quitosana e o potencial antimicrobiano do óleo essencial de cravo, esperava-se uma maior redução das lesões na membrana de QTS:Óleo. O que pode ter acontecido porque a membrana de QTS:Óleo ficou aderida a ferida do animal por menos tempo. As membranas de QTS apresentam caráter higroscópico, percebeu-se que em contato com a pele esta interagiu com o plasma da região lesionada. Já a membrana de QTS:Óleo apresenta menor caráter higroscópico - devido a presença do óleo - fazendo com que a membrana ficasse menos tempo aderida à região lesionada. E a substituição da membrana que soltava por outra, ficava inviável devido a crosta formada na ferida.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios microbiológicos iniciais com diferentes tipos de óleos essenciais (alecrim, cravo e orégano) permitiram concluir que o óleo de cravo apresentou maior capacidade bacteriostática, sendo o óleo escolhido para a continuidade do trabalho.

Com os resultados gravimétricos de incorporação do óleo de cravo na emulsão formadora da membrana de QTS:Óleo, percebeu-se que as concentrações de 10:1 e 12:1 (v/v) resultaram num menor desperdício de óleo.

A avaliação do poder bacteriostático através do método de difusão em ágar da membrana de QTS e QTS:Óleo 10:1 e 12:1: nas temperaturas de 25 e 50°C apresentou que a temperatura teve maior influência do que a concentração na atividade bacteriostática. Portanto, adotou-se a temperatura de 50°C para a continuidade do trabalho.

A membrana de QTS não apresentou atividade bacteriostática pelo teste de halo e nem atividade bactericida nas concentrações testadas no teste de CBM, apontando um número incontável de colônias tanto para *S. aureus* e *E. coli*.

A membrana de 10:1 apresentou sua CBM em 40 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e de 217 mg.mL⁻¹ para *E. coli*. Enquanto a membrana 12:1 apresentou sua CBM em 22,5 mg.mL⁻¹ para *E. coli* e de 12,5 mg.mL⁻¹ para os *S. aureus*. Desta forma a membrana 12:1 apresentou maior capacidade bactericida mínima em relação a membrana 10:1.

Os resultados da quitosana *in natura* nos apresentaram que da Purifarma possui grau de desacetilação de 81,9% e massa molar de 111,01KDa.

A incorporação do óleo essencial na membrana de QTS foi confirmada pelas análises de FTIR, onde apareceram bandas específicas do óleo essencial de cravo além do deslocamento de bandas referente aos principais grupos funcionais da quitosana.

As imagens obtidas pelo MEV também comprovaram a incorporação do óleo através do aparecimento de bolsões ao longo da superfície da membrana.

A capacidade cicatrizante da membrana de QTS chegou a 90,3%, enquanto a do óleo essencial de cravo chegou a 89,2% e da membrana de QTS:Óleo 12:1 foi de apenas 64,2%. O que pode ter ocorrido devido a dificuldade de manter a membrana com óleo aderida à pele do animal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

ALMEIDA, P., P. **Extração de óleo essencial de hortelã (*Metha spicata L.*) com misturas de solventes a alta pressão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2006.

ALMEIDA, T. L. **Desenvolvimento de membrana de quitosana composta de PVAI e quitosana compatível com sistema dermo-epidérmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo – SP, 2009.

ALTERTHUM, Flavio TRABULSI, Luiz Rachid; GOMPERTZ, Olga Fischman. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

ANGIONE, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis L.* **J. Agric. Food Chemical.**, v. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2007.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer e bovino e teste de aceitação.** Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2010.

BROUGHTON, I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: na overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 1-32, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala.** Guatemala: Editorial Universitaria, p. 40, 1999.

CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2012.

COSTA, A. C.; SANTOS, B. H. C.; SANTOS FILHO, L.; LIMA, E. O. Antibacterial activity of essential oils of *Origannum vulgare* L. (Limaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 236-241, 2009.

COSTA JÚNIOR, E. S. **Desenvolvimento de matriz quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2008.

CAMPANA FILHO, S. O.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNIME, R.; LAVALL, R. L. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARVALHO, T. V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para a remoção de metais traço e petróleo.** Dissertação

(Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of the acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.

COQUEIRO, D. S. O. **Atividade de quitosana e da fração polissacarídica de babosa para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomate**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: a fibra do futuro**. PADETEC, Fortaleza, 124 p., 1999.

DANCZUK, M. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2007.

De OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

DIAZ-MAROTO, M. C.; PEREZ, COELLO, M. S.; CABEZUDO, M. D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 23-29, 2002.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharm. Science technology To**, v. 1, n. 6, p. 246-253, 1998.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Review Cubana Estomatology**, v.39, 2002.

FARIA, L. R. D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) – atividades anti-inflamatória e analgésica.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano/UNIFENAS, Alfenas – MG, 2005.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas.** Monografia (Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2009.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 12, p. 3512-3517, 2002.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophyloides* Muell., *Croton zehntneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dematófitos e *Candida* spp isolados de cães.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, 2008.

GARCIA, S. J. F.; **Avaliação do efeito cicatrizando do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2011.

GENENA, A. K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2005.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. *Química* 100, Jan-mar 2006.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2007.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p.241-47, 2009.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. Environmental of chitosan-supported catalysts: catalytic hollow fibers for the degradation of phenolic derivatives. **Separation Science and Technology**, v. 40, p. 633-657, 2005.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

HOLANDA, A. L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização.** Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2011.

HOWLING, G. I.; DETTMAR, P. W.; GODDARD, P. A. et al.; The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. **Biomaterials**, v. 22, p. 2959-2966, 2001.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHIMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M.

Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.5, p.459-464, 2009.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **A. J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, n. [s/n], p. 565-573, 2001.

KIM, C. H.; CHOI, J. W.; CHUN, H. J.; CHOI, K. S. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 387-393, 1997.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091 - 1101, 1998.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 4, p. 2339-2349, 2003.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1091, 1998.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities” **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LINARD, C. F. B. N. **Estudo do efeito antinocepcivo do eugenol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, 2008.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Shitosan kills bactéria through cell membrane damage. **International Journal of Food of Microbiology**, v. 95, p. 147-155, 2004.

LORENZINI, G. C.; CUNHA, M.; LIONZO, M. I. Z.; MUNIZ, E. C.; SILVEIRA, N. P. Preparação e caracterização de filmes de quitosana contendo quitossomas revestidos por condroitina. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Foz do Iguaçu – PR, 2009.

MINCHEVA, R. BOUGARD, F.; PANEVA, D.; VACHAUDEZ, M.; MANOLOVA, N.; DUBOIS, P.; RASHKOV, I. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents, **e-Polymers**, v.58, p.1-11, 2004.

MONTEIRO, O. S. **Caracterização do óleo essencial da Pimenta dióica lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina**. Tese (Doutorado Química Orgânica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2008.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Food Sci. Technol./Lebensm. Wiss. Techno.**; v. 38, p. 565-570, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A.; BELMONTE, M. M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLI, G.; BRUNELLI, M. A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v. 15, p. 1975-1081, 1994.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, p.131-140, 1997.

NCCLIS Testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Acinetobacter* spp. by NCCLS Broth Microdilution and Disk Diffusion Methods pelo NCCLS Microdiluição caldo e difusão em disco. **J Clin Microbiol**, v.42, n. 11, p. 5102-5108, 2008.

OURIVES, E. A. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *P. fluorescens***. Dissertação (Mestrado em

Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 1997.

PELCZARr, M. J. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 2a. Edição. São Paulo: Editora Makron Books Ltda, 1997. vol.1, 524p.; vol.2.

PARK, S. Y.; Marsh K. S.; Rhim J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. **Jounal Food Science**, v. 76, pg. 194–197, 2002.

PELUSO, G.; PETILLO, O.; RANIERI, M.; SANTIM, M.; AMBROSIO, L.; CALABRO, H. D.; AVALLONE, B.; BALSAMO, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. **Biomaterials**, v. 15, p. 1215-120, 1994.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação do potencial sinérgico**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2012.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004.

QIU, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; LI, H.; DONG, J.; WANG, J.; LENG, B.; WANG, X.; FENG, H.; REN, W.; DENG, X. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE**, v.6, n.1, 2011.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G. STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules – American Chemical Society**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan aplications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, N. 1, p. 1-27, 2000.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of acetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR, **Carbohydrate Research**, v.246, p. 331-336, 1993.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p.603-632, 2006.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence os acetic acid concentration on the solubilization os chitosan. **Polymer**, v. 04, n. 25, p. 7029-7032, 1999.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281-285, 1993.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudos dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2002.

SANTOS, C. A. N. S. **Propriedades de filmes de quitosano – influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**. Dissertação (Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro – Pt, 2006.

SANTOS, T. C.; MARQUES, A. P.; SILVA, S. S.; OLIVEIRA, J. M.; MANO, J. F.; CASTRO, A. G.; REIS, R. L. *In vitro* evolution of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan – based membranes. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 218-226, 2007.

SANTOS, F. S.; NOVALES, M. G. M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, p. 803-808, 2007.

SANTURIO, D. F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre Escherichia coli isoladas de suínos, aves e bovino**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2011.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

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.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella enteridis*. **Ciência e Tec. de Alimentos**, v. 30, n.1, 2010.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A.; **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 157, n. 11, 2009.

SILVA, S. S.; LUNA, S. M.; GOMES, M. E; BENESCH, J.; PASHKULEVA, I.; MANO, J. F.; REIS, R.L. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 568-576, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Ed. Da Universidade UFRGS, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001, cap. 19.

SVOBODA, K. P.; DEANS, S. G. A study of the variability of Rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, n. 2, p.81-87, 1992.

TAVARES, J. A. **Projeto, construção, testes e operação de um extrator de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Qupimica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2007.

TENG, W. L.; KHOR, E.; TAN, T. C.; LIM, L. Y.; TAN, S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 305-316, 2001.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts - Aspects of accurate quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 995, n. 1-2, p. 119-125, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRINDADE NETO, C. G. **Membranas de quitosana micro e macroporosas: preparo, caracterização e estudos de permeabilidade**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2008.

THARANATHAN R. N.; KITTUR F. S. Chitin – The undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61–87, 2003

TOMIDA, H.; FUJII, T.; FURUTANI, N.; MICHIHARA, A.; YASUFUKU, T.; AKASAKI, K.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M.; GEBICKI, J.M.; ANKARU, M. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 13, p. 1690 – 1696, 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**. Associação Brasileira de Polímeros: São Carlos. v.15; n.4, p.306-312, 2005.

TORRES, A. A. F. N.; SOUZA, J. M. O.; AMORIM, A. F. V.; LIMA, M. L. M.; ARAÚJO, R. S. Microesferas de quitosana para a utilização como sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. **IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica** - Belém – PA , 2009.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003).

ZHENG, Z. I.; TAN, J. Y. W.; LIU, H. Y.; ZHOU, X. H.; ZIANG, X.; WANG, K.Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, p. 214-218, 2009.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 45-51, 2005.