



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

Kauane Pavan

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS  
DE MEMBRANAS A BASE DE QUITOSANA E XILANA CONTENDO CURCUMINA  
ASSOCIADA A PROMOTOR DE SOLUBILIDADE VISANDO APLICAÇÃO TÓPICA**

Florianópolis/SC

Julho-2022

Kauane Pavan

**Desenvolvimento e Avaliação das Propriedades Físico-Químicas de  
Membranas a Base de Quitosana e Xilana Contendo Curcumina Associada a  
Promotor de Solubilidade Visando Aplicação Tópica**

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

Florianópolis/SC

Julho-2022

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

Pavan, Kauane

Desenvolvimento e Avaliação das Propriedades Físico Químicas de Membranas a Base de Quitosana e Xilana Contendo Curcumina Associada a Promotor de Solubilidade Visando Aplicação Tópica / Kauane Pavan ; orientador, Alexandre Luis Parize, 2022.

127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

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

**Desenvolvimento e Avaliação das Propriedades Físico-Químicas de  
Membranas a Base de Quitosana e Xilana Contendo Curcumina Associada a  
Promotor de Solubilidade Visando Aplicação Tópica**

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

Débora Fretes Argenta, Dr.<sup>a</sup>

UFSC (PPGFAR)

Prof.<sup>a</sup> Camila Fabiano de Freitas Marin, Dr.<sup>a</sup>

UFSC (PPGQ)

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.

UFSC (PPGQ)

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

---

Prof. Giovanni Finoto Caramori, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.  
Orientador

Florianópolis, Julho-2022

## AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe Nilse, que mesmo à distância sempre ofereceram incentivo e apoio durante toda minha trajetória de estudos.

Ao Allison, por toda atenção, carinho e apoio, seja estudando junto para as disciplinas ou na vida compartilhada. Foi a pessoa mais presente em minha vida nos últimos anos e me ajudou a formar um lar.

Aos meus amigos que conheci em decorrência dos estudos na UFSC, William, Luísa e Isabelle, que forneceram conselhos, amizade e a descontração necessária para enfrentar os desafios do dia-a-dia do estudante de mestrado.

Ao meu orientador Professor Alexandre L. Parize, que me acolheu em um novo desafio quando mudei de área de pesquisa e me auxiliou da melhor forma possível durante o evento da pandemia para que eu realizasse meu trabalho com sucesso. Aos colegas do POLIMAT, por terem tornado o espaço de trabalho mais tranquilo, mesmo durante o caos da pandemia. O auxílio de todos para me ensinarem a utilizar os equipamentos do laboratório foi essencial e levarei esse conhecimento para a vida profissional.

À Giovana C. Bazzo e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hellen Karine Stulzer, pelo auxílio no desenvolvimento e discussão dos ensaios microbiológicos realizados no LabCQ.

À Débora F. Argenta e Prof. Dr. Thiago Caon pelo suporte no planejamento e execução de todo o trabalho envolvido para a realização dos ensaios de permeação da CUR em pele, no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Farmácia da UFSC.

Ao Professor Ricardo F. Affeldt, por todo apoio e conselhos durante os anos de iniciação científica até no auxílio para utilizar os equipamentos do LACFI durante o mestrado. A trajetória de interesse em trabalhar com fluorescência se iniciou seguindo seus passos.

A todos os funcionários técnicos e professores do departamento de química, que deram suporte para inúmeras análises realizadas neste trabalho, que se provaram inestimáveis para construir este projeto de pesquisa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, e a UFSC pela infraestrutura.

Para registro, cabe ressaltar que este trabalho foi realizado durante o período de pandemia Sars-Covid e restrição de acesso aos laboratórios.

## RESUMO

Este estudo teve como foco o desenvolvimento de membranas compostas por quitosana (QTS) e xilana (XY) incorporadas com curcumina (CUR) e piperina (PIP) para aplicação como curativo de pele. Estudos de interações de CUR, PIP e Pluronic P-123 (P123) foram conduzidos a fim de obter as melhores relações molares de entre os compostos. Análises de DSC mostraram que os ativos se tornam mais amorfos em misturas com P123. A partir de análises fluorimétricas observou-se que no sistema tricomponente ocorre supressão da fluorescência da CUR em solução aquosa. No sistema CUR-PIP se verificou com análises de DSC e fluorimetria que a proporção de 40% de PIP gerou o material mais amorfo e a PIP aumenta a emissão de fluorescência da CUR em solução aquosa, indicando que ocorre interação intermolecular. Em seguida, foram desenvolvidas membranas de QTS e XY em diferentes proporções, evidenciando que a proporção de 80:20 (m/m) apresenta as melhores propriedades físico-químicas, como menor grau de dissolução e maior grau de intumescimento em soluções tampão pH de pele simulado (pHs 5,5 e 7,4), apresentando ainda maior resistência ao *stress* mecânico, mesmo depois de a membrana passar por processo de intumescimento. CUR e PIP foram incorporadas à formulação Q100 e Q80 para avaliar de que forma a interação entre os ativos altera as propriedades das membranas. A partir das caracterizações espectroscópicas verifica-se o sucesso na incorporação dos ativos na matriz poliméricas. Além disso, análises de DSC, difração de raio-X e microscopia PLOM mostraram que a interação entre CUR e PIP resulta em um material onde a CUR está mais amorfa e melhor dispersa. Análises de liberação *in vitro* em solução tampão pH 7,4 em condições *sink* mostraram maior liberação do ativo para membranas contendo PIP, alcançando liberação máxima de até 99% após 50 h, sendo o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas que melhor representou a liberação. Os ensaios de permeação cutânea *ex vivo* em pele humana mostraram que a presença de PIP nas membranas reduziu a permeação da CUR e que a maior retenção do ativo ocorre na epiderme. Ensaios microbiológicos realizados nas membranas Q100 e Q80 contendo CUR e PIP mostraram que as membranas apresentaram atividade antibacteriana para cepas de *P. aeruginosa*, tendo concentração inibitória mínima (MIC) da CUR em 1,15 mg.mL<sup>-1</sup>. Assim conclui-se que a matriz polimérica a base de QTS e XY desenvolvida obtida neste estudo mostra características importantes para a aplicação em tratamentos tópicos.

**Palavras-chave:** CUR. PIP. QTS. XY. Curativo de pele.

## ABSTRACT

This study focused on the development of membranes of chitosan (QTS) and xylan (XY) loaded with curcumin (CUR) and piperine (PIP) for skin treatment applications. First, the interactions of CUR, PIP and Pluronic P123 (P123) were investigated in order to obtain the best molar ratios among the compounds. DSC analysis showed that the active components become more amorphous in mixtures with P123. Fluorimetric analysis revealed that in the three-component system, the fluorescence of CUR is suppressed in aqueous solution. In the system of CUR-PIP, DSC and fluorimetric analysis showed that the proportion of 40 % PIP produces the most amorphous material and that PIP increases the fluorescence emission of CUR in aqueous solution, indicating that an intermolecular interaction occurs. Next, membranes with different proportions (w/w) of QTS and XY mixture were developed. It was found that the 80:20 ratio presented the best physicochemical properties, such as a lower degree of dissolution and a higher degree of swelling in pH buffer solutions of simulated skin (pHs 5.5 and 7.4), showing even higher resistance to mechanical stress, even after the membrane undergoes a swelling process. CUR and PIP were incorporated into the Q100 and Q80 formulations to assess how their interaction alters the properties of the membranes. Spectroscopic characterizations showed the success of incorporating the compounds into the polymer chains. In addition, DSC, X-ray diffraction and PLOM microscopy analysis showed that the interaction between CUR and PIP leads to an amorphous material that is better dispersed in the polymeric matrices. *In vitro* release analysis in a buffer solution with a pH of 7.4 under sink conditions showed a higher release of CUR for membranes containing PIP, reaching a maximum release of up to 99% after 50 h and the kinetic model that best represented the release of CUR was the Korsmeyer-Peppas model. *Ex vivo* permeation tests on human skin showed that the presence of PIP in the membranes reduced the permeation of CUR and the greatest retention occurred in the epidermis. In microbiological tests performed on membranes Q100 and Q80 containing CUR and PIP, it was found that the membranes showed antibacterial activity against strains of *P. aeruginosa*, with the minimum inhibitory concentration (MIC) of CUR being 1,15 mg.mL<sup>-1</sup>. Thus, it is concluded that the polymeric matrix based on QTS and XY developed in this study shows important characteristics for application in topical treatments.

**Keywords:** Curcumin. Piperine. Chitosan. Xylan. Wound dressing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. (A)</b> Representação da estrutura da pele e <b>(B)</b> esquema de fases de regeneração da pele. ....	18
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da XY extraída de madeira. ....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da QTS. ....	22
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos curcuminóides, sendo (a)CUR, (b)demetóxiCUR e (c)bisdemetóxiCUR. ....	23
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da PIP. ....	25
<b>Figura 6.</b> Representação estrutural do P123 e esquema da formação de micelas através do processo de auto-montagem. ....	27
<b>Figura 7.</b> Representação de uma célula de difusão de Franz utilizada no experimento. ....	44
<b>Figura 8. (A)</b> Espectro de emissão da CUR (0,05 mg.mL <sup>-1</sup> ) na presença de P123 (0,05 mg.mL <sup>-1</sup> ) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso. <b>(B)</b> Gráfico produzido a partir da equação de Stern-Volmer. ....	46
<b>Figura 9.</b> Espectro de emissão da CUR (0,15 mg.mL <sup>-1</sup> ) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso. ....	48
<b>Figura 10.</b> Espectros de FTIR obtidos via pastilha de KBr para <b>(A)</b> componentes puros e <b>(B)</b> misturas de CUR-PIP e P123-CUR-PIP. ....	49
<b>Figura 11.</b> Curvas de DSC de CUR, PIP e P123 puros. ....	50
<b>Figura 12. (A)</b> Curvas de DSC de misturas com composições diferentes (% m/m) de P123 e PIP na dispersão sólida. <b>(B)</b> Variação da temperatura de fusão dos componentes no sistema P123-PIP. ....	51
<b>Figura 13. (A)</b> Curvas de DSC de misturas com composições diferentes (% m/m) de P123 e CUR na dispersão sólida. <b>(B)</b> Variação da temperatura de fusão dos componentes no sistema P123-CUR. ....	51
<b>Figura 14.</b> Espectro de emissão de fluorescência de CUR (0,15 mg.mL <sup>-1</sup> ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso à 25 °C. ....	52
<b>Figura 15.</b> Espectro de emissão de fluorescência de CUR (0,05 mg.mL <sup>-1</sup> ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso à 25 °C. ....	53

<b>Figura 16. (A)</b> Curvas de DSC de misturas físicas de concentrações diferentes de PIP CUR (%m/m). <b>(B)</b> Variação da temperatura de fusão de CUR no sistema co-amorfo. ....	54
<b>Figura 17.</b> Características macroscópicas das membranas com as formulações <b>(A)</b> Q100, <b>(B)</b> Q80; <b>(C)</b> Q60; <b>(D)</b> Q50; <b>(E)</b> Q40 e <b>(F)</b> Q20.....	56
<b>Figura 18.</b> Espectros de UV-Vis para as membranas de QTS pura e das diferentes misturas com XY. ....	57
<b>Figura 19.</b> Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membrana de QTS pura e diferentes composições de QTS e XY. Região de 4000-2000 cm <sup>-1</sup> na imagem da esquerda e região de 1900-700 cm <sup>-1</sup> na imagem da direita. ....	59
<b>Figura 20.</b> Curvas de DSC de <b>(A)</b> XY e membrana de QTS pura, <b>(B)</b> membranas compostas por XY e QTS.....	60
<b>Figura 21.</b> Padrões de XRPD para <b>(A)</b> XY e membrana de QTS pura, <b>(B)</b> membranas compostas por XY e QTS.....	62
<b>Figura 22.</b> Microscopia ótica convencional (A,B e C) e microscopia de luz polarizada (D, E e F) das membranas <b>(A,D)</b> Q100; <b>(B,E)</b> Q80 e <b>(C,F)</b> Q40. As barras em preto indicam tamanho de 200 µm. ....	63
<b>Figura 23.</b> Fotografias das gotas de água adquiridas nos ensaios de ângulo de contato para os compostos puros e membranas de QTS e XY.....	64
<b>Figura 24.</b> Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em pH 5,5 a 37 °C. <b>(A)</b> Todas membranas de QTS e XY analisadas e <b>(B)</b> Aproximação da região das membranas contendo XY. ....	67
<b>Figura 25.</b> Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em pH 7,4 a 37 °C. ....	68
<b>Figura 26.</b> Microscopias SEM obtidas para as membranas secas de QTS e XY com imagens de superfície de secagem (acima) e fratura (abaixo). As escalas utilizadas foram de 50 µm para microscopias de superfície e 10 µm para as de fratura.....	70
<b>Figura 27.</b> Microscopias SEM das superfícies das membranas <b>(A)</b> Q100; <b>(B)</b> Q80 e <b>(C)</b> Q20 para os pHs 5,5 (cima) e 7,4 (baixo). As escalas utilizadas são de 50 µm..	71
<b>Figura 28.</b> Ensaio de tensão vs deformação para as membranas de QTS e XY nas condições <b>(A)</b> secas ambientadas a 58% de umidade e <b>(B)</b> intumescidas em meio fisiológico simulado de pH 7,4.....	72

<b>Figura 29.</b> Imagens das membranas <b>(A)</b> Q100-CUR; <b>(B)</b> Q100-CUR-PIP; <b>(C)</b> Q80-CUR e <b>(D)</b> Q80-CUR-PIP da superfície de secagem (cima) e da parte inferior (baixo) das membranas.....	76
<b>Figura 30.</b> Espectros de UV-Vis para as membranas <b>(A)</b> de Q100, CUR e PIP e <b>(B)</b> de Q80, CUR e PIP. ....	77
<b>Figura 31.</b> <b>(A)</b> Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membranas de Q100 contendo CUR e PIP. <b>(B)</b> Aproximação do espectro na região de 1800-700 cm <sup>-1</sup> ....	78
<b>Figura 32.</b> <b>(A)</b> Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membranas de Q80 contendo CUR e PIP. <b>(B)</b> Aproximação do espectro na região de 1800-700 cm <sup>-1</sup> ....	79
<b>Figura 33.</b> Curvas de DSC das segundas corridas para <b>(A)</b> Q100-CUR e Q100-CUR-PIP e <b>(B)</b> Q80-CUR e Q80-CUR-PIP. ....	80
<b>Figura 34.</b> Padrões de XRPD para <b>(A)</b> XY, QTS e CUR puros e <b>(B)</b> membranas contendo misturas de CUR e PIP.....	82
<b>Figura 35.</b> Microscopia ótica convencional (parte superior) e microscopia de luz polarizada (parte inferior) das membranas <b>(A,E)</b> Q100-CUR; <b>(B,F)</b> Q100-CUR-PIP; <b>(C,G)</b> Q80-CUR e <b>(D,H)</b> Q80-CUR-PIP. As barras em branco indicam tamanho de 200 µm. ....	83
<b>Figura 36.</b> Fotografias obtidas nos ensaios de ângulo de contato das gotas de água nas superfícies das membranas contendo CUR e PIP. ....	84
<b>Figura 37.</b> Perfil de intumescimento das formulações <b>(A)</b> Q100-CUR e Q100-CUR-PIP e <b>(B)</b> Q80-CUR e Q80-CUR-PIP em função do tempo em pH 5,5 e 7,4 a 37 °C. ....	87
<b>Figura 38.</b> Microscopias SEM de <b>(A,B)</b> fratura e superfície para membranas secas, respectivamente e <b>(C,D)</b> superfície das membranas após intumescimento em pH 5,5 e 7,4, respectivamente. As escalas utilizadas foram de 50 µm para microscopias de superfície e 10 µm para as de fratura.....	89
<b>Figura 39.</b> Ensaios de tensão vs deformação para as membranas <b>(A)</b> Q100 e <b>(B)</b> Q80 enriquecidas com CUR e PIP nas condições secas ambientadas a 58% de umidade.....	91
<b>Figura 40.</b> Ensaios de tensão vs deformação para as membranas <b>(A)</b> Q100 e <b>(B)</b> Q80 enriquecidas com CUR e PIP intumescidas em meio fisiológico simulado de pH 7,4. ....	92
<b>Figura 41.</b> Imagens de amostra da membrana Q80-CUR-PIP antes e após ensaio de liberação de CUR em solução PBS pH 7,4 e 0,5% de Tween 80 (v/v). ....	94

<b>Figura 42. (A)</b> Perfil de liberação da CUR a partir das diferentes formulações de membranas em tampão PBS pH 7,4 contendo 0,5% de Tween 80 (v/v). <b>(B)</b> Aproximação da região de 0-7 h de experimento de liberação da CUR.....	95
<b>Figura 43. (A)</b> Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> ) de CUR pura e mistura de CUR e PIP em diferentes solventes. <b>(B)</b> Aproximação da região de solubilidade de CUR menor que 50 mg.L <sup>-1</sup> .....	98
<b>Figura 44.</b> Quantidade de CUR retida na pele humana após 8 h. Os valores são representados como média ± desvio padrão (n=4). .....	100
<b>Figura 45.</b> Imagens de SEM da superfície de secagem de cima, que teve contato com a pele (à esquerda) e da superfície de secagem de baixo, que teve contato com a câmara doadora (à direita) das membranas <b>(A)</b> Q80-CUR e <b>(B)</b> Q80-CUR-PIP após ensaios de permeação. ....	102
<b>Figura 46.</b> Concentração inibitória mínima (MIC) dos géis filmogênicos de QTS e XY enriquecidos com CUR e PIP determinados <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição.	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Proporção de cada constituinte utilizado no preparo das membranas de QTS e XY. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Composições das formulações de CUR e PIP nas membranas de quitosana e xilana. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Constante de ligação (Kb) de CUR com PIP na presença de P123. ....	47
<b>Tabela 4.</b> Temperaturas de transição vítrea (Tg) encontrados das curvas de DSC das membranas dos componentes puros e de misturas de QTS e XY. ....	61
<b>Tabela 5.</b> Ângulos de contato em água determinados para as membranas de QTS e XY. ....	65
<b>Tabela 6.</b> Grau de dissolução (%) das membranas de QTS e XY em soluções tampão acetato pH 5,5 e fosfato pH 7,4 a 37 °C após 24 h. ....	66
<b>Tabela 7.</b> Propriedades mecânicas das membranas de QTS e XY secas. ....	73
<b>Tabela 8.</b> Propriedades mecânicas das membranas de QTS e XY intumescidas com solução de tampão fosfato pH 7,4. ....	74
<b>Tabela 9.</b> Temperaturas de transição vítrea (Tg) das curvas de DSC das membranas Q100 e Q80 puras e enriquecidas com CUR e PIP. ....	81
<b>Tabela 10.</b> Ângulos de contato determinados para as membranas de QTS, XY, CUR e PIP. ....	84
<b>Tabela 11.</b> Grau de dissolução (%) das membranas Q100 e Q80 contendo CUR e PIP em soluções tampão acetato pH 5,5 e fosfato pH 7,4 a 37 °C após 24 h. ....	86
<b>Tabela 12.</b> Propriedades mecânicas das membranas secas de QTS e XY contendo CUR e PIP. ....	91
<b>Tabela 13.</b> Propriedades mecânicas das membranas intumescidas de QTS e XY contendo CUR e PIP em meio fisiológico simulado de pH 7,4. ....	93
<b>Tabela 14.</b> Ajuste dos pontos experimentais de liberação da CUR para diferentes modelos cinéticos. ....	96
<b>Tabela 15.</b> Solubilidade da CUR pura e com presença de PIP em diferentes solventes. ....	98

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Abs – Absorbância	UFC – Unidade formadora de colônia
ACN – Acetonitrila	UR – Umidade relativa
CUR – Curcumina	UV-Vis – Ultravioleta-visível
DSC – Calorimetria diferencial de Varredura	<i>vs - versus</i>
E% – Elongação em %	XY – Xilana
EM – Elongação máxima	XRPD - Difração de Raio-X de pó de
EtOH – Etanol	$\lambda$ – Comprimento de onda
Fm – Força máxima	$\chi$ – Solubilidade intrínseca
FTIR – Infravermelho com transformada De Fourier	
GI – Grau de intumescimento	
h – Horas	
ME – Módulo de elasticidade	
MIC – Concentração inibitória mínima	
min – Minutos	
<i>P. aeruginosa</i> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
P123 – Plurônico P-123	
PBS – Meio simulado tampão fosfato pH 7,4	
PEO – poli(óxido de etileno)	
PG – Propileno glicol	
PIP – Piperina	
PLOM – Microscopia óptica de luz polarizada	
PPO – poli(óxido de propileno)	
QTS – Quitosana	
rpm – Rotação por minuto	
s – Segundos	
<i>S. aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>	
SEM – Microscopia eletrônica de varredura	

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
1.1. CURATIVOS PARA FERIMENTOS CUTÂNEOS .....	18
1.2. MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS.....	20
1.3. COMPOSTOS ATIVOS NATURAIS .....	22
<b>1.3.1. Curcumina</b> .....	22
<b>1.3.2. Piperina</b> .....	25
1.4. COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. MATERIAIS.....	29
3.2. EQUIPAMENTOS.....	29
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
<b>3.3.1. Interações da PIP em micelas de CUR e Pluronic P123</b> .....	31
3.3.1.1. Estudos de fluorescência .....	31
3.3.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	32
3.3.1.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	32
<b>3.3.2. Estudo de interações da CUR e PIP</b> .....	32
3.3.2.1. Estudos de fluorescência .....	32
3.3.2.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	33
<b>3.3.3. Preparo de membranas compostas por QTS e XY</b> .....	34
3.3.3.1. Preparo das membranas de QTS e XY .....	34
3.3.3.2. Espectroscopia de UV-Vis .....	35

3.3.3.3.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.3.3.4.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	35
3.3.3.5.	Difração de pó por raio-X (XRPD) .....	35
3.3.3.6.	Microscopia óptica com luz polarizada (PLOM).....	36
3.3.3.7.	Molhabilidade por ângulo de contato .....	36
3.3.3.8.	Determinação de grau de dissolução das membranas.....	36
3.3.3.9.	Determinação de grau de intumescimento das membranas.....	37
3.3.3.10.	Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	38
3.3.3.11.	Ensaio de tensão vs deformação .....	38
<b>3.3.4.</b>	<b>Membranas carregadas com CUR e PIP .....</b>	<b>39</b>
3.3.4.1.	Preparo das membranas de QTS e XY contendo CUR e PIP .....	39
3.3.4.2.	Caracterizações das membranas contendo CUR e PIP .....	40
3.3.4.3.	Quantificação de CUR nas membranas por análise fluorimétrica ..	40
3.3.4.4.	Estudo de homogeneidade de CUR nas membranas .....	41
3.3.4.5.	Cinética de liberação in vitro das formulações contendo CUR e PIP .....	41
3.3.4.6.	Estudo de solubilidade de CUR através de análise fluorimétrica ..	42
3.3.4.7.	Ensaio de permeação ex vivo da CUR em pele humana .....	43
3.3.4.8.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição.....	45
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>46</b>
4.1.	INTERAÇÕES DA PIP EM MICELAS DE CUR E P123 .....	46
4.1.1.	<b>Estudos de fluorescência .....</b>	<b>46</b>
4.1.2.	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....</b>	<b>48</b>
4.1.3.	<b>Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....</b>	<b>50</b>
4.2.	ESTUDO DE INTERAÇÕES DA CUR E PIP .....	52

4.2.1.	<b>Estudos de fluorescência</b>	52
4.2.2.	<b>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</b>	54
4.3.	<b>PREPARO DE MEMBRANAS COMPOSTAS POR QTS E XY</b>	55
4.3.1.	<b>Preparo das membranas de QTS e XY</b>	55
4.3.2.	<b>Espectroscopia de UV-Vis</b>	57
4.3.3.	<b>Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b>	58
4.3.4.	<b>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</b>	60
4.3.5.	<b>Difração de pó por raio-X (XRPD)</b>	61
4.3.6.	<b>Microscopia óptica com luz polarizada (PLOM)</b>	63
4.3.7.	<b>Molhabilidade por ângulo de contato</b>	64
4.3.8.	<b>Determinação de grau de dissolução das membranas</b>	65
4.3.9.	<b>Determinação de grau de intumescimento</b>	66
4.3.10.	<b>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</b>	69
4.3.11.	<b>Ensaio de tensão vs deformação</b>	72
4.4.	<b>MEMBRANAS CARREGADAS COM CUR E PIP</b>	75
4.4.1.	<b>Preparo das membranas de QTS e XY contendo CUR e PIP</b>	75
4.4.2.	<b>Caracterizações das membranas contendo CUR e PIP</b>	76
4.4.2.1.	Espectroscopia de UV-Vis	76
4.4.2.2.	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	77
4.4.2.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	80
4.4.2.4.	Difração de pó por raio-X (XRPD)	81
4.4.2.5.	Microscopia óptica com luz polarizada (PLOM)	82
4.4.2.6.	Molhabilidade por ângulo de contato	84
4.4.2.7.	Determinação de grau de dissolução das membranas	85
4.4.2.8.	Determinação de grau de intumescimento	87
4.4.2.9.	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	88

4.4.2.10. Ensaio de tensão vs deformação .....	90
<b>4.4.3. Cinética de liberação <i>in vitro</i> das formulações contendo CUR e PIP</b> .....	<b>93</b>
<b>4.4.4. Estudo de solubilidade de CUR através de análise fluorimétrica .</b>	<b>97</b>
<b>4.4.5. Ensaio de permeação <i>ex vivo</i> de CUR em pele humana .....</b>	<b>99</b>
<b>4.4.6. Morfologia da superfície das membranas após permeação .....</b>	<b>101</b>
<b>4.4.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição .....</b>	<b>103</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>105</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>121</b>

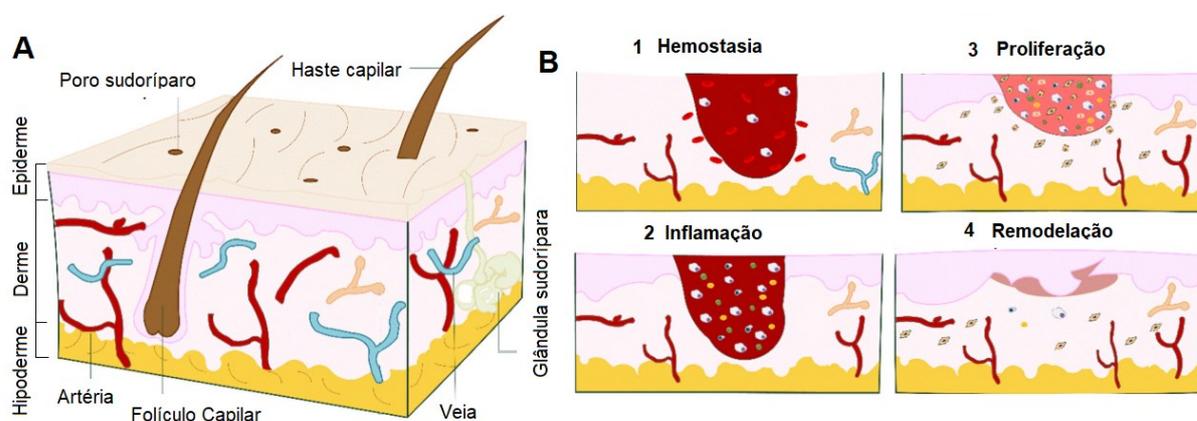
## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. CURATIVOS PARA FERIMENTOS CUTÂNEOS

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% do peso corporal. É composta por três camadas, sendo elas epiderme, derme e hipoderme (**Figura 1**). Cada camada possui diferentes constituintes estruturais e funções. A epiderme e derme, camadas mais externas, são responsáveis pelas principais características da pele. Atuam como a primeira barreira de proteção contra agentes externos e é capaz de realizar regeneração após sofrer danos teciduais.<sup>1</sup>

Ferimentos cutâneos podem causar inúmeros problemas para o paciente, indo desde a imobilidade de membros até danos estéticos que causem transtornos psicossociais. Podem ser classificados como crônicos ou agudos dependendo do tempo de regeneração da pele. Danos agudos tendem a cicatrizar em torno de 8 a 12 semanas e são comumente causados por traumas como lacerações, batidas ou queimaduras. Já danos crônicos causados a pele são mais complexos para serem tratados, levando no mínimo 6 semanas para sua restauração e podem aumentar a extensão do dano ou até mesmo reaparecer após o final do tratamento. Exemplos de danos crônicos são infecções por bactérias ou fungos, diabetes ou até mesmo um tratamento prévio ineficaz de um ferimento agudo. Estima-se que em 2018 ocorreram mais de 305 milhões de tratamentos relacionados a danos na pele no mundo. Esses ferimentos podem ocorrer diversas vezes ao longo da vida, tornando seu tratamento uma parte expressiva na atividade da medicina.<sup>1-4</sup>

**Figura 1.** (A) Representação da estrutura da pele e (B) esquema de fases de regeneração da pele.



Fonte: Figura adaptada de Dias *et al* (2016).<sup>5</sup>

O processo de regeneração da pele ocorre em etapas simultâneas conhecidas como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, conforme ilustrado na **Figura 1**. Com o ferimento da pele, se desencadeiam os processos de hemostasia e inflamação simultaneamente. Na hemostasia as plaquetas do sangue se agregam para que ocorra coagulação local e o sangramento seja sanado. O processo inflamatório utiliza as células constituintes da pele para promover a cicatrização dos tecidos e para inibir o crescimento de micro-organismos externos. A etapa seguinte é a proliferação, em que células epiteliais e fibroblastos são deslocados para os locais danificados para substituírem as células mortas e formarem uma nova matriz. Na última etapa, chamada de remodelação, a matriz é reformulada para um tecido semifuncional, completando o processo de cicatrização.<sup>2,5</sup>

Um tratamento para ferimento cutâneo deve proteger a pele de infecções e auxiliar no processo natural de regeneração, pode-se utilizar curativos ou aplicação tópica de compostos ativos que possuam ação biológica. Curativos como gaze e algodão, podem causar danos extras à pele e retardar o processo de renovação durante manutenções do tratamento. Isso se deve à sua alta adesão e possível contaminação e/ou inflamação por fibras de material que sejam de difícil remoção. Por isso, é necessário encontrar alternativas para os curativos tradicionais que apresentam melhores propriedades e proporcionam tratamento mais eficaz.<sup>6-9</sup>

Uma alternativa muito estudada para solucionar tal problema é o uso de curativos produzidos a partir de matrizes biopoliméricas em forma de membranas ou filmes. Esse tipo de material vem ganhando mais interesse no mundo acadêmico nas últimas décadas, devido a suas propriedades biocompatíveis e possibilidade de melhorar as propriedades físico-químicas das membranas produzidas. Isso pode ser alcançado com adição de agentes reticulantes, produzindo misturas de polímeros diferentes e incorporando fármacos ou compostos ativos à matriz polimérica. Devido a importante aplicação na saúde pública, é relevante pesquisar e desenvolver novas tecnologias que possibilitem melhorias aos tratamentos já existentes.

Por isso, no presente trabalho, se escolheu produzir membranas poliméricas compostas por QTS e XY, que possuem capacidade de formarem matrizes contínuas e maleáveis. No entanto, os polímeros escolhidos possuem reduzidas propriedades antibacterianas e cicatrizantes e a CUR foi optada para ser

incorporada à matriz polimérica, visto a considerável quantidade de estudos que apontam a eficácia do ativo em auxiliar o processo de regeneração da pele e atuar como agente bactericida e anti-inflamatório. Ao se considerar a baixa solubilidade da CUR em água e sua conseqüente baixa biodisponibilidade, pesquisou-se por formas de melhorar este fator. Alguns estudos apontam a melhora de biodisponibilidade da CUR em aplicações via oral e via transdermal ao se adicionar PIP no sistema, sendo sugerido que possa promover a solubilidade da CUR.<sup>6-13</sup>

## 1.2. MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS

Curativos de pele, como membranas biopoliméricas, são uma opção para realizar um tratamento de ferimento de pele, para isso este deve ser biocompatível, tenha capacidade de absorver o vazamento de fluidos e boa aderência à pele, permita a troca de oxigênio, e de preferência apresente ações antioxidantes, antiinflamatórias e antibacterianas.<sup>14-16</sup>

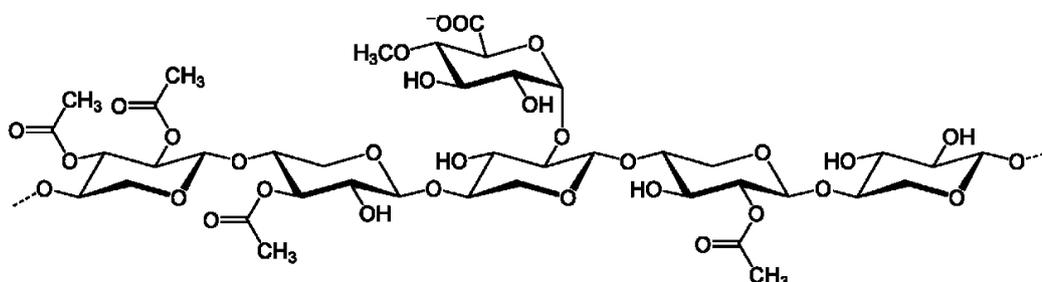
Polímeros naturais, como polissacarídeos, são muito estudados por suas propriedades biológicas e capacidade de formar sistemas de carreamento de compostos ativos na forma de membranas, filmes e hidrogéis. Além disso, apresentam baixa toxicidade quando comparados a polímeros sintéticos, em função de serem biocompatíveis com a matriz extracelular da pele. Tais propriedades se adequam a crescente busca científica pela sustentabilidade nos processos químicos, mais especificamente através da química verde.<sup>14-20</sup>

A classe de polissacarídeos consiste em macromoléculas formadas por monossacarídeos através de ligações glicosídicas. É representada por polímeros naturais como QTS, XY e celulose, dentre outros. São vantajosos no uso para tratamento de feridas, como suplemento alimentar e liberação prolongada de fármacos pois podem ser biocompatíveis e de baixo custo, sendo provenientes de fontes renováveis.<sup>14-20</sup>

A XY (**Figura 2**) é um polissacarídeo do grupo de hemicelulose, sendo a representante mais abundante na natureza. É encontrada na parede celular de plantas e na madeira de árvores. Sua estrutura química varia de acordo com sua fonte vegetal. Pode ser extraída de sabugo de milho e neste caso, é composta por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose e ligações do tipo  $\beta$ -(1,4) com unidades repetidas de 4-*o*-metil-D-glucurônico, L-arabinose e D-xilose, na proporção

2:7:19. É um pó de coloração branca a amarelada e apresenta  $pK_a$  de 3,77, sendo solúvel em água.

**Figura 2.** Estrutura química da XY extraída de madeira.

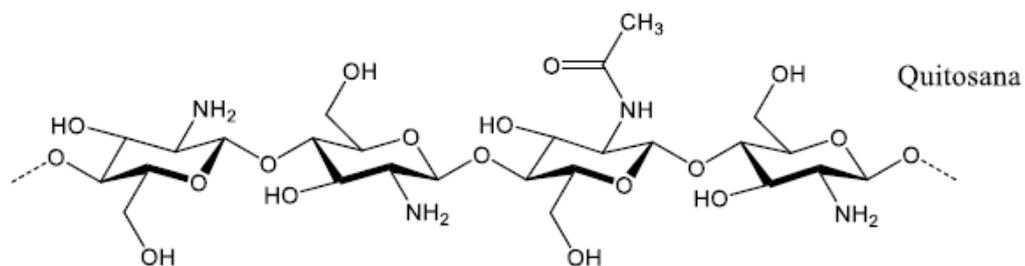


Fonte: Nechita *et al.*(2020)<sup>21</sup>

Possui propriedades favoráveis para ser utilizada como matriz de um sistema para tratamento de pele, pois é biocompatível e biodegradável, não tóxico e têm efeito antitumoral. Apesar de tais propriedades, a XY sozinha não tem capacidade de formar uma matriz contínua através do processo de secagem de solvente. É comum encontrar estudos que utilizam reticulantes ou misturas com outros polímeros para obter o material desejado e realizar a incorporação de fármacos ou compostos ativos.<sup>22-24</sup>

A QTS é um polissacarídeo linear natural com propriedades sensíveis ao pH do meio, podendo apresentar estrutura carregada positivamente ou negativamente devido ao equilíbrio de protonação e desprotonação dos grupos amino. É composto por unidades de  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina, conforme mostra a **Figura 3**. Usualmente obtida através de desacetilação parcial da quitina, considerado o segundo biopolímero mais abundante na natureza, sendo encontrado no exoesqueleto de crustáceos. Tem  $pK_a$  de 6,43 e é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácido cítrico e acético com pHs entre 4,5 a 6,5. Pode apresentar graus de desacetilação e gerar grupos de QTS com diferentes massas molares, podendo afetar suas propriedades físico-químicas.<sup>25-27</sup>

**Figura 3.** Estrutura química da QTS.



Fonte: Aravamudhan *et al.* (2014)<sup>19</sup>

A QTS é muito estudada como biomaterial pois apresenta propriedades interessantes para aplicações biológicas. Estudos apontam que é biocompatível e biodegradável, apresenta atividade antimicrobiana, e pode formar membranas com bioadesão e bom grau de intumescimento. Além disso, seu preparo pode ser realizado de forma simples e sem o uso de solventes orgânicos com alto nível de toxicidade.<sup>25–27</sup>

Membranas a base de QTS e XY já foram descritas na literatura e relata-se que ocorrem interações iônicas entre grupos amino da QTS e unidades de ácido glucurônico da XY, podendo gerar estabilidade para formar o sistema. Estudos reportados por Bush *et al* demonstram que a produção de um sistema polimérico de QTS e XY gera melhores propriedades mecânicas nas membranas, como resistência a *stress* mecânico e alongação máxima e aumento de atividade antioxidante e antibacteriana.<sup>28–31</sup>

Apesar de possuírem propriedades biológicas interessantes para um curativo de pele, sua atividade sinérgica pode não ser suficiente para um tratamento eficaz em pele. Isso ocorre em função da variação nas estruturas dos polímeros proveniente da fonte de obtenção, como massa molar, grau de acetilação, entre outros. Portanto, é relevante utilizar outros compostos químicos que tenham atividade biológica como forma de enriquecimento das membranas, como ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante.<sup>28–31</sup>

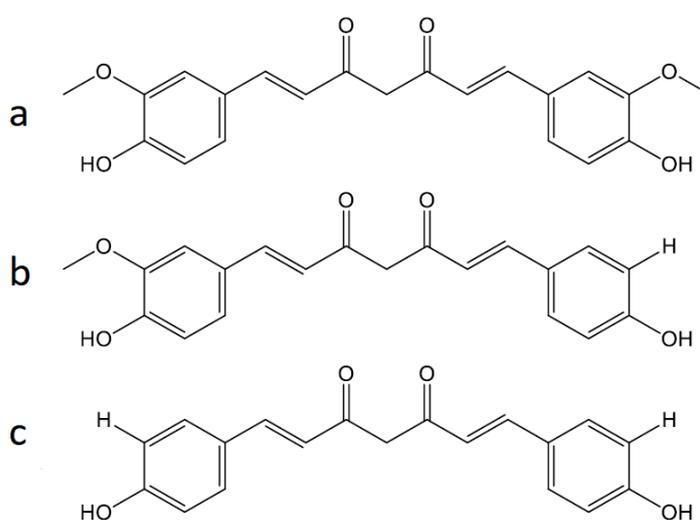
### 1.3. COMPOSTOS ATIVOS NATURAIS

#### 1.3.1. Curcumina

A CUR é um polifenol extraído do rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), sendo o curcuminóide de maior bioatividade. É um pó cristalino de coloração amarela,

insolúvel em água em pHs neutro e ácido e solúvel em etanol, ácido acético e clorofórmio. Apresenta tautomerismo diceto/ceto-enol dependendo do pH, da polaridade do solvente e temperatura do meio, tendo nove possíveis estruturas. Possui coeficiente de partição (LogP) de 3,2 e apresenta 3 diferentes pKas com valores entre 7,8 e 11,12. Os curcuminóides representam 3-5% da massa do rizoma da cúrcuma, sendo compostos por CUR (77%), demetóxiCUR (17%), e bisdemetóxiCUR (3%), conforme representado na **Figura 4**.<sup>10,13,28,32</sup>

**Figura 4.** Estrutura dos curcuminóides, sendo (a)CUR, (b)demetóxiCUR e (c)bisdemetóxiCUR.



Fonte: Chen *et al.* (2016)<sup>32</sup>

Nas últimas décadas a CUR ganhou amplo interesse científico por suas atividades biológicas e efeitos preventivos para a saúde humana. É utilizada como pigmento, conservante de alimentos e antioxidante em suplementos alimentares. Além disso, tem atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antifúngica, possibilitando aplicação como princípio ativo no tratamento de diversas doenças.<sup>33–35</sup>

Estudos notaram sua capacidade de auxiliar na regeneração da pele em ferimentos quando utilizada de forma tópica. Isso ocorre através do estímulo da formação de granulação, deposição de colágeno, aumento da densidade vascular e proliferação de fibroblastos. Apesar disso, encontra-se dificuldade para utilizá-la em formulações orais ou tópicas. Isso se deve a sua instabilidade química, fotodegradação, alta degradação metabólica, baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade.<sup>33–35</sup>

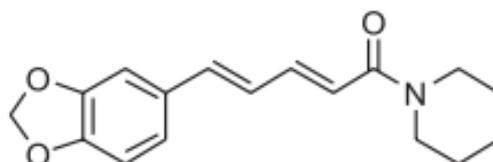
A aplicação tópica pode ser mais eficaz para tratamento de ferimentos de pele, já que a aplicação da formulação se dá localmente e pode ter liberação prolongada. Porém, a pele permite baixa permeabilidade para substâncias externas. Sistemas carreadores e potencializadores de permeabilidade podem ser aplicados para solucionar esse problema. Alguns exemplos utilizados como via de liberação transdérmica são lipossomas, filmes, membranas, micelas poliméricas e nanoemulsões. Estudos conduzidos por Enumo *et al* analisaram membranas poliméricas compostas por QTS e enriquecidas com micelas de Pluronic e CUR. Nestes estudos observou-se que as membranas produzidas apresentaram melhores propriedades térmicas e mecânicas ao se comparar com membranas puras de QTS, além de se observar efetiva liberação da CUR pelas matrizes poliméricas em ensaios *in vitro* e em pele humana *ex vivo*. Hidrogéis compostos por QTS incorporados com micelas de P123, gelatina e CUR foram desenvolvidos e estudados por Pham *et al* para aplicações em tratamento de pele. Foi observado em estudos *in vitro* e *in vivo* realizados em pele danificada de ratos albinos, que os hidrogéis produzidos proporcionaram efetiva liberação da CUR e aceleraram o processo de renegeração celular da pele.<sup>28,33-38</sup>

Adicionalmente ao uso de sistemas carreadores pode-se utilizar agentes promotores de solubilidade para otimizar a incorporação da CUR nas matrizes poliméricas e também o processo de liberação do ativo. Encontra-se estudos que apontam a PIP como um destes agentes promotores de solubilidade. O sistema formado pela interação de CUR e PIP tem despertado maior interesse acadêmico nos últimos anos, pois pode-se ampliar a biodisponibilidade da CUR. Pode-se compreender melhor a interação entre CUR e PIP através de estudos de dinâmica molecular. Sendo possível encontrar estudos descritos na literatura que avaliaram a docagem molecular química das interações dos compostos. Um destes estudos foi realizado por Patil *et al* em que foi possível determinar que a PIP fornece orbitais moleculares e potenciais eletrostáticos ideais para formar forte interação intermolecular com a CUR, podendo competir com a interação existente entre agregados CUR-CUR.<sup>33-37,39</sup>

### 1.3.2. Piperina

A PIP é um alcalóide presente na pimenta-preta (*Piperis nigrum*), sendo um dos responsáveis pelo sabor picante na espécie *Piper*. É um composto cristalino que pode ser incolor ou apresentar coloração amarelada e sua estrutura está representada na **Figura 5**. É pouco solúvel em água e solúvel em etanol, piridina, acetona, éter etílico e clorofórmio. Possui logP de 3,69 e seu pKa é 12,2.<sup>11,12,40,41</sup>

**Figura 5.** Estrutura química da PIP.



Adaptado de Oliveira *et al.* (2014).<sup>11</sup>

Apresenta propriedade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e ação neuroprotetora. Além disso, estudos reportam que a PIP é capaz de potencializar a absorção de diversos compostos ativos, incluindo a CUR, e gerar maior biodisponibilidade do ativo, seja por via oral ou transdérmica. Isso torna seu uso em formulações com a CUR favorável, de forma a obter melhor bioatividade em um tratamento específico.<sup>12,40,41</sup>

Ao realizar pesquisa científica de artigos recentes que tenham avaliado a interação de CUR e PIP em aplicações tópicas se encontram poucos estudos antigos, porém há um crescente número de estudos realizados nos últimos dez anos. Estudos conduzidos por Jantararat *et al* apontaram que a adição de PIP no sistema polimérico composto por dupla camada de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e celulose proporcionou maior permeação *ex vivo* da CUR em pele de rato, alcançando um aumento de 1,89 vezes na taxa de permeação ao se comparar com a membrana sem PIP. Fenômenos semelhantes foram encontrados em estudos realizados por Stasiłowicz *et al.*, em que se mostrou que membranas de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina incorporadas com CUR e PIP proporcionaram aumento de solubilidade da CUR em solução tampão fosfato pH 6,8, assim como aumento da permeação da CUR em membranas biológicas (mucosa gastrointestinal e barreira hematoencefálica).<sup>12,40-42</sup>

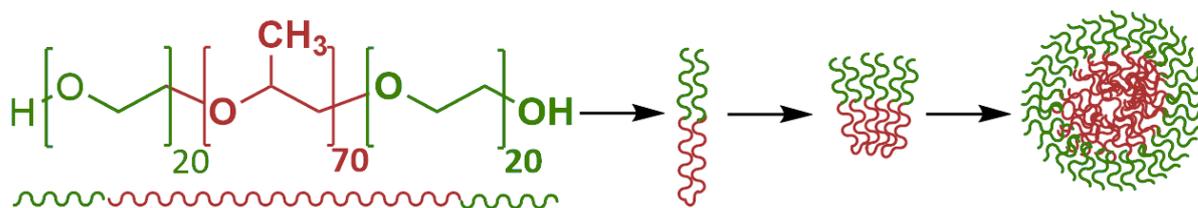
Embora existam efeitos vantajosos no uso combinado desses compostos, há o desafio de formar um sistema que seja eficaz na liberação da CUR para que ocorra sua permeação na pele. Isso ocorre devido a propriedades comuns a eles como: baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e estabilidade química. Desta forma, torna-se necessário usar sistemas carreadores para solucionar esse problema, podendo ser utilizados os mesmos sistemas que os citados acima para a entrega da CUR na pele.<sup>12,40,41</sup>

#### 1.4. COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS

Para contornar problemas de solubilidade em água, biodisponibilidade e estabilidade de compostos ativos lipofílicos a indústria farmacêutica tem como opção o uso de agentes complexantes. Os copolímeros tribloco da marca comercial Pluronic são um dos tipos de polímeros sintéticos mais utilizados para tal propósito, pois podem ser biocompatíveis.<sup>43,44</sup>

Pluronic é marca de copolímeros solúveis em água e não iônicos, compostos por blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno)(PEO) e blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno)(PPO). Possuem estrutura simplificada  $EO_x-PO_y-EO_x$ , em que o comprimento das cadeias  $x$  e  $y$  variam de 2–130 e 16–70 unidades, respectivamente. Apresentam massa molar que pode variar de 1.800-15.000  $g.mol^{-1}$ . Sua estrutura química resulta em propriedade anfifílica, podendo formar micelas em solução aquosa através de auto-montagem com estrutura núcleo-casca ao atingir concentrações micelares críticas (CMC). Um exemplo de Pluronic amplamente utilizado para liberação de compostos ativos é o Pluronic P-123 ( $EO_{20}-PO_{68}-EO_{20}$ ) com massa molar de 5.750  $g.mol^{-1}$ . Em temperaturas experimentais de 25°C a CMC e  $N_{agg}$  de P123 descritos na literatura são de 0,3  $mg.mL^{-1}$  e 86, respectivamente. A **Figura 6** mostra a estrutura do P123 e demonstra esquematicamente como ocorre o processo de auto-montagem.<sup>43-47</sup>

**Figura 6.** Representação estrutural do P123 e esquema da formação de micelas através do processo de auto-montagem.



Fonte: Adaptado de Banerjee *et al.* (2019)<sup>46</sup>

Além disso, são preferíveis a surfactantes comuns por ter menor citotoxicidade e menor CMC. São sensíveis a temperatura do meio em que estão inseridos, apresentando características de gel ou líquido, sendo uma propriedade interessante para aplicar as micelas em condições fisiológicas. Essas micelas possuem um núcleo hidrofóbico e uma casca hidrofílica. Por isso, têm a capacidade de incorporar no núcleo compostos ativos hidrofóbicos, e assim protegê-los dos efeitos de incompatibilidade com o meio biológico e fornecer uma liberação prolongada. Em função disso, são uma ótima forma de melhorar a eficácia de liberação e ação dos compostos ativos em diversos tratamentos médicos.<sup>28,48-52</sup>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar membranas a base de QTS e XY enriquecidas com CUR, P123 e PIP, avaliando o efeito da PIP como potencial promotor de solubilidade da CUR e avaliar a atividade das membranas quando aplicadas na pele visando tratamentos de ferimentos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a interação de CUR e PIP por meio de estudos de fluorescência, espectroscopia de UV-Vis, difração de pó por Raio-X (XRPD) e calorimetria diferencial de varredura (DSC);
2. Analisar a formação de micelas de P123, contendo CUR e PIP através de análises de DSC e análises espectroscópicas como fluorimetria e infravermelho (FTIR);
3. Avaliar as melhores condições de preparo de membranas de QTS e XY para incorporação de CUR e PIP pelo método de evaporação de solvente (*casting*);
4. Caracterizar as membranas desenvolvidas quanto às propriedades mecânicas, morfológicas e térmicas, através de análises de DSC, microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia óptica com luz polarizada (PLOM), ensaio mecânico, XRPD, FTIR, espectroscopia de UV-Vis, ângulo de contato e grau de intumescimento;
5. Determinar a quantidade de CUR incorporada nas membranas produzidas e a homogeneidade do composto ativo através de técnicas analíticas;
6. Estudar cinética de liberação *in vitro* das formulações de CUR e PIP em meio de pH simulado de pele saudável (pH 5,5) e pele lesionada (pH 7,4);
7. Avaliar a permeação e retenção *ex vivo* em pele humana seguindo protocolo ético empregando a célula de difusão tipo Franz, e quantificar a CUR permeada/retida nas diferentes camadas da pele por fluorescência utilizando curva analítica validada;
8. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das membranas através do método de microdiluição contra cepas de bactérias Gram positiva e negativa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), respectivamente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

Os componentes e solventes envolvidos nos processos de produção das membranas poliméricas e no estudo de interação estão localizados e disponíveis no Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT).

CUR (contendo > 65% de CUR e < 35% de demetóxi e bisdemetóxi-CUR), P123 ( $M_n = 5750 \text{ g.mol}^{-1}$ ) com 99% de pureza, QTS de média massa molar com grau de desacetilação 87% calculada de acordo com Brugnerotto *et al.* (2001)<sup>53</sup> e massa molar viscosimétrica  $M_v = 10,6 \times 10^4$  calculada de acordo com Tanasale *et al.* (2019)<sup>54</sup> (Lote #STBG8451), PIP com 92% de pureza e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. XY com 95% de pureza extraída de pó de sabugo de milho foi adquirida da Shaanxi Iknow Biotechnology Co. Ltd., apresenta massa molar  $M_w = 3265 \text{ g.mol}^{-1}$  determinada por análise de Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) (análise realizada na UFRGS) e possui 61,39% de grupos de açúcares redutores em sua estrutura, sendo determinado por curva de calibração de DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico) através de espectroscopia UV-Vis (ANEXO 1 e ANEXO 2). Acetona, acetonitrila, ácido acético, Ágar TSA, Ágar Cetrimida, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio, etanol, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico e propileno glicol (PG) foram comprados da NEON. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram obtidas da Microbiologics®. Água deionizada foi utilizada em todo o estudo. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico e usados sem purificação prévia.

#### 3.2. EQUIPAMENTOS

Durante a pesquisa utilizou-se diversos equipamentos localizados no laboratório POLIMAT. Quando necessário, foram utilizados equipamentos multiusuários de outros grupos de pesquisa da UFSC, ou solicitou-se análises com a central de análises do departamento de Química e do departamento de Engenharia Química da UFSC.

As análises fluorimétricas foram realizadas em equipamento Cary Varian Eclipse no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI). Para análises espectroscópicas de UV-Vis das membranas utilizou-se o equipamento UV-Vis da

marca Kasuabi B-500 com fibra ótica. As análises térmicas de DSC foram realizadas no calorímetro Q20 da marca TA Instruments. O equipamento utilizado para análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi o modelo IR-PRESTIGE 21 da marca Shimadzu. Já a microscopia óptica com luz polarizada (PLOM) foi feita no microscópio ótico da marca Motic Microscopes, modelo SMZ-168-BL com lente polarizadora acoplada a um sistema de aquisição TCS pro500 e software VMS 3.6. As análises de propriedades mecânicas das membranas foram adquiridas em uma máquina universal de ensaio da marca EMIC, modelo DL2000. Nos testes de grau de intumescimento e de liberação *in vitro* utilizou-se banho termostatizado e com agitação da marca QUIMIS, modelo Dubnof. As análises morfológicas das membranas foram obtidas no laboratório central de microscopia eletrônica (LCME/UFSC) utilizando técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) no equipamento JSM-6390LV da marca JEOL. Para determinar o ângulo de contato de gotas de água nas membranas utilizou-se um goniômetro da marca Ramé-Hart Inst. Co, modelo 250-F1, acoplado a uma câmera para captação de imagem através do software DroplImage na versão 3.54. Os difratogramas de raio-X em pó (XRPD) das amostras sólidas e de membranas foram obtidas em difratômetro da marca Bruker, modelo D2 Phaser e escaneadas com o software APEX2. Para os testes de uniformidade e quantificação das membranas se utilizou um ultrassom de ponteira da marca Qsonica, modelo 125 com ponteira de 6 mm.

Os estudos de permeação *ex vivo* da CUR através das membranas poliméricas foram realizados em parceria com o Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Farmácia da UFSC, utilizou-se células de difusão do tipo Franz acopladas a banho termostatizado com circulação e agitação mecânica da marca Vhtex. Já os ensaios microbiológicos foram realizados em parceria com o Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da UFSC.

### 3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. Interações da PIP em micelas de CUR e Pluronic P123

##### 3.3.1.1. Estudos de fluorescência

Para estudar o efeito gerado da adição de PIP no sistema micelar de CUR e P123 se utilizou de titulação espectrofotométrica através de Fluorímetro em temperatura fixa de 25 °C, conforme adaptação de metodologia proposta por Enumo *et al.* (2019).<sup>20</sup> Preparou-se soluções de trabalho de P123 em água, CUR em etanol e PIP em etanol. O estudo foi realizado com três soluções de trabalho com concentrações distintas de P123, PIP e CUR. Produziu-se soluções com as seguintes concentrações de P123 e CUR: 0,05, 0,10 e 0,15 mg.mL<sup>-1</sup>. Já as concentrações de soluções de trabalho de PIP de cada experimento foram de 3,78 µg.mL<sup>-1</sup>, 7,74 µg.mL<sup>-1</sup> e 11,60 µg.mL<sup>-1</sup>.

O procedimento consistiu na adição de alíquotas fixas de CUR e P123 (20 µL e 400 µL, respectivamente) em cubetas de vidro contendo 2,0 mL de água e sucessivas adições de 20 µL de solução de PIP para obter espectros de emissão da CUR em cada nova concentração até que se atingiu a equivalência molar de 1:1 entre os compostos. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em comprimento de onda de excitação de  $\lambda=426$  nm, fendas de excitação e emissão utilizados foram 5 e 10 nm, respectivamente. As leituras foram feitas de 450 a 650 nm, sendo a região em que somente a CUR emite fluorescência.

Utilizou-se a equação de Stern-Volmer (**Equação 1**) com objetivo de determinar as constantes  $K_b$  e  $n$  de interação estática, conforme a equação abaixo:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = n * \log K_b - n * \log [Q] \quad (1)$$

Em que, [Q] é a concentração de PIP em mol.L<sup>-1</sup>, F é a intensidade de fluorescência absoluta de CUR no comprimento de onda de emissão máximo para cada curva obtida,  $K_b$  é a constante aparente de interação e  $n$  a estequiometria de formação de complexo.<sup>6</sup>

### 3.3.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se da técnica de FTIR para obter dados sobre as interações entre os três componentes da micela. Preparou-se amostras de P123, CUR e PIP puros e misturas de CUR-PIP (50/50 % (m/m)) e CUR-PIP-P123 (15/15/70 % (m/m)). Para a análise da mistura os componentes foram solubilizados em etanol a fim de facilitar a interação entre eles e logo após removeu-se o solvente através de rotaevaporação. Preparou-se pastilhas de KBr e adicionou-se 0,25 % (m/m) de cada componente puro ou mistura para análise. As quantidades foram ajustadas devido a intensidade de absorbância dos componentes estar muito alta e ultrapassar o limite de linearidade do equipamento. As leituras foram realizadas no modo absorbância na faixa de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 60 acumulações.

### 3.3.1.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para investigar as interações de PIP e P123 em estado sólido e poder compará-las com as interações de P123 e CUR, utilizou-se da técnica de DSC. Para tal, preparou-se dois estudos separados (CUR-P123 e PIP-P123), em que se averiguou o desaparecimento ou diminuição dos picos de fusão dos componentes. Preparou-se amostras dos três componentes puros e de diferentes composições das misturas (0-100%), solubilizou-se em acetona e as misturas tiveram o solvente removido através de rotaevaporação. Dessas amostras, utilizou-se de 4-6 mg para realizar cada análise, com temperatura de análise de 0-200 °C e uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> em atmosfera de nitrogênio.<sup>2,3,8</sup>

## 3.3.2. Estudo de interações da CUR e PIP

### 3.3.2.1. Estudos de fluorescência

A interação entre os dois componentes foi analisada através de titulação fluorimétrica para obter isotermas de solubilidade de CUR em PIP e calcular sua solubilidade intrínseca, conforme adaptação de metodologia proposta por Enumo *et al.* (2019).<sup>20</sup> Preparou-se 3 soluções estoques de CUR em etanol (0,05, 0,10 e 0,15  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e 3 soluções estoque de PIP (3,78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 7,74  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 11,60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os estudos foram realizados em 4 temperaturas distintas, sendo 25, 30, 35 e 40 °C e

utilizou-se agitação magnética para homogeneizar as soluções contidas nas cubetas em cada nova adição de alíquotas.

Inicialmente adicionou-se 2,0 mL de água em uma cubeta de vidro e acrescentou-se 20  $\mu$ L da primeira solução de trabalho de CUR. Prosseguiu-se com sucessivas adições de 10  $\mu$ L de uma solução de trabalho de PIP e deixou-se sob agitação por 2 min. para homogeneizar a mistura. A cada nova adição realizou-se uma leitura no fluorímetro. O espectro de fluorescência foi acompanhado de 446 a 700 nm utilizando  $\lambda_{exc}=426$  nm, fendas de excitação/emissão=20/20 e acompanhou-se a emissão em 550 nm, sendo o comprimento de onda de absorbância máxima da CUR em água quando na presença de PIP.

Determina-se a solubilidade em PIP através da intersecção das regiões de interação e de saturação das soluções de trabalho de CUR. O ponto em que ocorre a intersecção entre as duas linhas derivadas dessas regiões informa a solubilidade de dada concentração de CUR a cada de PIP. A solubilidade intrínseca ( $\chi$ ) (mgCUR/mgPIP) para cada temperatura é diretamente proporcional ao valor do coeficiente angular do gráfico dessas concentrações vs a massa de PIP nas leituras específicas.

### 3.3.2.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O estudo da interação entre CUR e PIP em estado sólido foi realizado através de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Inicialmente preparou-se amostra dos compostos puros. Após, preparou-se um sistema de formulação co-amorfa de amostras de CUR e PIP variando as concentrações molares dos compostos de 0 a 100% na mistura. Para produzir o sistema co-amorfo as massas de CUR e PIP foram pesadas e transferidas para um cadinho de porcelana que foi aquecido à 130 °C em estufa de aquecimento até completa fusão dos componentes sólidos.<sup>55</sup> Em seguida, o material líquido contido nos cadinhos foi rapidamente congelado com o uso de banho de nitrogênio líquido para obter a solidificação do sistema de mistura. Dessas amostras, utilizou-se de 3 mg para realizar cada análise no DSC, com temperatura de análise de 0-200 °C e uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> em atmosfera de nitrogênio.

### 3.3.3. Preparo de membranas compostas por QTS e XY

#### 3.3.3.1. Preparo das membranas de QTS e XY

As membranas poliméricas contendo QTS e XY foram preparadas através do método de secagem de solvente (*casting*). Inicialmente, preparou-se uma solução de XY a 2% (m/v) em água. Em seguida preparou-se uma solução viscosa de 2% de QTS (m/v) em solução de ácido acético 1% (v/v).<sup>56</sup> Essa solução permaneceu sob agitação mecânica por 36 h com rotação de 700 rpm para realizar a desacetilação da quitina e obter a solução de QTS desejada. Após, a solução foi filtrada em peneira metálica com 170 *mesh* e abertura de 90  $\mu\text{m}$  e usou-se uma bomba de vácuo para auxiliar no processo de remoção da quitina residual que não foi solubilizada durante a agitação mecânica.

As soluções poliméricas foram pesadas para produzir misturas com porcentagens diferentes de cada componentes, conforme mostra a **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Proporção de cada constituinte utilizado no preparo das membranas de QTS e XY.

Formulações	QTS (%m/m)	XY (% m/m)
Q100	100	0
Q80	80	20
Q60	60	40
Q50	50	50
Q40	40	60
Q20	20	80

Em cada béquer de mistura polimérica de QTS e XY adicionou-se 10 g de etanol para esterilizar a solução e auxiliar no processo de evaporação dos solventes. As soluções foram agitadas por 30 min. para homogeneização do meio líquido. Em seguida, as soluções filmogênicas foram vertidas em placas de Petri de plástico redondas de 14 cm de diâmetro e deixou-se em repouso em superfície plana até completa secagem do solvente. Não foi possível produzir membrana contendo 100% de XY pois a viscosidade do polímero é baixa e a solução ao secar não forma uma matriz contínua como as outras formulações desenvolvidas.

### 3.3.3.2. Espectroscopia de UV-Vis

Realizou-se análise de espectroscopia de UV-Vis para determinar o espectro de absorvância dos componentes puros (Q100 e amostra pura de XY) e avaliar presença de interações intermoleculares entre QTS e XY nas membranas preparadas. As leituras foram realizadas na faixa de 200 a 500 nm com 0,2 nm de intervalo de leitura.

### 3.3.3.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das membranas foram obtidos através da técnica de refletância total atenuada (ATR-FTIR) usando ZnSe como material óptico. As análises foram feitas no modo de absorvância na faixa de 4000 a 700  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 60 acumulações. Com a obtenção desses espectros é possível avaliar deslocamento nos grupos funcionais dos componentes e verificar se há interações químicas entre eles.

### 3.3.3.4. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As membranas foram analisadas através de DSC a fim de obter informações sobre as temperaturas de fusão dos componentes, considerando possíveis deslocamentos ou desaparecimentos dos seus picos devido a interações. Analisou-se também amostras de XY pura. Utilizou-se 5 mg de cada amostra de membrana e transferiu-se para cadinhos de alumínio que foram aquecidos a uma taxa de 10°  $\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  com fluxo de nitrogênio líquido. As amostras passaram por duas corridas pois é necessário realizar a primeira corrida de aquecimento para remover água residual da amostra e apagar a memória térmica. A primeira corrida foi realizada com variação de temperatura de 25 a 145 °C seguindo com a submersão dos cadinhos de alumínio em banho de nitrogênio líquido para realizar *quench cooling*. A segunda corrida foi feita com resfriamento a -10 °C e posterior aquecimento a 250 °C.

### 3.3.3.5. Difração de pó por raio-X (XRPD)

Os difratogramas das membranas de QTS e XY e também dos compostos puros foram obtidos na Central de Análises do departamento de Química da UFSC.

Amostras de cada membrana foram cortadas com perfurador com corte de diâmetro de 2,5 cm para posterior análise. As medidas foram realizadas com tubo de raios X com ânodo de cobre, Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) à temperatura ambiente e os difratogramas foram coletados em varredura  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $40^\circ$ .

#### 3.3.3.6. Microscopia óptica com luz polarizada (PLOM)

A microscopia óptica com luz polarizada (PLOM) pode fornecer informações sobre a morfologia e dispersão dos compostos nas membranas, podendo-se notar a ausência ou presença de partículas cristalinas que geram pontos luminosos na imagem. O fenômeno de birrefringência é o responsável pelo aparecimento dos pontos luminosos no caso de presença de cristais. Esse fenômeno ocorre, pois, os cristais têm índices de refração distintos e isso permite decompor a luz em dois raios de polarização cruzada. A cristalinidade foi baseada na observação visual da birrefringência dos cristais (quando presentes) em comparação com as regiões amorfas não birrefringentes. As análises das membranas foram realizadas colocando amostras em lâminas de vidro e utilizando o suporte do microscópio para movimentar a amostra. As ampliações utilizadas no microscópio para captação de imagem foram de 2,0 e 4,0 cm.

#### 3.3.3.7. Molhabilidade por ângulo de contato

Para determinação de ângulo de contato e hidrofobicidade da superfície das membranas utilizou-se um goniômetro acoplado de uma câmera. Amostras das membranas foram coladas com fita dupla face em lâminas de vidro e foram acomodadas em suporte localizado em frente a câmera. Nessas membranas pingou-se gotas de água, com uma pipeta de Pasteur descartável, separadas a uma certa distância uma das outras. Imediatamente após pingar uma gota sua imagem foi captada e o software realizou 10 medidas de ângulo de contato a cada 1 segundo de exposição do material a gota.

#### 3.3.3.8. Determinação de grau de dissolução das membranas

Realizou-se estudo para avaliar o grau de dissolução das membranas em soluções tamponadas com tampão acetato pH 5,5 e também fosfato pH 7,4. Para tal, amostras de membranas foram cortadas com furador de papel redondo com corte de

diâmetro de 1,5 cm, pesadas em balança de precisão analítica e transferidas para tubos de Falcon contendo 25 mL das soluções tampão. As amostras foram mantidas em banho termostaticado a temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C. O estudo foi feito em duplicata para obter a média dos valores encontrados. Após 24 h de experimento retirou-se as amostras dos tubos, secou-se com papel toalha, deixou-se em dessecador por 48h para remoção de água residual no material e após isso, fez-se nova pesagem em balança. Para calcular o grau de dissolução utilizou-se a **Equação 2** abaixo:

$$\%GD = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2)$$

Em que, GD é o grau de dissolução,  $m_i$  é a massa inicial da amostra da membrana e  $m_f$  é sua massa após 24h.

Dessa forma foi possível determinar o grau de dissolução das diferentes formulações em resposta a meios com pH distintos e observar como os polímeros respondem a esses meios.

#### 3.3.3.9. Determinação de grau de intumescimento das membranas

Estudos de grau de intumescimento das membranas foram realizados para avaliar a capacidade de absorção de água das matrizes poliméricas. Essa propriedade se torna importante quando aplicada a curativos de ferimentos. Pois na situação de presença de feridas ocorre produção de exsudatos e troca de fluídos na pele, tornando-se necessário um material que possa absorver tais fluídos.

O estudo de grau de intumescimento foi realizado gravimetricamente. Inicialmente cortou-se amostras das membranas com um perfurador com corte de diâmetro de 1,5 cm. Essas amostras foram transferidas para béqueres contendo 25 mL de solução tampão de acetato pH 5,5 ou de solução tampão de fosfato pH 7,4. O estudo foi realizado em duplicata e as amostras foram mantidas sob agitação e a temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C em banho termostaticado.

Fez-se pesagem das amostras em intervalos fixos com balança de precisão analítica, sendo que em cada análise as amostras foram secadas com papel toalha para remoção de excesso de umidade e foram devolvidas para o meio de solução tamponada. Inicialmente as amostras foram removidas das soluções a cada 3 min., após 10 min. de estudo passou-se a realizar análises a cada 1 h até que se

completou 4 h de experimento. Realizou mais duas pesagens, sendo após 23 h e 24 h, para determinar a constância das massas das amostras.

O grau de intumescimento foi calculado com a **Equação 3** abaixo:

$$\%GI = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

Em que GI é o grau de intumescimento,  $m_t$  é a massa da amostra em tempo t e  $m_0$  é a massa da amostra no tempo inicial do experimento.

Ao atingir massa constante, as amostras de membranas foram congeladas para posterior liofilização e análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM).

#### 3.3.3.10. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Através de análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi possível obter melhores informações sobre a morfologia das membranas de QTS e XY secas e após estudo de intumescimento nos pHs 5,5 e 7,4. Pequenos cortes das membranas foram colados em *stubs* com fita de carbono. Os *stubs* passaram por processo de recobrimento com camada delgada de ouro com uso de aparelho metalizador. As amostras secas passaram por análise de fratura e de superfície. Já as amostras após intumescimento foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas antes do preparo para análise, a fim de remover água residual nas estruturas poliméricas. Estas tiveram apenas suas superfícies avaliadas. A microscopia foi realizada com voltagem de 10 kV e aproximações de 500x e 1000x.

#### 3.3.3.11. Ensaio de tensão vs deformação

É possível estudar as propriedades mecânicas das membranas poliméricas, como tensão máxima e módulo de elasticidade realizando ensaio de tração vs deformação. Para tal, utilizou-se de analisador mecânico universal com célula de carga TRD21 e capacidade máxima de carga de 50 kgf, de acordo com normas ASTM D882 (2002).<sup>57</sup>.

As membranas produzidas foram cortadas em corpos de prova com uso de molde retangular para ter as medidas de 90 mm de comprimento e 12,3 mm de largura. Determinou-se a espessura de cada corpo de prova em três pontos para obter-se a média. Os corpos de prova foram mantidos em um dessecador fechado a vácuo com atmosfera controlada e umidade relativa de  $58 \pm 5\%$  pelo período de 48

h. A umidade relativa necessária foi produzida adicionando-se solução saturada de brometo de sódio ao fundo do dessecador. Os ensaios foram realizados com ao menos 5 corpos de prova de cada formulação de membrana.

Após análise no equipamento determinou-se a resistência a tração (T) e porcentagem de alongação (E%) através das **Equações 4 e 5** abaixo:

$$T = \frac{F_m}{A} \quad (4)$$

Em que, T é a tensão gerada ao expor as amostras à tração (Mpa), A é a área da seção transversal da membrana (m<sup>2</sup>) e F<sub>m</sub> é a força máxima aplicada quando a membrana rompe (N).

$$E\% = \frac{d_r - d_{inicial}}{d_{inicial}} \times 100 \quad (5)$$

Em que, E% é a alongação (%), d<sub>r</sub> a distância no momento da ruptura (mm) e d<sub>inicial</sub> é a distância inicial de separação das garras (50 mm).<sup>58</sup>

Além das análises das membranas secas estudou-se de que forma as propriedades mecânicas seriam modificadas após o intumescimento dos corpos de prova. Para isso, cada corpo de prova foi deixado por 3 min. submerso em solução de tampão fosfato pH 7,4 e seco em seguida com papel toalha para realização dos ensaios mecânicos.

Dessa forma foi possível determinar as propriedades mecânicas das membranas e comparar a influência do aumento da composição de XY nas membranas de QTS. O software OriginPro 9 foi utilizado para análise dos dados obtidos e a análise de variância unidirecional (ANOVA/teste de Tukey) foi usada para comparações múltiplas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ .

### 3.3.4. Membranas carregadas com CUR e PIP

#### 3.3.4.1. Preparo das membranas de QTS e XY contendo CUR e PIP

As membranas carregadas com CUR e PIP foram preparadas em três etapas. Na primeira etapa produziu-se soluções de mistura de QTS e XY conforme descrito no item 3.3.3.1. Na segunda etapa pesou-se os componentes sólidos CUR e PIP conforme massas descritas na **Tabela 2**, transferiu-se para béqueres e adicionou-se

15 mL de etanol para solubilizar os componentes. A razão mássica entre PIP e CUR foi determinada em 10% de PIP, de acordo com as porcentagens mássicas mais encontradas em estudos científicos e baseadas em análises iniciais realizadas com misturas dos dois componentes.<sup>11,12</sup>

**Tabela 2.** Composições das formulações de CUR e PIP nas membranas de quitosana e xilana.

<b>Membrana</b>	<b>Massa CUR (mg)</b>	<b>Massa PIP (mg)</b>
Q100-CUR	18	-
Q100-CUR-PIP	18	2
Q80-CUR	18	-
Q80-CUR-PIP	18	2

Já na terceira etapa a solução polimérica foi misturada à solução de CUR ou CUR-PIP e deixou-se sob agitação com agitador magnético por 30 min. para homogeneizar o meio e formar a solução filmogênica. Estas soluções foram vertidas em placas de Petri de plástico redondas com 14 cm de diâmetro e deixadas em repouso em superfície plana para até completa secagem do solvente.

#### 3.3.4.2. Caracterizações das membranas contendo CUR e PIP

As membranas de QTS e XY carregadas com CUR e PIP foram caracterizadas por técnica de DSC, FTIR, UV-Vis, XRPD, determinou-se os ângulos de contato e grau de intumescimento e também os ensaios de tração vs deformação, assim como foram feitas as microscopias PLOM e SEM e a determinação de grau de dissolução, de acordo com as descrições contidas nos itens 3.3.3.2 e 3.3.3.4. a 3.3.3.11. As análises de FTIR foram realizadas conforme o item 3.3.3.3., porém fez-se análise dos dois lados da membrana para determinar se há deposição preferencial de CUR em um dos lados.

#### 3.3.4.3. Quantificação de CUR nas membranas por análise fluorimétrica

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi amplamente utilizada para quantificar a CUR nos diversos estudos em que se fez necessário, utilizando-se de metodologia adaptada de Mazzarino *et al* (2010).<sup>59</sup> Curvas de calibração foram produzidas em duplicata para os solventes acetonitrila (ACN), PBS pH 7,4, água,

mistura ACN/PBS/EtOH (50/35/15% v/v) e PBS/Tween80 (99,5/0,5% v/v) no intervalo de faixa linear 0,1 a 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Para ACN as configurações utilizadas foram  $\lambda_{\text{exc}}=416$  nm, fendas de excitação/emissão 5/10 nm e leitura do espectro de emissão de 431 a 700 nm. No caso de PBS puro, água e mistura de solventes ACN/PBS/EtOH usou-se  $\lambda_{\text{exc}}=430$  nm, fendas de excitação/emissão 20/20 nm e leitura do espectro de emissão de 470 a 700 nm. Já para a mistura PBS/Tween80 foi usado  $\lambda_{\text{exc}}=426$ nm, fendas de excitação/emissão 10/10 nm e leitura do espectro de emissão de 446 a 700 nm. Os comprimentos de onda de excitação são diferentes pois estão relacionados ao espectro de absorção da CUR em cada solvente específico.

#### 3.3.4.4. Estudo de homogeneidade de CUR nas membranas

A fim de avaliar a uniformidade da CUR nas membranas pesou-se uma membrana inteira e cortou-se em 4 partes de igual tamanho. Após nova pesagem, as amostras foram transferidas para tubos de Falcon de polietileno e acrescentou-se 25 mL de solução 2% de ácido acético. Colocou-se os tubos de Falcon no suporte de um ultrassom de ponteira para auxiliar na rápida dissolução das membranas. Utilizou-se 20% de potência por 5 min. com a configuração de 5 s ligado e 2 s desligado. Após a solubilização das membranas, as alíquotas de cada amostra foram retiradas e transferidas para um balão volumétrico de 10 mL para diluição com acetona. As soluções diluídas em acetona foram analisadas em fluorímetro utilizando curva de calibração conforme descrito no item 3.3.4.3. Dessa forma, determinou-se as concentrações de CUR em cada amostra e pode-se verificar a uniformidade dos valores encontrados.

#### 3.3.4.5. Cinética de liberação *in vitro* das formulações contendo CUR e PIP

A cinética de liberação controlada *in vitro* de CUR nas membranas foi realizada em meio tamponado com tampão PBS pH 7,4 e para obter-se condição *sink* adicionou-se 0,5% de Tween 80 (v/v) ao meio de dissolução. Amostras em duplicata foram cortadas utilizando perfurador com corte de diâmetro 2,5 cm, pesadas em balança de precisão analítica e transferidas para frascos de vidro âmbar contendo 20,0 mL do meio de dissolução. As amostras foram mantidas em banho termostatizado de  $37 \pm 1$  °C no decorrer do experimento. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram

retiradas de cada frasco em tempos determinados e foram transferidos para cubeta de quartzo contendo 3,0 mL do meio de liberação (branco) para análise de quantificação no fluorímetro. Logo após cada leitura de fluorescência adicionou-se 100 µL de solução PBS/Tween 80 a cada frasco. Nas duas primeiras horas as leituras foram feitas a cada 20 min., após isso passaram a ser feitas a cada 1 h até completar 24 h de experimento.

Os dados obtidos foram ajustados a cinco modelos cinéticos, sendo que para todas as fórmulas abaixo  $F$  representa a porcentagem de liberação do composto ativo e  $t$  o tempo:

$$\text{Ordem zero} \quad F = k_0 * t \quad (6)$$

Em que,  $k_0$  representa a constante de liberação para cinética de ordem zero;

$$\text{Primeira ordem} \quad F = F_{MAX}(1 - e^{-k_1*t}) \quad (7)$$

Em que,  $F_{MAX}$  a fração máxima liberada do ativo em tempo infinito e  $k_1$  a constante de liberação para cinética de primeira ordem;

$$\text{Higuchi} \quad F = k_H * t^{0,5} \quad (8)$$

Em que,  $k_H$  representa a constante de liberação de Higuchi;

$$\text{Korsmeyer-Peppas} \quad F = k_{KP} * t^n \quad (9)$$

Em que,  $k_{KP}$  é constante de liberação que engloba a propriedades geométricas e estruturais da forma de dosagem do composto ativo, indicando o mecanismo de liberação;

$$\text{Peppas-Sahlin} \quad F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m} \quad (10)$$

Em que,  $k_1$  é a constante da cinética Fickiana,  $k_2$  é a constante de cinética de relaxamento do caso II e  $m$  é a constante para um sistema de qualquer geometria que possa inibir a liberação controlada.

Para realizar os cálculos utilizou-se o programa Excel contendo o suplemento DDSolver.<sup>60</sup>

#### 3.3.4.6. Estudo de solubilidade de CUR através de análise fluorimétrica

Para determinar a solubilidade da CUR pura e na presença de PIP em solventes específicos, a serem utilizados no ensaio de permeação do item 3.3.4.7.,

utilizou-se da técnica de espectroscopia de fluorescência. Os solventes analisados foram solução tampão PBS pH 7,4 puro, mistura de solução tampão PBS com 30% de etanol e soluções aquosas de propilenoglicol 30% e 50%. Em frascos de vidro âmbar foram adicionados 10 mg de CUR para cada 5 mL de solução dos solventes e também se analisou misturas contendo 10 mg de CUR e 1 mg de PIP. Os frascos permaneceram sob aquecimento de 37 °C e agitação magnética por 72 h para que se atingisse o equilíbrio de dissolução dos componentes. Logo após a conclusão do experimento, cada solução foi filtrada utilizando-se seringa com filtro hidrofóbico de PTFE (Politetrafluoretileno) com tamanho de poro de 0,22 µm para remover agregados e material insolúvel. A quantidade de CUR solubilizada em cada solvente foi quantificada utilizando curvas de calibração feitas previamente, conforme descrito no item 3.3.4.3.

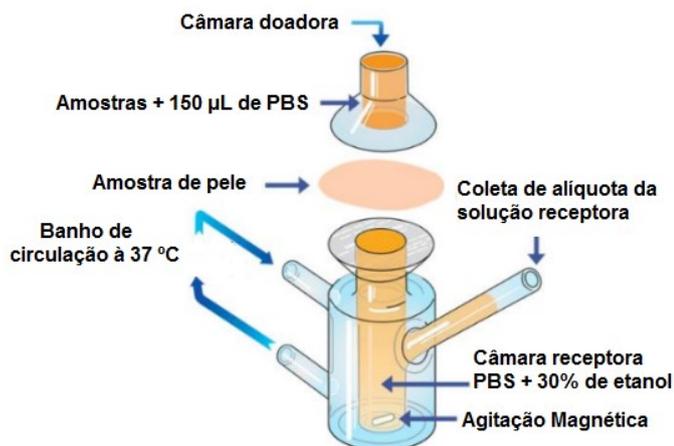
#### 3.3.4.7. Ensaio de permeação *ex vivo* da CUR em pele humana

Utilizou-se de pele abdominal humana para realizar os experimentos de permeação e retenção *ex vivo* através do uso das membranas poliméricas produzidas com CUR. Esta pele foi adquirida através de doação autorizada pelos pacientes de cirurgia plástica abdominal realizadas em um hospital de Florianópolis/SC. O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Universidade através do número CAE 87349418.7.0000.0121. Os ensaios foram realizados 2 vezes, em dias diferentes e com amostras de pele distintas para cada experimento para otimizar a qualidade estatística dos dados obtidos.

Um esquema do sistema utilizado está representado na **Figura 7**. Amostras de membranas contendo CUR e mistura CUR-PIP e soluções controle de CUR e CUR-PIP em mistura de solventes (1,5 mL de solução contendo 50% acetonitrila e 50% de propilenoglicol (PG)) nas mesmas concentrações contidas nas membranas foram acomodadas entre duas câmaras de vidro das células de difusão de Franz. As soluções padrão foram utilizadas como controle positivo no experimento. O teste foi realizado em duplicata para cada tipo de amostra. O fluido receptor em contato com as amostras de membranas foi utilizado como forma de manter condição *sink* de solubilidade e era composto por 70% de solução tampão PBS pH 7,4 e 30% de etanol. As soluções controle e as membranas foram adicionadas de modo a ter contato com o estrato córneo da pele nas câmaras doadoras. Após, adicionou-se

150  $\mu\text{L}$  de fluido receptor nas amostras de membranas para auxiliar no processo de intumescimento das mesmas. As células de difusão de Franz estiveram sob circulação de banho termostatzado em temperatura de 37  $^{\circ}\text{C}$  e agitação do meio contido na câmara receptora com 420 rpm por 8 h.

**Figura 7.** Representação de uma célula de difusão de Franz utilizada no experimento.



Fonte: Figura adaptada de Silva (2008).<sup>61</sup>

Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram retiradas ao fim do experimento para serem analisadas por técnica de fluorimetria com uso de curvas de calibração conforme descrito no item 3.3.4.3. Para determinar o teor de CUR retido na epiderme e derme, as amostras de pele foram mantidas por 12 h em 4,0 mL de solução de acetonitrila em um freezer para extrair a CUR lentamente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 14 kg por 15 min e determinou-se quantidade de CUR através de fluorimetria utilizando curva de calibração de acetonitrila.

O software OriginPro 9 foi utilizado para análise dos dados. A análise de variância unidirecional (ANOVA/teste de Tukey) foi usada para comparações múltiplas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ .

As membranas utilizadas no experimento foram reservadas para posterior análise através de microscopia SEM para avaliar mudanças morfológicas provenientes do contato com a pele humana e com a solução receptora.

### 3.3.4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição

#### **3.3.4.8.1. Reativação das cepas e preparo do inóculo**

Foram empregadas cepas-padrão dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). As culturas bacterianas mantidas em estoque foram repicadas para placas de Petri contendo Ágar TSA (para *S. aureus*) ou Ágar Cetrimida (para *P. aeruginosa*) e incubadas durante 24 h a 37 °C, para verificar a viabilidade dos micro-organismos e a pureza das cepas. Em seguida, uma colônia de cada meio foi transferida para Caldo Müller-Hinton (MH), seguido de incubação durante 24 h a 37 °C. A concentração de cada inóculo foi ajustada com salina estéril, tendo como base o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 9 mL de salina estéril, resultando em uma suspensão com aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, a qual foi empregada nos ensaios posteriores.

#### **3.3.4.8.2. Ensaio de microdiluição**

Para determinação da CIM foram preparadas diluições seriadas das amostras (1:2), nos próprios poços da placa de microdiluição, em duplicata. Para a realização do ensaio adicionou-se, a cada poço da microplaca, 100 µL de cada diluição, 80 µL de Caldo MH e 20 µL da suspensão do micro-organismo. Controles de esterilidade do meio de cultivo e do diluente foram conduzidos em cada ensaio, assim como controles de crescimento bacteriano e de ausência de contaminação nas amostras. As microplacas foram incubadas por 48 h a 37 °C e o crescimento bacteriano evidenciado através de turvação e pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5 % (m/v) com incubação adicional de 2 h, à mesma temperatura. Poços com crescimento celular adquirem a coloração rosa, enquanto que os poços sem crescimento permanecem incolores. A CIM foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento microbiano.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

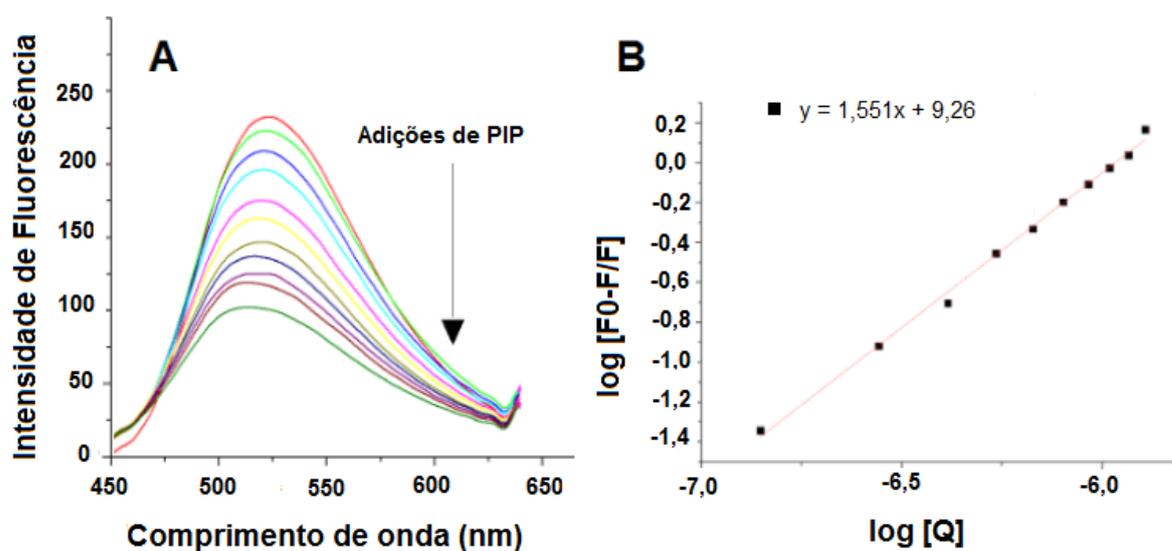
### 4.1. INTERAÇÕES DA PIP EM MICELAS DE CUR E P123

#### 4.1.1. Estudos de fluorescência

O encapsulamento de princípios ativos como CUR pode ser utilizado como forma de melhorar sua solubilidade em água e conseqüentemente sua biodisponibilidade. Pode-se utilizar micelas poliméricas, como as formadas pelo copolímero P123, para realizar o encapsulamento e transporte de CUR em sistemas líquidos ou em membranas sólidas.<sup>45,62</sup>

Para estudar o efeito gerado da adição de PIP na solução contendo P123 realizou-se estudo de fluorescência. Os espectros de fluorescência obtidos estão representados na **Figura 8** e o restante dos espectros desse experimento constam nos **Anexos A3.1** e **A3.2**. Observou-se que o comprimento de onda máximo de emissão de CUR ocorre em 522 nm em meio aquoso, e após sucessivas adições de alíquotas de PIP supressão de fluorescência de CUR. Esse efeito indica que ocorre algum tipo de interação intermolecular entre os componentes. A partir desta observação experimental, seguiu-se o tratamento de dados considerando PIP como um agente de extinção de fluorescência.<sup>45,62</sup>

**Figura 8.** (A) Espectro de emissão da CUR (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) na presença de P123 (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso. (B) Gráfico produzido a partir da equação de Stern-Volmer.



Assumindo um mecanismo de supressão de fluorescência estático, em que ocorre apenas a formação de complexo entre o fluoróforo e o supressor, pode-se aplicar a equação de Stern-Volmer (**Equação 1**) com objetivo de determinar as constantes  $K_b$  e  $n$ . A partir das equações de reta obtidas para cada estudo foi possível determinar as constantes  $K_b$  e  $n$  para o sistema de três componentes, conforme descrito na **Tabela 3**.

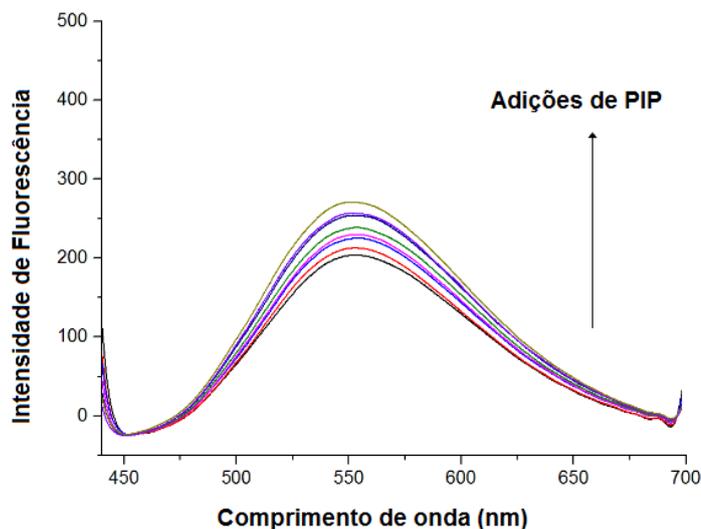
**Tabela 3.** Constante de ligação ( $K_b$ ) de CUR com PIP na presença de P123.

	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>	<b>Ensaio 3</b>
<b>Equação</b>	$y = 1,551x + 9,26$	$y = 1,903x + 10,5$	$y = 1,316x + 6,83$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,996	0,965	0,962
<b>K<sub>b</sub> (L.mol<sup>-1</sup>)</b>	$9,19 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$
<b>n</b>	1,462	1,881	1,316

É possível notar que as constantes  $K_b$  de interação e  $n$  são de mesma grandeza, demonstrando que ocorre a formação de um complexo CUR-PIP em solução com ao menos uma proporção 1:1 entre os compostos.

Para melhor esclarecimento do que ocorre no sistema de três componentes, comparou-se os dados obtidos a um sistema contendo apenas CUR e PIP em solvente aquoso. Escolheu-se as soluções diluídas de maior concentração para maximizar a observação dos efeitos e realizou-se experimento com mesma metodologia que a citada anteriormente. O espectro de emissão está representado na **Figura 9**.

**Figura 9.** Espectro de emissão da CUR ( $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso.



Quando não há presença de P123 no meio aquoso, ocorre deslocamento químico batocrômico, pois a emissão máxima da CUR acontece em 560 nm com baixa intensidade, e conforme se adiciona PIP há deslocamento de emissão para 550 nm, logo o meio se tornou mais apolar. Além disso, ocorre efeito contrário ao estudo anterior, pois a intensidade de emissão é gradativamente aumentada, sugerindo uma melhora na disponibilidade de moléculas de CUR em água, gerada pela interação com PIP.<sup>1,3</sup>

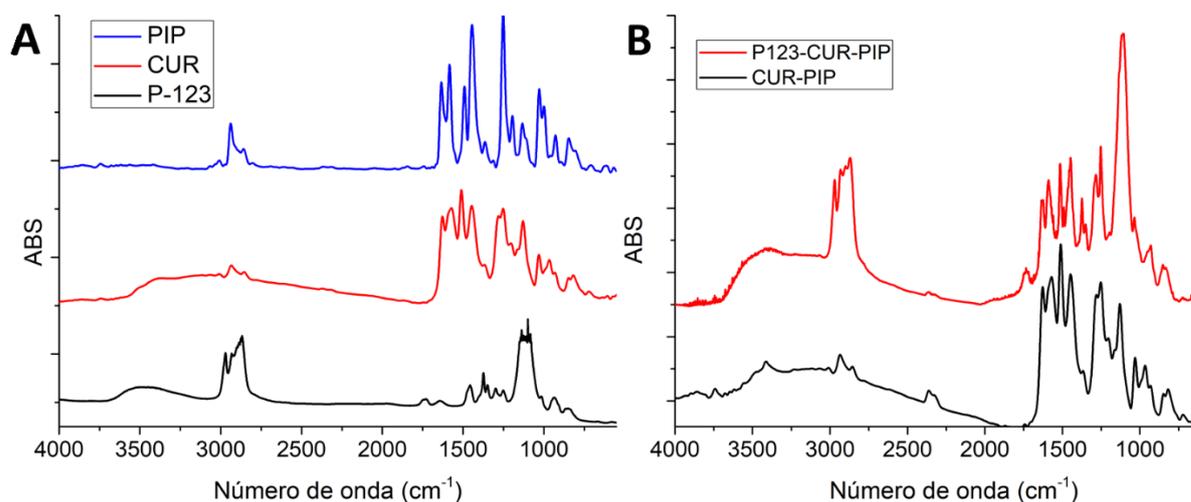
No entanto, como em um meio aquoso contendo somente CUR e PIP não ocorre a supressão de fluorescência, não é possível deduzir que atue como agente de supressão e comparar com o estudo anterior de supressão contendo P123 para averiguar se a CUR tem maior preferência de interação com o meio solvatado ou com o polímero. Esse efeito pode ser um indicativo de que PIP também interage com P123 em meio aquoso, podendo interferir no aumento de intensidade de emissão de CUR gerado pela presença de P123, através de competição por sítios disponíveis em P123 para solvatação.<sup>1,3</sup>

#### **4.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Utilizou-se da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR) com uso de pastilhas de KBr para obter informações sobre os espectros dos componentes puros,

assim como analisar possíveis interações entre eles. Os espectros obtidos para as misturas e compostos puros estão ilustrados na **Figura 10**.

**Figura 10.** Espectros de FTIR obtidos via pastilha de KBr para **(A)** componentes puros e **(B)** misturas de CUR-PIP e P123-CUR-PIP.



O espectro de P123 exibe uma banda larga na região de 3600-3100  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento O-H das hidroxilas das unidades PEO contidas em sua estrutura. Há presença de duas bandas de absorção entre 3000-2869  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico C-H dos grupos metileno e metil. Em 1109  $\text{cm}^{-1}$  e 936  $\text{cm}^{-1}$  há duas bandas de absorção com alta intensidade que ocorrem devido às vibrações do estiramento C-O dos éteres dialquílicos contidos nas estruturas das unidades PPO e PEO do copolímero. Já as bandas presentes em 1457  $\text{cm}^{-1}$  e 1374  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos dobramentos de grupos  $-\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .<sup>63</sup>

O espectro de absorção de CUR exibe uma banda larga entre 3513  $\text{cm}^{-1}$  e 3016  $\text{cm}^{-1}$  que se deve pelo estiramento dos grupos O-H presentes na estrutura molecular. A banda em 1626  $\text{cm}^{-1}$  representa uma sobreposição que acontece pelos estiramentos vibracionais C=C dos grupos alcenos e C=O dos grupos carbonila. A banda de absorção em 1512  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações do grupo C=O e também é possível observar as bandas relacionadas aos grupos enol (C-O) e metóxi (C-O-C) em 1280  $\text{cm}^{-1}$  e 1030  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>42</sup>

Observa-se no espectro de absorção de PIP a presença de uma banda em 2940  $\text{cm}^{-1}$  devido aos estiramentos C-H aromáticos do anel metilendioxifenil presente em sua estrutura. Em 1634  $\text{cm}^{-1}$  nota-se a banda representativa dos estiramentos C=O

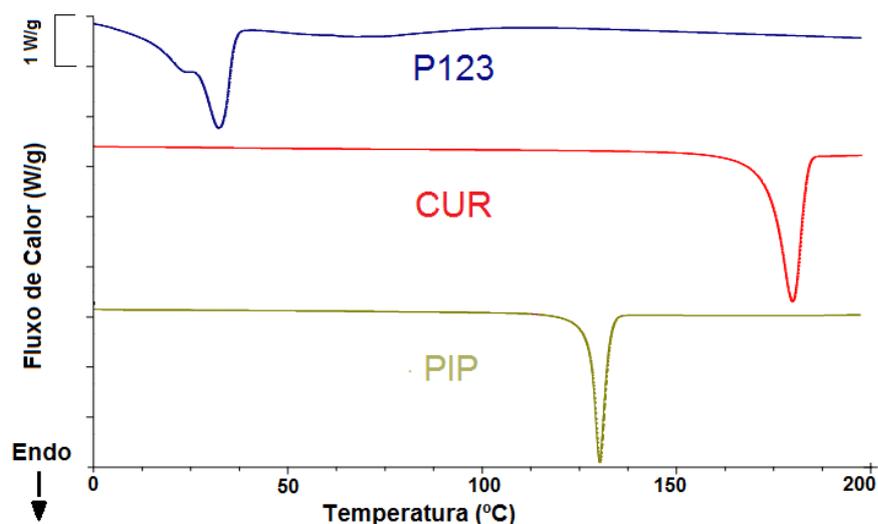
dos grupos carbonila. A banda presente em  $1584\text{ cm}^{-1}$  se deve à sobreposição dos estiramentos dos grupos alcenos (C=C) e carbonila (C=O). Em  $1488\text{ cm}^{-1}$  há uma banda que corresponde a sobreposição dos estiramentos C-O e C-C do anel metilenodioxifenil. Já as bandas características da ligação C-N do anel aromático são encontradas em  $1439\text{ cm}^{-1}$ ,  $1255\text{ cm}^{-1}$  e  $1134\text{ cm}^{-1}$ .<sup>42</sup>

Para analisar quais são os grupos orgânicos responsáveis pelas interações intermoleculares entre CUR, PIP e P123 fez-se medidas com mistura mássica de CUR-PIP (50/50 %m/m) e CUR-PIP-P123 (15/15/70 %m/m). No entanto, não foi possível notar deslocamentos químicos nas bandas características dos componentes, como nos grupos hidroxil e diceto/ceto-enólico de CUR e grupos carbonila de PIP, sendo observável apenas a sobreposição dessas bandas nos espectros das misturas. Visto que as interações que ocorrem entre os compostos quando analisadas em temperatura ambiente são fracas, como as de van der Waals, a utilização de análise de infravermelho torna-se menos eficaz para determiná-las.

#### 4.1.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

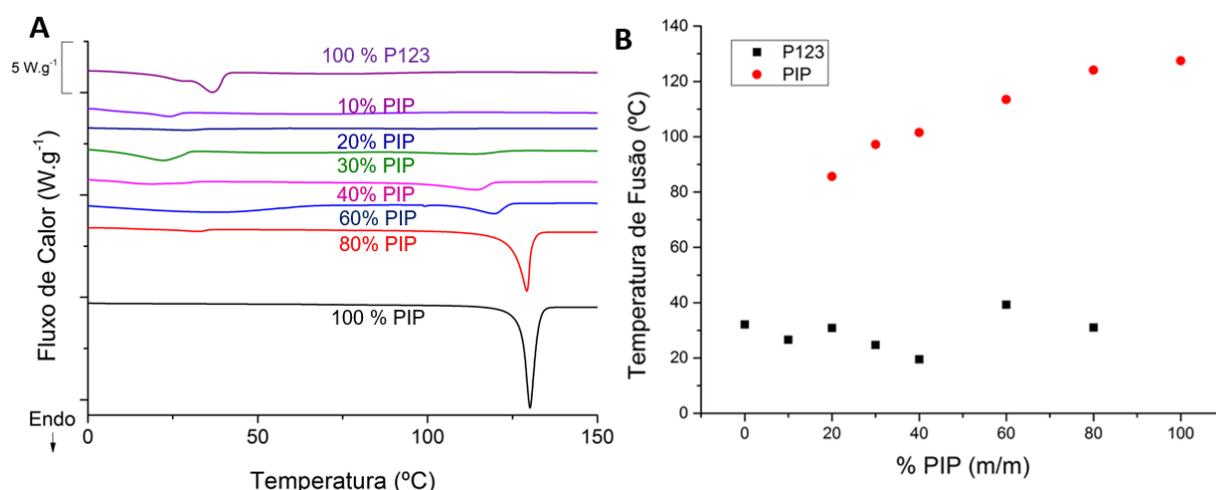
Observou-se que nas curvas de DSC dos componentes puros CUR, PIP e P123 houve presença de um único pico endotérmico em cada curva, sendo  $\Delta_{\text{fus}}H = 137,7$ ,  $98,9$  e  $43,6\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente e suas temperaturas de fusão foram determinadas como  $174,3$ ,  $127,5$  e  $32,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, conforme ilustrado na **Figura 11**.

**Figura 11.** Curvas de DSC de CUR, PIP e P123 puros.

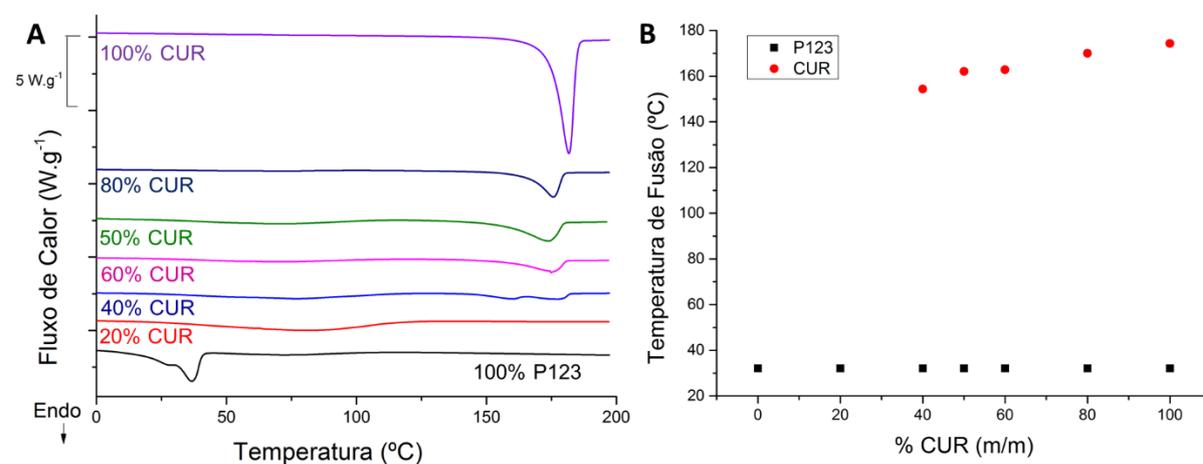


Durante o preparo das amostras pode-se notar uma diferença visual do estado físico após a remoção do solvente. Pois, mesmo em proporções semelhantes de cada estudo, houve cristalização rápida da PIP, enquanto a CUR permaneceu dispersa na mistura com o copolímero. Isso pode ser um indicativo de menor interação da PIP com o sistema micelar. As curvas de DSC obtidas para amostras de diferentes composições mássicas entre P123 com PIP e com CUR estão demonstrados nas **Figuras 12 e 13**.

**Figura 12. (A)** Curvas de DSC de misturas com composições diferentes (% m/m) de P123 e PIP na dispersão sólida. **(B)** Variação da temperatura de fusão dos componentes no sistema P123-PIP.



**Figura 13. (A)** Curvas de DSC de misturas com composições diferentes (% m/m) de P123 e CUR na dispersão sólida. **(B)** Variação da temperatura de fusão dos componentes no sistema P123-CUR.



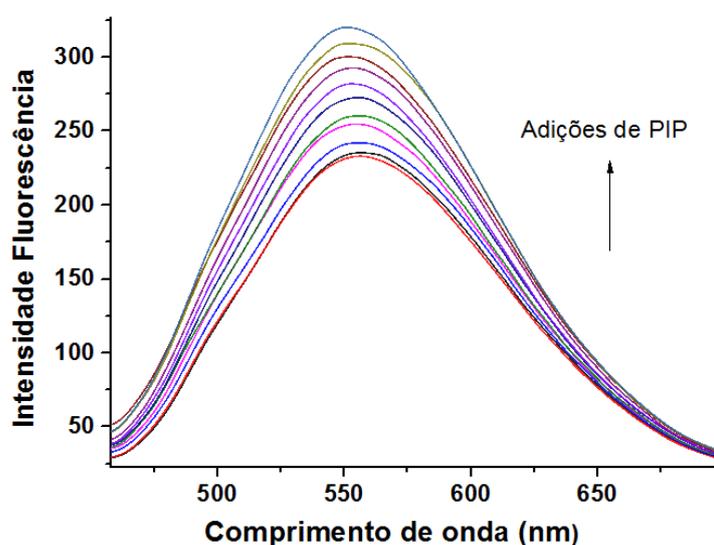
Nos dois sistemas houve diminuição do ponto de fusão de PIP e CUR, e no caso de PIP foi um efeito mais pronunciado, sendo visível inclusive a diminuição do ponto de fusão de P123. Já no caso da CUR, o pico de fusão de P123 não foi tão determinável. Desta forma, foi possível observar que há interação entre os componentes através de interações fracas, como a de van der Waals. Além disso, há algumas proporções de mistura em que ambos componentes estão em estado amorfo e os picos de fusão não apareceram nas curvas de DSC, sendo possivelmente indicativo de interação que é desejável para o preparo de membranas.<sup>3,8,9</sup>

## 4.2. ESTUDO DE INTERAÇÕES DA CUR E PIP

### 4.2.1. Estudos de fluorescência

O estudo de interação de CUR e PIP foi realizado através de titulação fluorimétrica com 3 soluções de trabalho com concentrações distintas de CUR para analisar possíveis alterações nos espectros de emissão em decorrência da diferença de concentração do analito. Realizou-se estudo em 4 temperaturas diferentes (25, 30, 35 e 40 °C) a fim de obter isotermas de solubilidade de CUR em PIP. A **Figura 14** mostra um dos espectros de emissão de CUR que foi produzido a 25 °C, o restante dos espectros desse experimento constam nos **Anexos A4.1 e A4.2**.

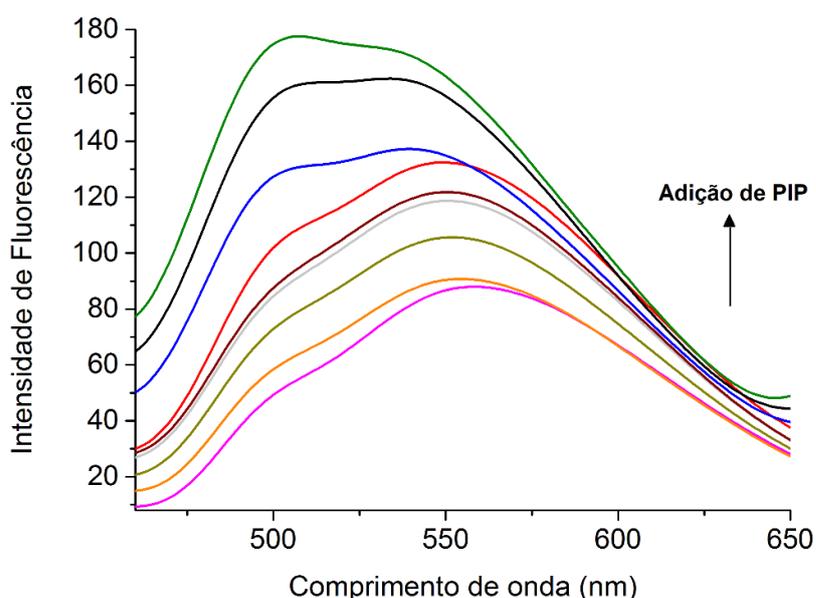
**Figura 14.** Espectro de emissão de fluorescência de CUR ( $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso à 25 °C.



É possível observar no espectro acima que a emissão de fluorescência de solução de CUR pura em água ocorre em 550 nm, porém notou-se a tendência de ocorrer supressão da fluorescência após um certo tempo até que se obtivesse o equilíbrio do meio. Esse efeito ocorre devido ao processo de autoagregação entre duas moléculas de CUR em meios aquosos, conhecido como processo de dimerização ou até mesmo pela agregação de mais moléculas de CUR formando agregados de maior tamanho.<sup>64</sup> Para contornar esse problema, após cada adição de alíquotas de solução de PIP esperou-se 2 min. para realizar a leitura no fluorímetro. Observou-se também que, a cada adição de alíquotas de PIP houve aumento gradativo da intensidade de emissão de fluorescência de CUR na solução. Isso indica que a presença de moléculas de PIP auxiliaram na diminuição do processo de dimerização, podendo aumentar sua disponibilidade para solvatação em água.

O estudo foi realizado com sucessivas adições de alíquotas de PIP e após o estágio de concentração equimolar entre os compostos notou-se que houve o aparecimento de uma nova banda de emissão na região de 480-490 nm, conforme **Figura 15**. Essa banda aparece como um ombro na banda de emissão de CUR e aumentou gradativamente com novas adições de PIP até ter maior intensidade que a banda de emissão específica de CUR.

**Figura 15.** Espectro de emissão de fluorescência de CUR ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso à 25 °C.

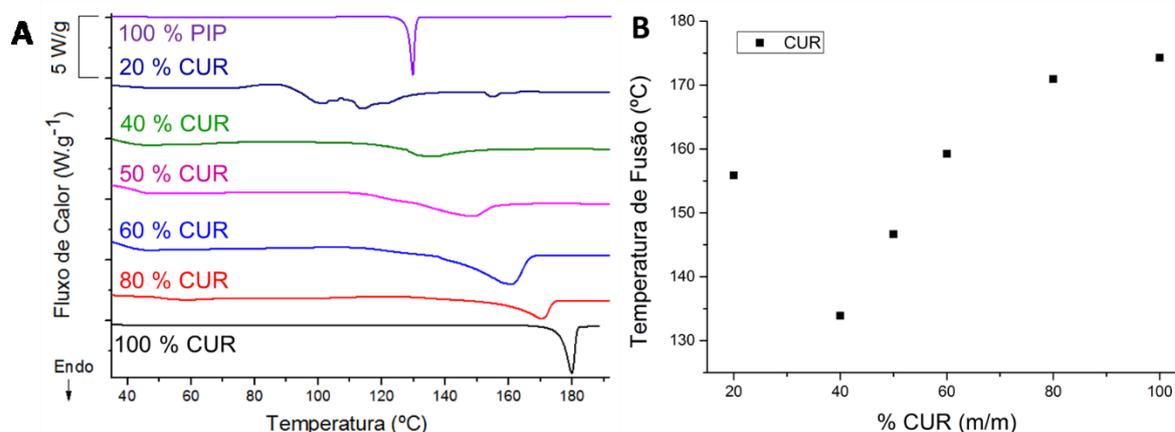


Encontra-se na literatura que essa região é onde PIP emite quando em meio aquoso, logo, há uma forte indicação de interferência espectral de um composto na emissão do outro após atingir-se uma determinada concentração de PIP.<sup>65</sup> Esse efeito foi observado em todos os experimentos realizados, dessa forma, não foi possível prosseguir com o planejamento de cálculo de solubilidade intrínseca a partir da região de saturação de solubilidade de CUR em PIP.

#### 4.2.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As curvas de DSC das misturas de CUR-PIP, dos componentes puros e a variação de temperatura de fusão de CUR constam na **Figura 16**. Foi possível observar nas curvas de DSC dos componentes puros CUR e PIP a presença de um único pico endotérmico, tendo  $\Delta_{fus}H = 131,8 \text{ J.g}^{-1}$  e temperatura de fusão  $174,3 \text{ }^\circ\text{C}$  para CUR e  $\Delta_{fus}H = 98,9 \text{ J.g}^{-1}$  e temperatura de fusão  $127,5 \text{ }^\circ\text{C}$  para PIP.

**Figura 16. (A)** Curvas de DSC de misturas físicas de concentrações diferentes de PIP CUR (%m/m). **(B)** Variação da temperatura de fusão de CUR no sistema co-amorfo.



Nas análises das misturas com diferentes proporções mássicas de CUR e PIP pode-se notar que em todas as curvas ocorreu diminuição das temperaturas de fusão com a formação de sistema co-amorfo. Na mistura com 20% de CUR observou-se presença de picos endotérmicos de ambos compostos em menores temperaturas (CUR= $153,4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta_{fus}H=1,75 \text{ J.g}^{-1}$  e PIP= $109,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta_{fus}H=32,97 \text{ J.g}^{-1}$ ).

Nas demais composições de misturas houve apenas o aparecimento do pico endotérmico característico de CUR. A redução da temperatura de fusão dos componentes indica interação fraca (van der Waals) entre eles, resultando em

alterações em suas estruturas cristalinas e tornando os materiais gradativamente mais amorfos.<sup>66</sup>

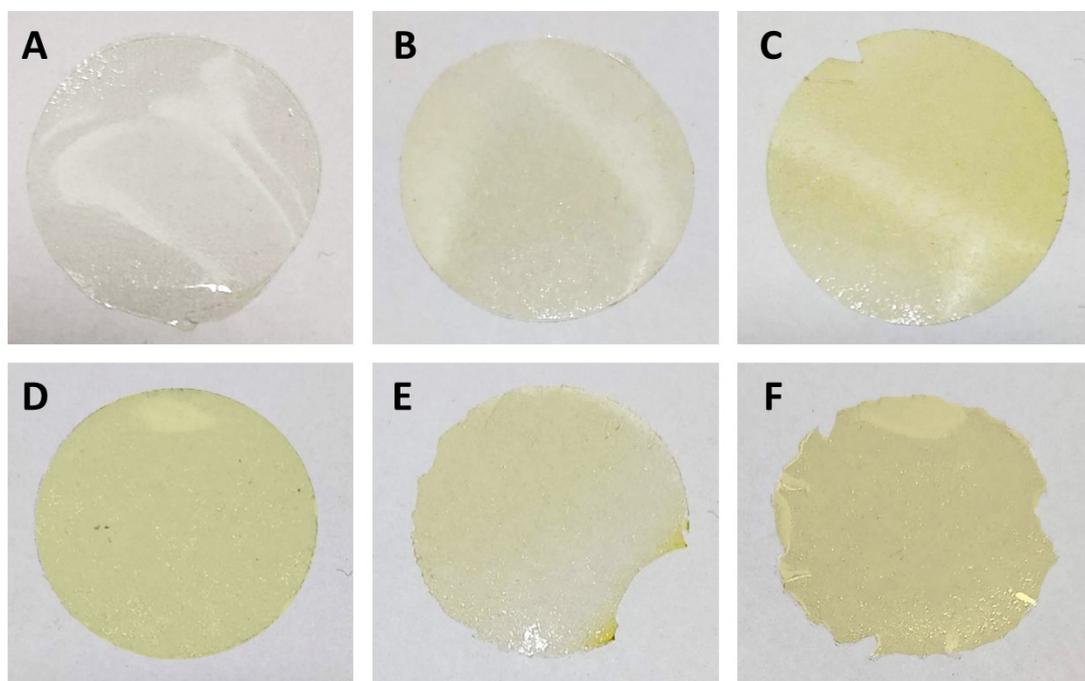
Nota-se que na mistura de 40% de CUR ocorreu a menor temperatura de fusão do sistema co-amorfo, sendo considerada a proporção em que o sistema cristalino de CUR foi mais alterado pela interação entre os dois componentes, gerando um sistema mais amorfo. Essa proporção mássica de mistura CUR-PIP foi também determinada por Krissia *et al.*<sup>66</sup>, ao realizar varredura calorimétrica de composições distintas do sistema (0-100% m/m). No entanto, conforme notou-se no estudo de fluorescência esta composição de formação de complexo CUR-PIP se torna inviável para utilização na produção das membranas poliméricas, podendo gerar interferências espectroscópicas nas caracterizações das próximas etapas do trabalho. Por isso, determinou-se a proporção mássica de 90:10 (CUR-PIP) para composição nas membranas, sendo uma proporção encontrada na literatura em estudos de aplicações de sistema.<sup>41,55,67,68</sup>

### 4.3. PREPARO DE MEMBRANAS COMPOSTAS POR QTS E XY

#### 4.3.1. Preparo das membranas de QTS e XY

As membranas de QTS e XY foram produzidas conforme proporções mássicas descritas na **Tabela 1**. O processo completo de secagem de solvente das membranas ocorreu usualmente entre 3 a 5 dias, dependendo da temperatura ambiente e umidade do dia. As características macroscópicas de cada formulação podem ser observadas na **Figura 17**.

**Figura 17.** Características macroscópicas das membranas com as formulações **(A)** Q100, **(B)** Q80; **(C)** Q60; **(D)** Q50; **(E)** Q40 e **(F)** Q20.



As membranas apresentaram aspecto translúcido e brilhoso em ambos lados e também boa homogeneidade, não sendo caracterizado a presença de material insolúvel ou domínios cristalinos nos sistemas desenvolvidos. As formulações com até 50% de XY apresentam boa maleabilidade e não são quebradiços. Porém, a medida que as formulações foram desenvolvidas com maior teor de XY, estas se apresentam mais quebradiças e pouco maleáveis, dificultando até mesmo a retirada da membrana das placas de Petri.

Observou-se que inicialmente todas as membranas eram incolores, porém durante o processo de secagem do solvente ocorreu amarelamento parcial ou completo das membranas que contém XY em sua composição. A mudança de coloração das membranas se deve pela reação de escurecimento não-enzimático de Maillard que acontece entre açúcares redutores e compostos que contenham nitrogênio em sua estrutura, sendo nesse caso representado pelos grupos carbonila da XY e grupos amina da QTS. O complexo conjugado polieletrólítico de QTS-XY formado na estrutura polimérica apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas melhoradas e também maior solubilidade em água quando

comparadas aos polímeros puros. Essas características são interessantes para aplicações de membranas em tratamentos cutâneos.<sup>69-71</sup>

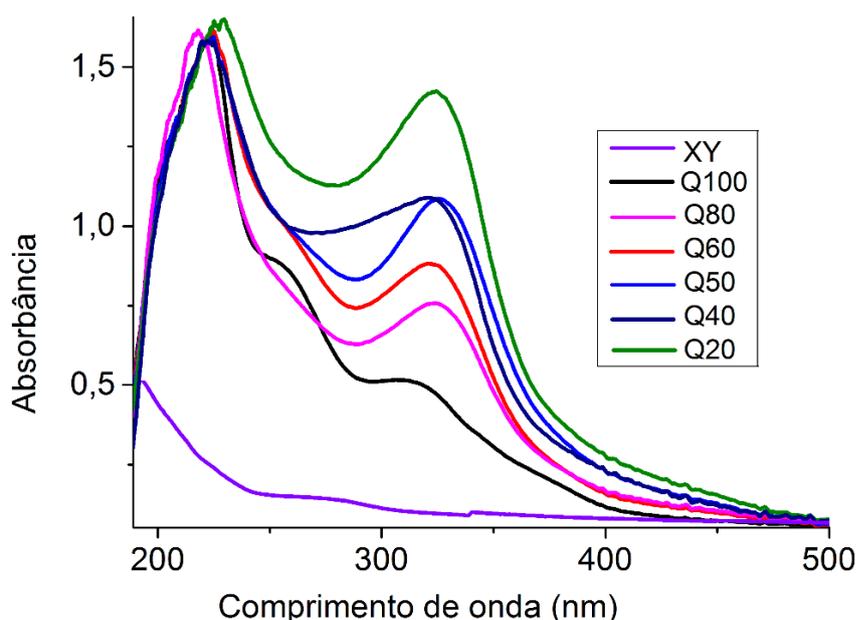
Para a produção das membranas utilizou-se sempre as mesmas placas de Petri e quantidades de mistura filmogênica similares para todas as formulações, de modo a se obter condições de preparo semelhantes. As espessuras das membranas foram aferidas com micrômetro e determinou-se espessuras entre 69-80  $\mu\text{m}$  para as diferentes formulações, sendo possível considerar um material de espessura similar.

A análise macroscópica do material nos informa importantes características para um material a ser utilizado como curativo de pele. No entanto, para se obter melhor caracterização sobre dispersão e solubilidade dos compostos na matriz polimérica se torna mais apropriado realizar análises de espectroscopia de UV-Vis e microscopias como PLOM e SEM.

#### 4.3.2. Espectroscopia de UV-Vis

Utilizou-se da técnica de espectroscopia de UV-Vis para analisar a interação entre os compostos das membranas poliméricas. Os espectros de absorção obtidos para QTS pura e para as membranas contendo XY constam na **Figura 18**.

**Figura 18.** Espectros de UV-Vis para as membranas de QTS pura e das diferentes misturas com XY.



No espectro da membrana Q100 nota-se uma banda de absorção intensa na região de 230 nm e uma de menor intensidade na região de 313 nm que podem representar as transições  $n-\pi^*$  dos pares eletrônicos dos átomos de nitrogênio e oxigênio presentes na estrutura da QTS. Já no espectro de absorção da XY pura nota-se que não ocorrem transições eletrônicas na faixa de UV-Vis.<sup>72,73</sup>

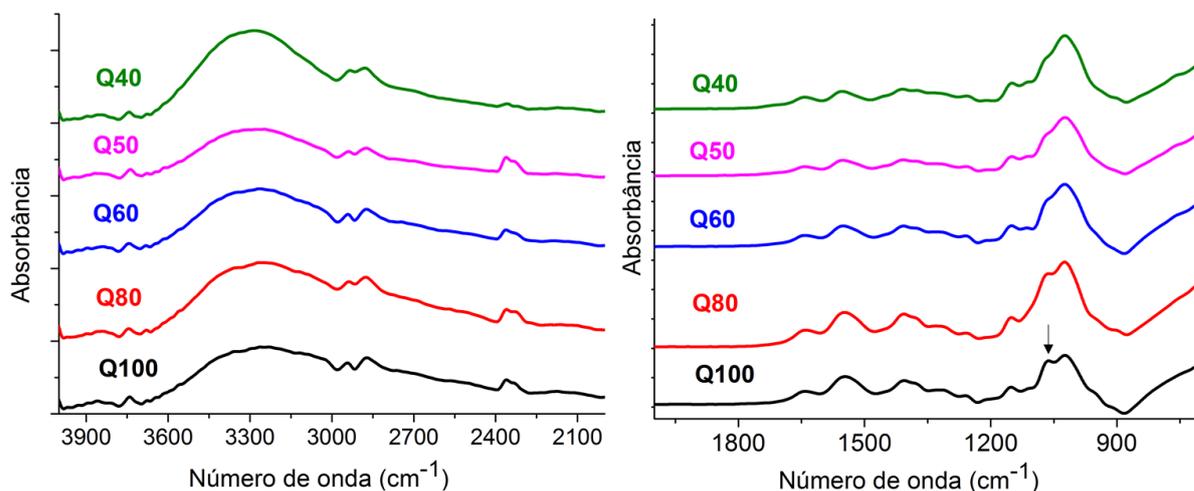
Conforme a quantidade de XY foi aumentada nas soluções filmogênicas de QTS, evidencia-se na análise de UV-Vis um deslocamento da banda de 313 nm para 325 nm em conjunto com aumento gradativo de sua intensidade de absorção, indicando alteração na organização estrutural da QTS e em suas transições eletrônicas pela presença de moléculas de XY. O deslocamento da banda pode ser associado a presença de produto com coloração diferente resultante de reação de Maillard entre os dois compostos.<sup>73-75</sup>

A análise dos espectros de UV-Vis fornece informações sobre transições eletrônicas que possam ocorrer nas estruturas das moléculas ao acrescentar novos compostos à solução filmogênica, porém não esclarece em quais grupos funcionais as alterações estão ocorrendo. Por isso, torna-se necessário realizar outras caracterizações, como FTIR, para buscar maiores esclarecimentos sobre de que forma QTS e XY podem interagir.

#### **4.3.3. Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As membranas produzidas de QTS pura e de misturas com XY de diferentes composições foram analisadas através de técnica de FTIR para obtenção de informações de possíveis alterações nos grupos funcionais dos polímeros que possam ter sido geradas por interações intermoleculares. Os espectros obtidos nas análises via modo ATR estão contidas na **Figura 19**. Amostras de XY pura e Q20 não foram analisadas pois para se utilizar o equipamento no modo ATR é necessário que a amostra seja maleável e não quebradiça, o que não se obteve para essas duas formulações.

**Figura 19.** Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membrana de QTS pura e diferentes composições de QTS e XY. Região de 4000-2000  $\text{cm}^{-1}$  na imagem da esquerda e região de 1900-700  $\text{cm}^{-1}$  na imagem da direita.



No espectro de QTS pura observa-se uma banda larga na região de 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionada aos estiramentos dos grupos O-H e N-H. As bandas de absorção entre 2950 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  representam os estiramentos do grupo C-H simétrico e assimétrico. Na região de 1653  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se o estiramento referente a C=O e em 1330  $\text{cm}^{-1}$  o estiramento C-N dos grupos amida. A banda de 1550  $\text{cm}^{-1}$  atribui-se ao dobramento N-H das aminas primárias e a banda na região de 1163  $\text{cm}^{-1}$  representa o estiramento assimétrico de C-O-C ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 4). Já as bandas de absorção em 1069 e 1023  $\text{cm}^{-1}$  representam o estiramento de C-O.<sup>76</sup>

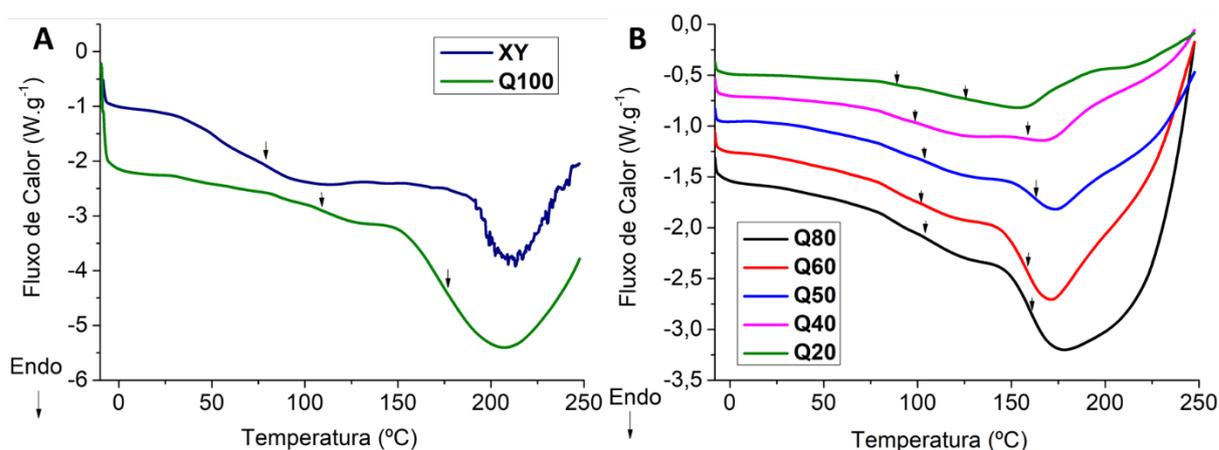
Nas membranas contendo proporções crescentes de XY notou-se uma alteração na intensidade das bandas relacionadas ao estiramento C-O, especificamente na banda de 1069  $\text{cm}^{-1}$ , que consta destacada na **Figura 19**. Conforme a concentração de XY aumentou houve diminuição na intensidade da banda de absorção que era originalmente separada, a ponto de se tornar uma banda larga em conjunto com a que se encontrava em 1023  $\text{cm}^{-1}$ . Isso pode indicar que ocorre uma forte interação entre as moléculas de XY e QTS, ocorrendo alterações na estrutura cristalina original da QTS. Não se observou alterações de deslocamento ou mudanças na banda característica de N-H da QTS, o que poderia ser relacionado a uma interação entre os polímeros. Isso pode ter ocorrido pois não houve aquecimento da solução filmogênica e o tempo de homogeneização em solução foi de 30 min., não gerando

condições que favorecem reação química entre QTS e XY, que seria mais facilmente observada nos espectros de FTIR.<sup>56,76</sup>

#### 4.3.4. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os biopolímeros QTS e XY são amorfos e não apresentam eventos térmicos provenientes de fusão em análises de DSC. No entanto, é possível avaliar a transição vítrea dos compostos puros através de variações nas linhas base das curvas. Pode-se também avaliar possíveis alterações dos perfis em decorrência de interações entre os compostos em diferentes composições, conforme ilustrado na **Figura 20**. Para que estes eventos apareçam em análises de polímeros naturais é importante o uso de duas corridas sendo a primeira responsável pela destruição da história térmica da matriz e uso de *quench cooling*.

**Figura 20.** Curvas de DSC de **(A)** XY e membrana de QTS pura, **(B)** membranas compostas por XY e QTS.



A partir de análise das curvas de DSC pode-se determinar as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) dos polímeros e das misturas, conforme dados da **Tabela 4**.

Na curva da segunda corrida do DSC da QTS pura nota-se dois eventos de transição vítrea, sendo um na região de 150-200 °C e outro entre 100-150 °C. Na curva de XY pura esse evento é notado na região de 50-100 °C e na região de 200 °C se observa fenômeno característico de degradação do polímero. Já nas curvas das diferentes misturas observa-se dois eventos endotérmicos que ocorrem mais próximos dos eventos térmicos da QTS pura. Dessa forma, foi possível acompanhar

as variações das Tg da QTS conforme se adicionou maior quantidade de XY nas misturas.

**Tabela 4.** Temperaturas de transição vítrea (Tg) encontrados das curvas de DSC das membranas dos componentes puros e de misturas de QTS e XY.

Componente	Tg <sub>1</sub> (°C)	Tg <sub>2</sub> (°C)
XY	78,0	-
Q100	108,0	175,0
Q80	103,0	160,0
Q60	101,0	158,0
Q50	103,0	161,0
Q40	98,0	158,0
Q20	88,0	124,0

Na literatura se encontra valores de Tg para QTS na faixa de 100 a 203°C, sendo que é um fenômeno dependente de sua massa molecular, impurezas e grau de desacetilação, o que dificulta a comparação dos valores encontrados com os da literatura.<sup>56,77</sup>

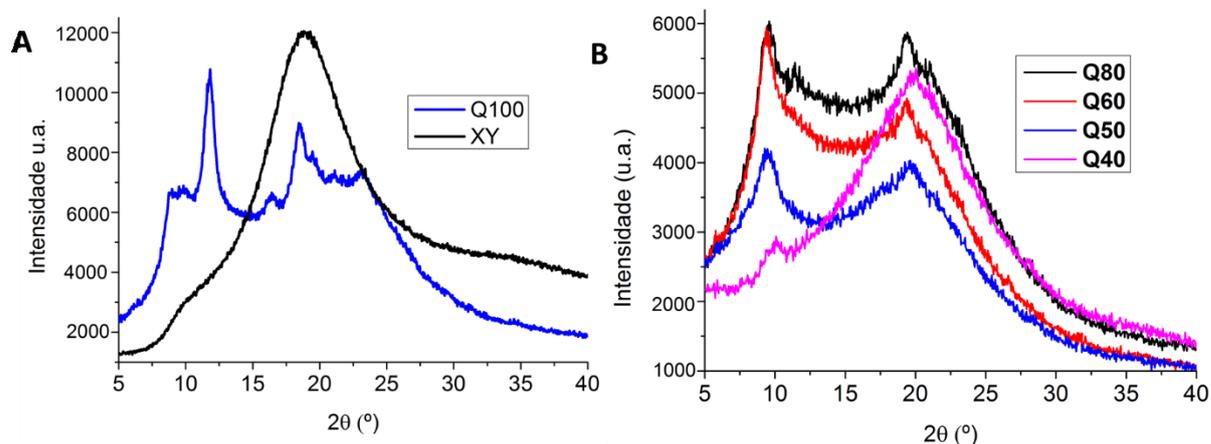
Conforme se adicionou mais XY na composição das membranas notou-se uma diminuição gradual das temperaturas de transição vítrea da QTS. Isso se deve a forte interação que ocorre entre os grupos nitrogenados da QTS e os açúcares redutores da XY, gerando maior distanciamento entre as cadeias poliméricas da QTS e assim aumentando sua mobilidade molecular, atuando como um agente plastificante. Esse fenômeno também foi observado por Xu *et al* ao estudar as alterações geradas na Tg da QTS com crescentes adições de diferentes hemiceluloses em filmes poliméricos.<sup>78,79</sup>

#### 4.3.5. Difração de pó por raio-X (XRPD)

Para obter maiores informações sobre a cristalinidade dos constituintes das membranas realizou-se análise por técnica de difração de pó por raio-X (XRPD), comparando-se os compostos puros e possíveis alterações nos padrões de difração nas membranas de misturas de QTS e XY. Os difratogramas obtidos estão

representados na **Figura 21**. A formulação Q20 não foi analisada pois o material obtido estava muito quebradiço.

**Figura 21.** Padrões de XRPD para **(A)** XY e membrana de QTS pura, **(B)** membranas compostas por XY e QTS.



No difratograma de Q100 observa-se dois picos de cristalização de maior intensidade em 10,9° e 19,5° que estão relacionadas a fenômenos de difração equatorial (100) e reflexão (020), respectivamente. A XY pura apresenta um único pico de cristalização em 20°, demonstrando uma mínima organização estrutural para o polímero.

Observa-se que a adição de XY nas membranas de QTS gera alterações nos seus padrões de cristalinidade, diminuindo a intensidade dos picos em todos os perfis de misturas. Nota-se que o pico de 10,9° diminui gradativamente em intensidade conforme aumenta-se a concentração de XY na membrana e esse efeito também é observado no pico de 19,5° até a membrana Q50. Isso ocorre, pois, as moléculas de XY interagem com as redes poliméricas de QTS diminuindo a quantidade de ligações de hidrogênio intermoleculares originais, ou seja, diminui-se a organização cristalina do polímero. Já para a membrana Q40 observa-se efeito contrário, pois há maior valor de intensidade do pico de 19,5°, tendo um padrão de difração semelhante ao de XY pura. Isso se deve a maior concentração de moléculas de XY nas membranas, o que possibilita maior número de interações eletrostáticas com a QTS e aumento de cristalinidade do sistema.<sup>80</sup>

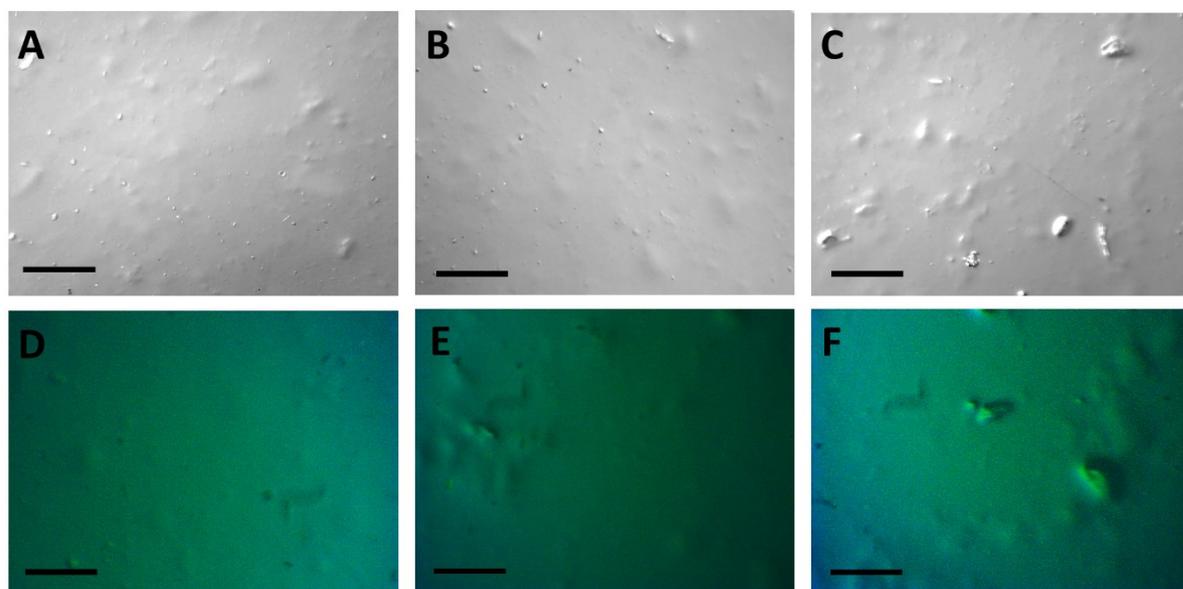
Os dados obtidos através de XRPD corroboram com as observações de propriedades macroscópicas das membranas, sendo que a partir de 50% de XY

adicionadas à solução filmogênica obteve-se membranas menos maleáveis e mais quebradiças.

#### 4.3.6. Microscopia óptica com luz polarizada (PLOM)

A técnica de microscopia óptica convencional e com luz polarizada foi realizada para observar as propriedades dispersivas dos polímeros na matriz de cada membrana, conforme ilustrado na **Figura 22**. A microscopia de luz polarizada permite determinar a presença de material cristalino na matriz polimérica, pois mostra regiões claras e escuras que representam pontos de birrefringência geradas por estruturas cristalinas e regiões com estruturas não organizadas ou amorfas, respectivamente.

**Figura 22.** Microscopia óptica convencional (A,B e C) e microscopia de luz polarizada (D, E e F) das membranas **(A,D)** Q100; **(B,E)** Q80 e **(C,F)** Q40. As barras em preto indicam tamanho de 200  $\mu\text{m}$ .



Observou-se que todas as membranas analisadas possuem matriz polimérica contínua incolor. Marcas das placas de Petri utilizadas no processo de secagem foram observadas por toda a extensão das membranas. Nas microscopias óticas (A,B) notam-se características de superfície e de birrefringência semelhantes, porém na microscopia (C) observa-se maior quantidade de regiões cristalinas. Nas microscopias PLOM das membranas Q100 e Q80 foi possível verificar que suas superfícies eram compostas por material majoritariamente amorfo e bem disperso.

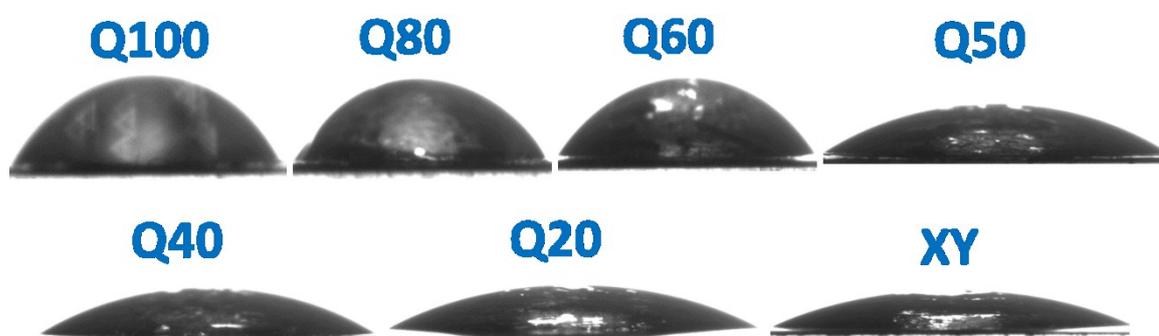
Porém, na microscopia PLOM da membrana Q40 observou-se presença de pontos claros representativos de cristais, possivelmente devido a maior concentração de XY na mistura.

#### 4.3.7. Molhabilidade por ângulo de contato

A determinação de molhabilidade através de técnica de ângulo de contato ao se pingar uma gota de água nas membranas é uma interessante forma de avaliar a hidrofiliicidade de cada material. As fotografias obtidas no software Droplmage para cada ensaio realizado nas membranas e os ângulos de contato médios determinados a partir de análise das fotografias constam na **Figura 23** e **Tabela 5**, respectivamente. Membranas que apresentam ângulo de contato maiores que  $90^\circ$  representam uma superfície hidrofóbica e menores que  $90^\circ$  indicam uma superfície hidrofílica.<sup>81</sup>

A molhabilidade é uma propriedade muito importante das membranas quando se analisa a aplicação almejada de curativos de ferimentos cutâneos. Durante o processo de cicatrização da pele ocorrem etapas de adesão e replicação celular que dependem amplamente da hidrofiliicidade da superfície do material utilizado como curativo. Encontra-se na literatura estudos que apontam melhor eficácia de adesão celular na pele para materiais poliméricos que tenham ângulo de contato entre  $40^\circ$  e  $80^\circ$ , sendo interessante que se encontre essa característica em um material a ser utilizado para esse fim.<sup>82-84</sup>

**Figura 23.** Fotografias das gotas de água adquiridas nos ensaios de ângulo de contato para os compostos puros e membranas de QTS e XY.



**Tabela 5.** Ângulos de contato em água determinados para as membranas de QTS e XY.

Componente (n=10)	Ângulo de Contato (°)
Q100	55,25 ± 0,98
Q80	53,13 ± 0,96
Q60	52,12 ± 0,85
Q50	37,86 ± 2,69
Q40	32,65 ± 4,58
Q20	28,92 ± 3,70
XY	20,10 ± 1,15

A partir dos ensaios de ângulo de contato foi possível analisar que todas as membranas apresentam propriedades hidrofílicas, sendo que a membrana Q100 é menos hidrofílica que a XY pura. Desta forma, há a tendência de que quanto maior a concentração de XY na mistura menor será o ângulo de contato e maior sua hidrofiliicidade. No entanto, nota-se que as membranas Q80 e Q60 apresentaram ângulo de contato semelhante ao de QTS pura, o que pode indicar maior interação intermolecular e possível formação de complexo entre os dois compostos de forma diferente das outras proporções analisadas.<sup>85</sup>

#### 4.3.8. Determinação de grau de dissolução das membranas

Ensaio de dissolução das membranas de QTS e XY foram realizados em soluções tamponadas de pH 5,5 e 7,4 a fim de determinar a quantidade de compostos poliméricos que podem se dissolver quando em contato com meio líquido após 24 h. Esse estudo é essencial para verificar a integridade macroscópica das membranas após o término do experimento, visto que para a aplicação almejada o material deve ser maleável e resistente quando na presença de líquidos. Os dados obtidos após 24 h de ensaio para o pH e 7,4 estão contidos na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Grau de dissolução (%) das membranas de QTS e XY em soluções tampão acetato pH 5,5 e fosfato pH 7,4 a 37 °C após 24 h.

<b>Formulação</b>	<b>G.D. (%) pH 5,5</b>	<b>G.D. (%) pH 7,4</b>
Q100	62,6 ± 3,7	3,11 ± 0,8
Q80	20,2 ± 1,5	18,1 ± 0,9
Q60	30,1 ± 6,4	28,3 ± 0,1
Q50	42,6 ± 4,9	40,4 ± 1,5
Q40	60,7 ± 2,9	53,6 ± 3,6
Q20	68,9 ± 2,3	61,8 ± 4,5

No pH 5,5 a membrana Q100 teve um alto grau de dissolução, sendo semelhante ao das membranas Q40 e Q20. Há diminuição considerável da dissolução ao se adicionar 20% de XY, gerando maior estabilidade quando comparado a membrana de QTS pura. Esse resultado pode indicar interação eletrostática entre os dois compostos com a inserção de moléculas de XY nas cadeias poliméricas de QTS que estão protonadas nesse meio. Adicionalmente, nota-se tendência de aumento de dissolução conforme se aumenta a concentração de XY, podendo ser explicado pela maior solubilidade em água observada na XY pura, conforme dados obtidos de ângulo de contato.<sup>86</sup>

Nos ensaios realizados em pH 7,4 observou-se que a dissolução da membrana Q100 diminuiu expressivamente, enquanto que isso não ocorreu nas membranas restantes. Nessa faixa de pH os grupos amina da QTS estão em sua forma neutra e por isso apresentam menor solubilidade em água. Com o aumento de moléculas de XY na mistura filmogênica ocorre a formação de complexo polietrolítico entre os polímeros e sua solubilidade em água é aumentada. Esses resultados mostram que algumas composições de misturas de QTS e XY como Q80 e Q60 possuem propriedades melhoradas quando comparado a QTS pura.<sup>87</sup>

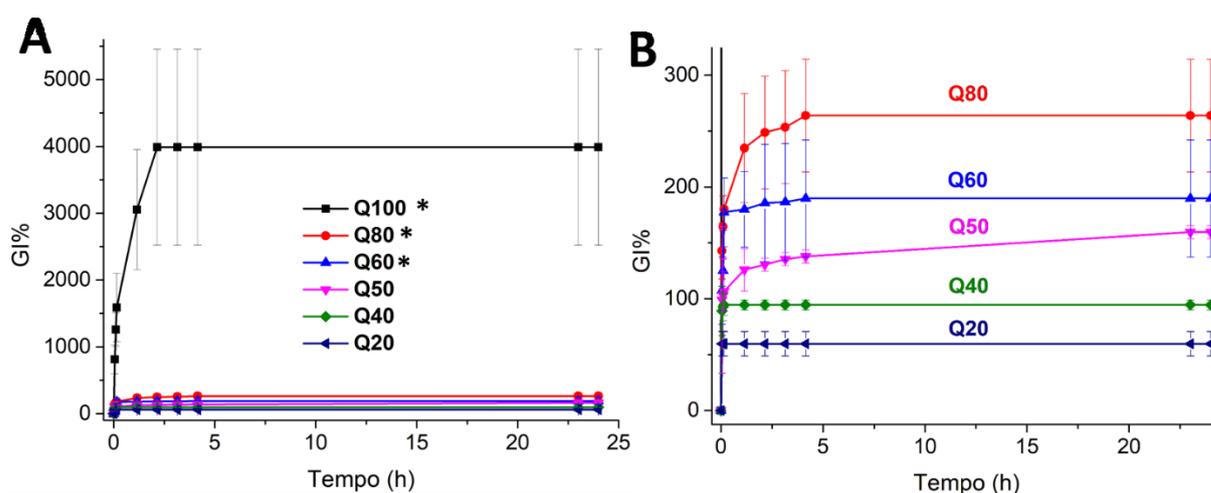
#### **4.3.9. Determinação de grau de intumescimento**

A propriedade de intumescimento de uma membrana polimérica a ser utilizada como curativo de ferimentos de pele é de extrema importância. Isso se deve ao fato de que durante o processo de regeneração a pele tende a produzir exsudatos compostos por fluídos e células mortas e torna-se necessário realizar a

troca frequente dos curativos. Logo, um material que absorva e retenha mais líquidos em sua estrutura pode ser mais eficaz e facilitar o tratamento de seu usuário.<sup>9</sup>

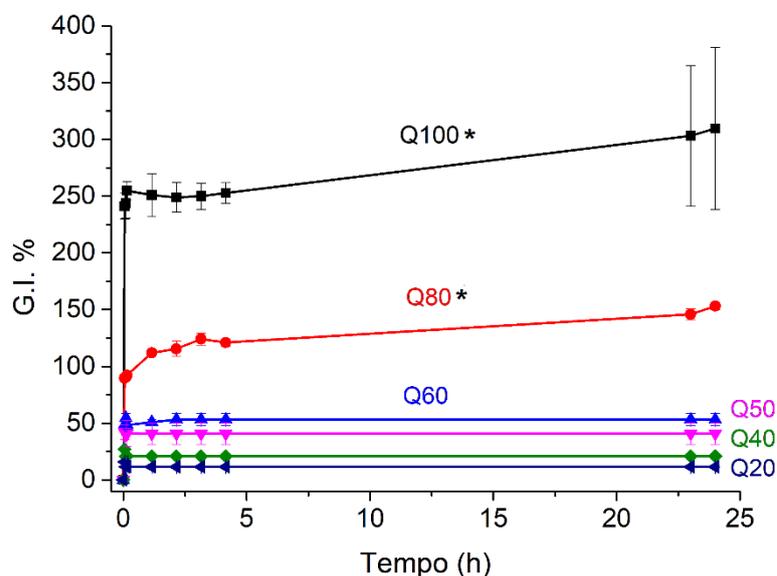
Para analisar o grau de intumescimento (G.I.%) das membranas realizou-se ensaios em pH 5,5 e 7,4 e o banho termostático permaneceu em temperatura simulada corporal de 37 °C. Escolheu-se tais pHs pois a pele ferida tende a apresentar um pH aproximado de 7,4 e a pele saudável um pH de 5,5. As **Figuras 24 e 25** mostram os perfis de intumescimento obtidos para as membranas de QTS e XY nos pHs estudados.<sup>88</sup>

**Figura 24.** Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em pH 5,5 a 37 °C. **(A)** Todas membranas de QTS e XY analisadas e **(B)** Aproximação da região das membranas contendo XY.



\* Indicam que valores médios com diferenças estatisticamente significativas entre os graus de intumescimento, de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

**Figura 25.** Perfil de intumescimento das diferentes formulações em função do tempo em pH 7,4 a 37 °C.



\* Indicam que valores médios com diferenças estatisticamente significativas entre os graus de intumescimento, de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

Ao comparar os dois perfis obtidos pode-se verificar que no pH 5,5 (**Figura 24**) as membranas tiveram os maiores graus de intumescimentos. Isso ocorre pois nesse pH os grupos amina da QTS estão protonados e ocorre repulsão eletrostática entre suas cadeias poliméricas, gerando maior volume livre entre as estruturas para possíveis interações intermoleculares com a água presente no meio. Esse efeito é especialmente maior para a membrana Q100 que apresentou intumescimento de 4.000% após atingir seu equilíbrio em 2h de experimento. Já as membranas restantes tiveram perfis de intumescimento menores que o de QTS pura, pois alcançaram seus maiores valores de absorção de água e equilíbrio em cerca de 4h com G.I. na faixa de 50 – 250%. Em geral, quanto maior a concentração de XY na composição da membrana menor foi seu grau de intumescimento, o que pode indicar interação entre os compostos e com a entrada das moléculas de XY nas estruturas de QTS o volume livre se torna menor, o que diminui sua capacidade de reter água. Além disso, nota-se que não houve diferença estatística entre as médias de G.I.% das formulações Q50-Q40 e Q40-Q20.<sup>86,89</sup>

No pH 7,4 a membrana Q100 apresenta capacidade de absorção de água muito menor que no pH 5,5. Isso se deve pois no meio mais básico ocorre desprotonação e agregação de moléculas de QTS, gerando menor volume livre para

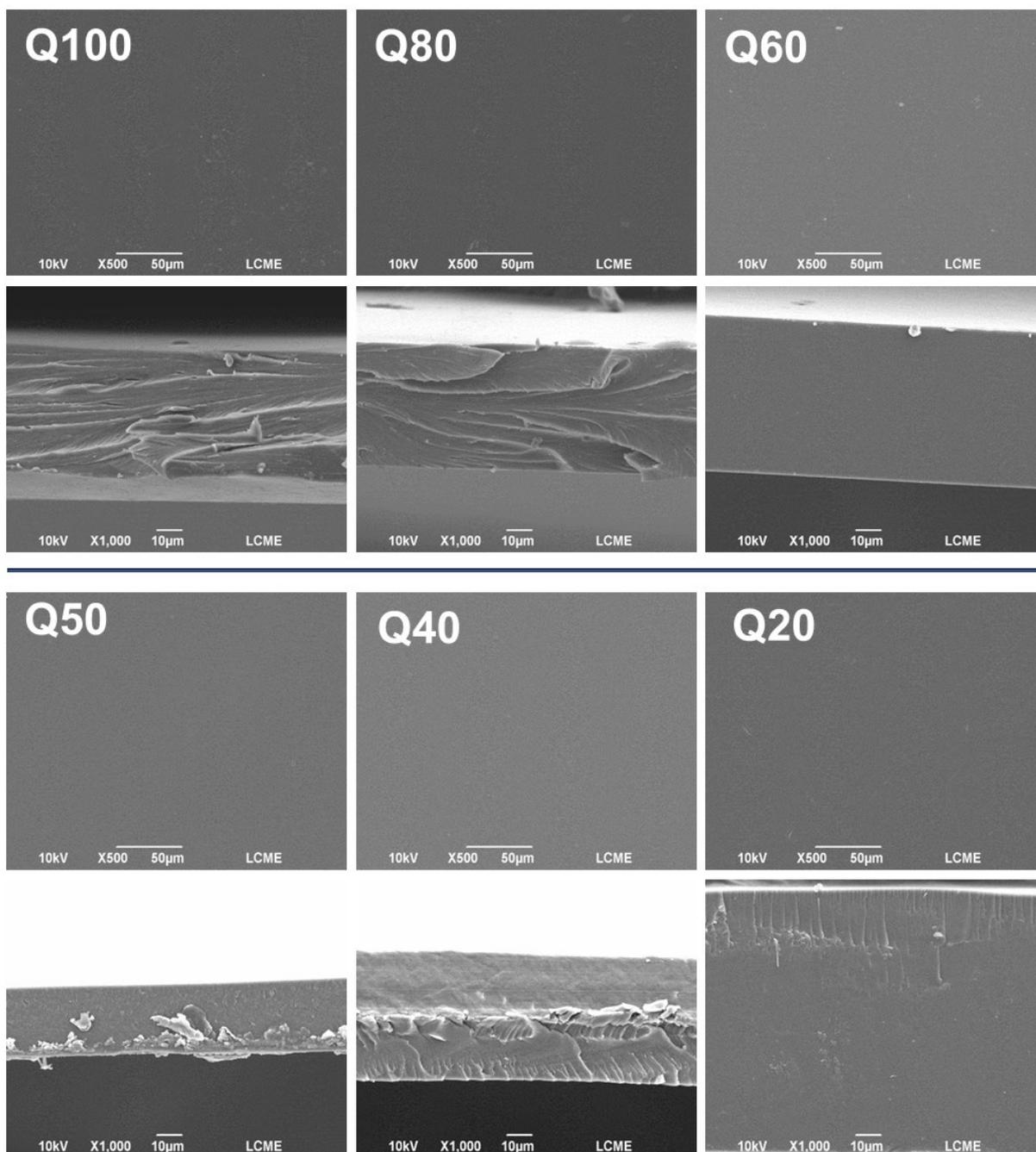
interação e absorção de moléculas de água. Para as membranas contendo XY observou-se ordem de G.I.% semelhante ao obtido no pH 5,5, porém com valores de absorção de água proporcionalmente menores. Através de análise estatística das médias de G.I.% se observou que a membrana Q80 foi a única que apresentou significância estatística dentre as formulações contendo XY. Considerando as observações encontradas, definiu-se que a membrana Q80 foi a que apresentou a maior retenção de líquidos em ambos pHs analisados dentre todas as formulações contendo XY.<sup>90</sup>

Amostras de membranas que tiveram seus graus de intumescimento determinados foram acondicionadas em eppendorfs e congeladas para posterior análise de microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.3.10. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)**

Realizou-se análise de microscopia eletrônica de varredura nas membranas secas e após ensaios de intumescimento em soluções de pH 5,5 e 7,4 para analisar as modificações morfológicas geradas pela absorção de água nas cadeias poliméricas. As imagens obtidas para as membranas secas estão contidas na **Figura 26.**

**Figura 26.** Microscopias SEM obtidas para as membranas secas de QTS e XY com imagens de superfície de secagem (acima) e fratura (abaixo). As escalas utilizadas foram de 50  $\mu\text{m}$  para microscopias de superfície e 10  $\mu\text{m}$  para as de fratura.



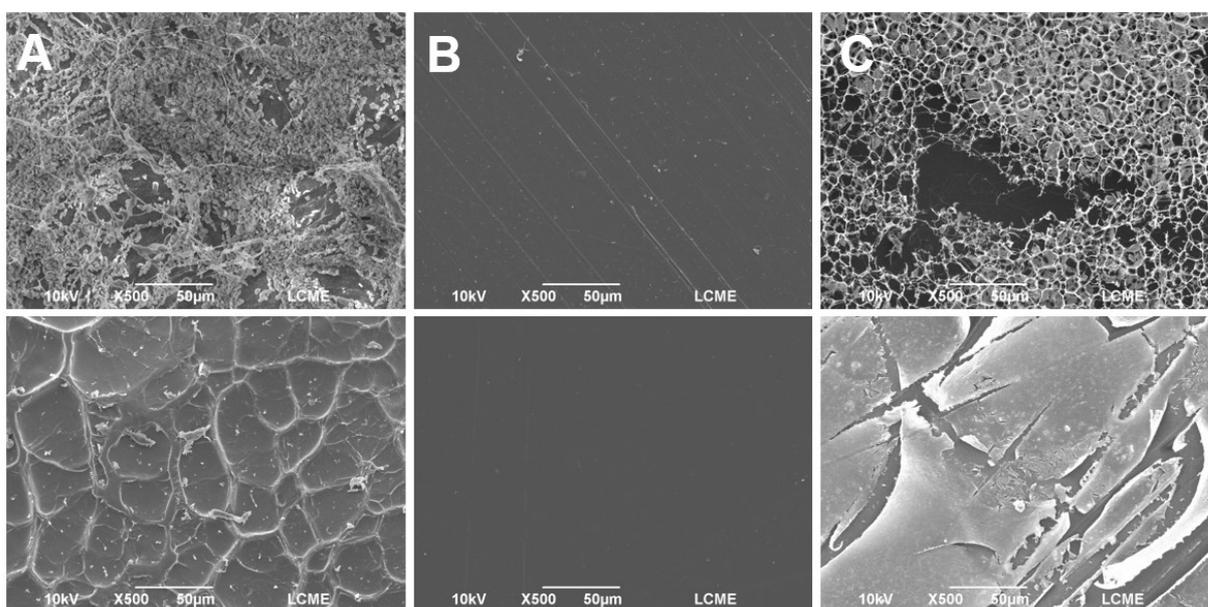
É notável a semelhança de todas as membranas nas análises de superfície, sendo materiais de matriz contínua, densa e lisa, não se observando a presença de poros. As análises de fratura apresentam as mesmas características, porém observam-se certas diferenças nas morfologias após o procedimento de corte. SEM

das membranas Q100 e Q80 mostram morfologias mais parecidas entre si, com maior rugosidade após fratura do que quando comparadas às demais membranas.

O processo de intumescimento das membranas proporciona separação das cadeias poliméricas. Ao se realizar procedimento posterior de congelamento com auxílio de nitrogênio líquido, ocorre remoção da água da matriz através de sublimação. Esse fenômeno causa mudança de rugosidade na superfície das membranas, podendo ser observado com análise de microscopia SEM. <sup>91</sup>

A **Figura 27** apresenta as microscopias de superfície obtidas para as membranas Q100, Q80 e Q20 intumescidas em pH 5,5 e 7,4. Não foi possível analisar as fraturas dos materiais pois com o processo de absorção de água e posterior liofilização obteve-se membranas muito frágeis, dificultando a etapa de fratura para preparo de amostra. As demais SEM das membranas estão no **Anexo A5**.

**Figura 27.** Microscopias SEM das superfícies das membranas **(A)** Q100; **(B)** Q80 e **(C)** Q20 para os pHs 5,5 (cima) e 7,4 (baixo). As escalas utilizadas são de 50  $\mu\text{m}$ .



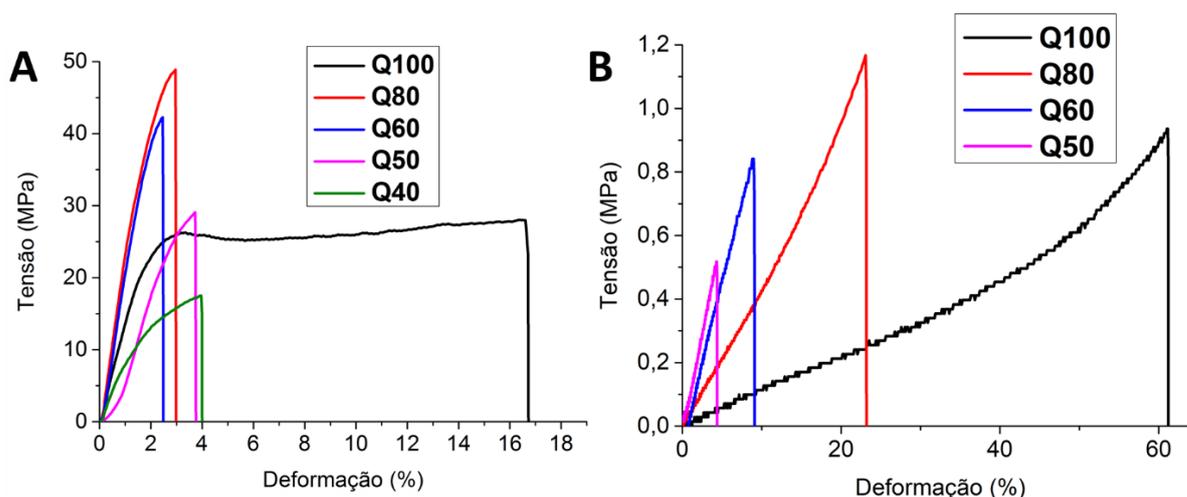
Observa-se que as membranas tiveram maior absorção de água no pH 5,5, conforme dados encontrados na determinação de grau de intumescimento. Esse efeito é representado pela separação entre as cadeias poliméricas da QTS com a presença de moléculas de água entre elas. Em ambos pHs analisados as membranas Q100 e Q20 tiveram grande aumento de rugosidade, apresentando

início do processo de dissolução da matriz polimérica. Já a análise SEM da membrana Q80 mostra moderada alteração morfológica no pH 5,5 e em menor grau no pH 7,4. Visto que essa formulação possui o maior grau de intumescimento dentre as diversas misturas com XY analisadas, pode indicar que essa composição de mistura de QTS e XY possui melhor interação eletrostática entre os compostos e gera maior proteção da matriz frente ao efeito de dissolução nos dois pHs.<sup>56,92</sup>

#### 4.3.11. Ensaio de tensão vs deformação

Um material a ser utilizado como curativo cutâneo deve apresentar algumas propriedades mecânicas específicas para ser considerado adequado para o uso, como boa maleabilidade e resistência à ruptura. O ensaio de tensão e deformação das membranas possibilita analisar tais propriedades. Não foi possível realizar o ensaio para a membrana Q20 (seco e intumescido) e Q40 (intumescido) pois os materiais eram muito quebradiços nessas condições e não se conseguiu prender os corpos de prova nas garras do equipamento de forma adequada. Estudos de tensão vs deformação para as membranas intumescidas foram realizadas apenas em solução tampão pH 7,4 pois foi a faixa de pH escolhida para se utilizar nos experimentos de cinética de liberação *in vitro* e de permeação em pele *ex vivo* da CUR. Os dados obtidos para as membranas secas e intumescidas em solução tampão fosfato pH 7,4 estão representados na **Figura 28** e **Tabelas 7** e **8**.<sup>93</sup>

**Figura 28.** Ensaio de tensão vs deformação para as membranas de QTS e XY nas condições **(A)** secas ambientadas a 58% de umidade e **(B)** intumescidas em meio fisiológico simulado de pH 7,4.



**Tabela 7.** Propriedades mecânicas das membranas de QTS e XY secas.

Formulação (n=5)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Elongação Máxima (%)
Q100	1435,0 ± 227,2 <sup>a,b</sup>	27,68 ± 2,11 <sup>a</sup>	16,63 ± 2,00
Q80	2655,5 ± 216,1 <sup>c</sup>	49,54 ± 1,65	3,19 ± 0,37 <sup>a,b,c</sup>
Q60	2686,5 ± 596,5 <sup>c</sup>	41,66 ± 1,39	1,88 ± 0,54 <sup>a,d,e</sup>
Q50	1284 ± 186,3 <sup>a,d</sup>	25,08 ± 3,78 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,36 <sup>b,d,f</sup>
Q40	890,1 ± 143,5 <sup>b,d</sup>	16,28 ± 2,26	3,61 ± 0,82 <sup>c,e,f</sup>

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

A partir da **Figura 28-A** e da **Tabela 7** verificou-se que a adição de 20 e 40% de XY à composição das membranas de QTS torna o material mais rígido, pois houve aumento dos módulos de elasticidade e tensão máxima, enquanto a elongação máxima diminuiu quando comparado a membrana de QTS pura. Isso se deve a maior cristalinidade do material proveniente das moléculas de XY adicionadas à estrutura de QTS. Outra observação interessante é que a membrana Q80 foi a formulação que mais suportou o *stress* mecânico aplicado nos ensaios, visto sua tensão máxima de 49,54 MPa. Indicando que a proporção de 20% de XY adicionadas à estrutura da QTS propicia maior resistência ao material dentre as misturas analisadas.<sup>92,94</sup>

No entanto, ao se comparar as membranas Q50 e Q40 a de QTS pura nota-se que houve efeito contrário, pois, o módulo de elasticidade e tensão máxima diminuiram enquanto o alongamento máximo aumentou. Esses resultados indicam que essas membranas apresentaram menor resistência à deformação e maior flexibilidade, ou seja, a XY atuou como um agente plastificante na estrutura da QTS.<sup>92,94</sup>

De acordo com os dados contidos na **Tabela 8** ao submergir as membranas em solução tampão fosfato pH 7,4 as propriedades mecânicas são alteradas quando compara-se com as informações encontradas no ensaio de membranas secas.

**Tabela 8.** Propriedades mecânicas das membranas de QTS e XY intumescidas com solução de tampão fosfato pH 7,4.

Formulação (n=5)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Elongação Máxima (%)
Q100	0,59 ± 0,16 <sup>a,b</sup>	0,40 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	65,21 ± 3,28
Q80	6,92 ± 1,09 <sup>a,c,d</sup>	1,92 ± 0,30	19,88 ± 2,25
Q60	11,49 ± 1,44 <sup>b,c,e</sup>	1,00 ± 0,32 <sup>a,c</sup>	8,61 ± 1,45 <sup>a</sup>
Q50	20,85 ± 5,61 <sup>d,e</sup>	0,72 ± 0,33 <sup>b,c</sup>	4,37 ± 1,94 <sup>a</sup>

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

Em geral, os materiais tornaram-se menos maleáveis pela retenção de água, que atuou como um plastificante, visto que os módulos de elasticidade diminuíram drasticamente, enquanto as elongações máximas aumentaram de forma considerável. Neste ensaio observou-se tendência semelhante à determinação de grau de intumescimento realizado nesta faixa de pH, pois as membranas que mais intumescem tiveram maior efeito plastificante da água retida nas estruturas. A adição de XY às membranas de QTS se mostrou positiva, pois apresentaram maior resistência ao *stress* mecânico quando comparado a QTS pura. A formulação Q80 apresentou a maior tensão máxima suportada (1,92 MPa) dentre as membranas analisadas, mesmo após o processo de intumescimento pela água. Essa característica se torna interessante para a aplicação do material como um curativo para ferimentos, especialmente a formulação Q80, visto que no processo de regeneração tecidual há fluídos expelidos que devem ser absorvidos pela membrana.<sup>92,95</sup>

Uma membrana adequada para aplicação como curativo de pele precisa ser maleável, ter capacidade de intumescer em contato com fluídos biológicos para liberar os compostos ativos e absorver os exsudatos da pele e também apresentar boa resistência mecânica para auxiliar a troca dos curativos. As análises de XRPD e microscopia PLOM demonstraram que a formulação Q80 possui o menor grau de cristalização do sistema. Já nos ensaios de dissolução e intumescimento se observou que a formulação apresentou os menores graus de dissolução e maiores graus de intumescimento nos pH 5,5 e 7,4 dentre as proporções de misturas. Adicionalmente, também foi a membrana com maior flexibilidade e resistência ao

*stress* mecânico, como observado nos ensaios mecânicos. Ao se analisar todas as caracterizações e ensaios realizados nas membranas contendo QTS e XY se notou que a proporção entre QTS-XY que mais apresentou propriedades importantes para as aplicações desejadas foi a Q80, sendo a formulação escolhida para realizar o enriquecimento com CUR e PIP.<sup>93</sup>

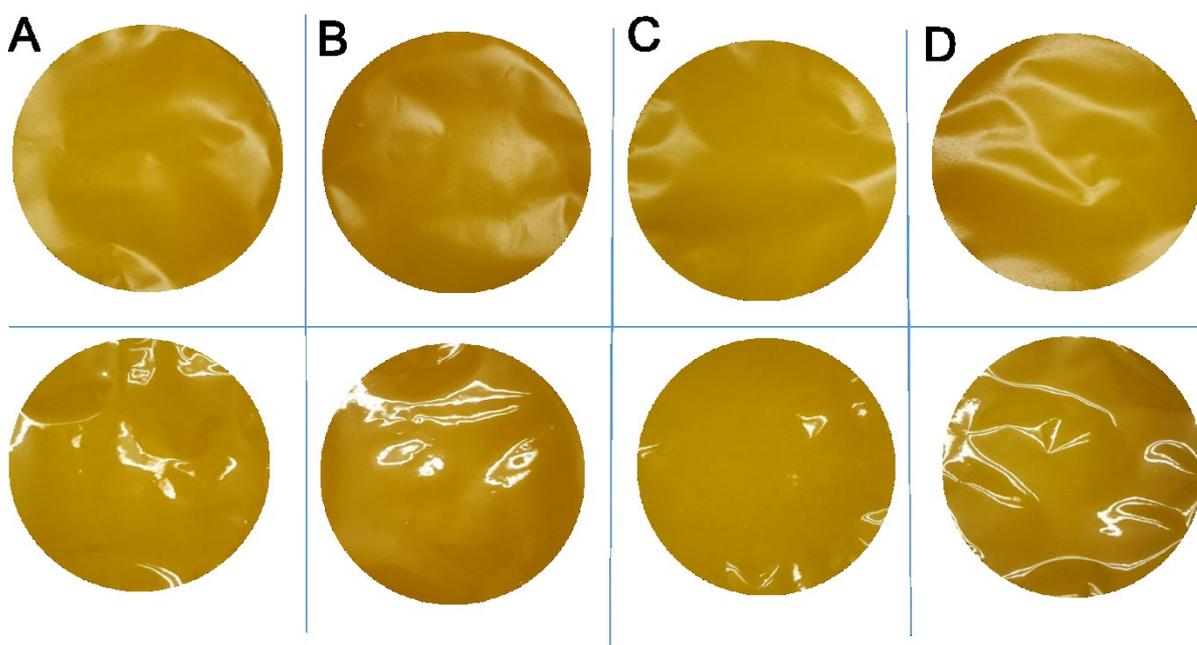
#### 4.4. MEMBRANAS CARREGADAS COM CUR E PIP

##### 4.4.1. Preparo das membranas de QTS e XY contendo CUR e PIP

Inicialmente realizou-se produção de membranas de QTS e XY com o sistema micelar de P123, CUR e PIP. Após o processo de secagem e algumas caracterizações (como Espectroscopia de UV-Vis e DSC) verificou-se que o sistema de 5 componentes se tornaria muito complexo para realização dos estudos em tempo viável para finalização do trabalho em tempo correto. Isso se deve também ao fato de que nos estudos prévios de fluorescência observou-se competição entre CUR e PIP para interagir com as moléculas de P123, o que tornaria o processo de quantificação de CUR mais dificultoso. Por isso, tomou-se a decisão de eliminar o uso de P123 no sistema a fim de focar o estudo nas interações entre CUR e PIP na matriz polimérica utilizada como carreamento dos compostos ativos.

As membranas contendo CUR e PIP foram produzidas utilizando a formulação Q80 previamente estudada, que apresentou as melhores características para as aplicações almejadas para o sistema. Para fins de comparação, produziu-se também membranas Q100 para analisar como a adição de XY poderia alterar o sistema. Imagens das membranas produzidas podem ser observadas na **Figura 29**. O tempo de secagem das membranas variou de 2-4 dias, dependendo das condições climáticas do dia de produção.

**Figura 29.** Imagens das membranas **(A)** Q100-CUR; **(B)** Q100-CUR-PIP; **(C)** Q80-CUR e **(D)** Q80-CUR-PIP da superfície de secagem (cima) e da parte inferior (baixo) das membranas.



Em geral, todas as membranas apresentaram coloração alaranjada própria da presença de CUR, boa maleabilidade e matriz resistente, não sendo notável diferença de tonalidade de cor entre elas. A homogeneidade das membranas foi quantificada como  $87,0\% \pm 1,5$  através de espectroscopia de fluorescência. Notou-se aspecto distinto das membranas puras de QTS e XY, pois a parte superior da membrana tinha aspecto opaco e a parte inferior aspecto brilhoso. Isso pode indicar uma preferência de deposição da CUR na parte superior, que pode ser avaliada através de técnica de FTIR. A espessura média das membranas foi determinada com micrômetro e obteve-se valores entre 85-105  $\mu\text{m}$ , sendo ligeiramente mais espessas que as membranas puras.

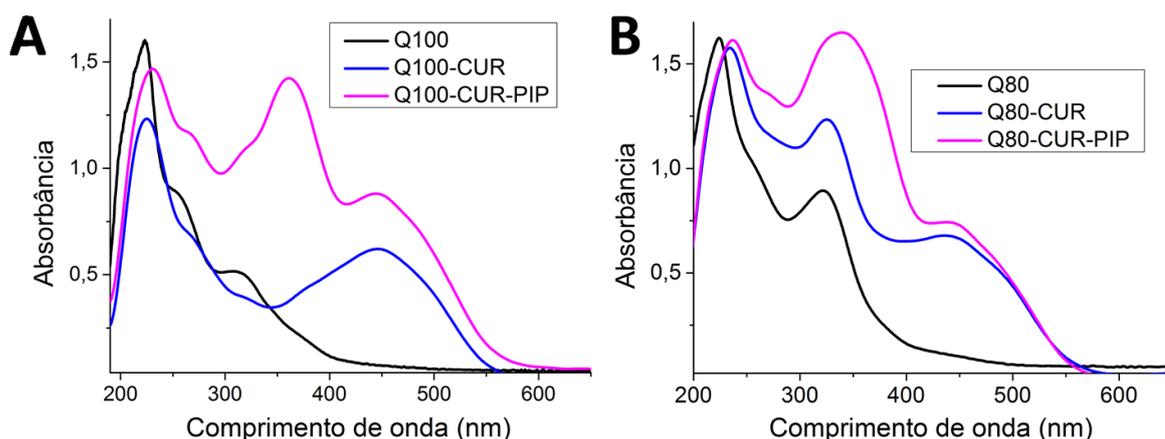
#### 4.4.2. Caracterizações das membranas contendo CUR e PIP

##### 4.4.2.1. Espectroscopia de UV-Vis

Os espectros de UV-Vis para as membranas enriquecidas com CUR e PIP foram obtidos para analisar possíveis alterações decorrentes das adições de cada componente às matrizes poliméricas puras. A **Figura 30** mostra os espectros analisados a partir das membranas Q100 e Q80. Analisou-se os lados de cima e de

baixo das membranas enriquecidas com CUR e PIP devido a diferença visual macroscópica observada e discutida no item 4.4.1, e não se observou diferenças entre os espectros obtidos para cada formulação produzida.

**Figura 30.** Espectros de UV-Vis para as membranas **(A)** de Q100, CUR e PIP e **(B)** de Q80, CUR e PIP.



Observou-se modificações nos espectros das membranas puras após adição de CUR e CUR-PIP nas formulações. Na literatura encontra-se o valor de 450 nm para absorção máxima de CUR em água, sendo gerado pela transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Para PIP se encontra o comprimento de onda máximo de absorção em 340 nm. Nos espectros obtidos notou-se a presença de bandas de absorção características para os compostos. A banda de absorção máxima da CUR que se encontra em 450 nm se torna mais intensa com a adição de PIP. Podendo indicar uma melhora de solubilidade no sistema através de modificações estruturais geradas pela interação dos dois compostos. No espectro de Q80 se encontra a banda de absorção aumentada pela presença de moléculas de XY, próximo a 325 nm. Essa banda torna-se mais larga com a adição de PIP que absorve em região espectral próxima, representando sobreposição das bandas de absorção. As observações indicam sucesso em incorporar os ativos nas matrizes poliméricas puras.<sup>96</sup>

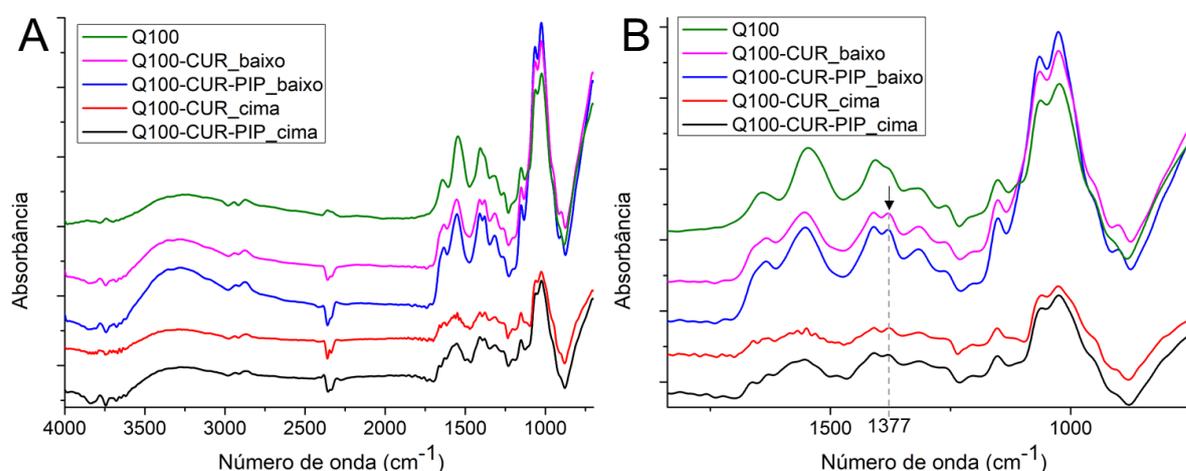
#### 4.4.2.2. Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As membranas das formulações Q100 e Q80 enriquecidas com CUR e PIP foram analisadas através de espectroscopia de infravermelho a fim de verificar possíveis alterações dos grupos funcionais característicos dos componentes puros a partir de interações intermoleculares. Medidas foram feitas para a superfície de cima

e de baixo para cada formulação, visto a diferença visual observada e discutida previamente no item 4.4.1.

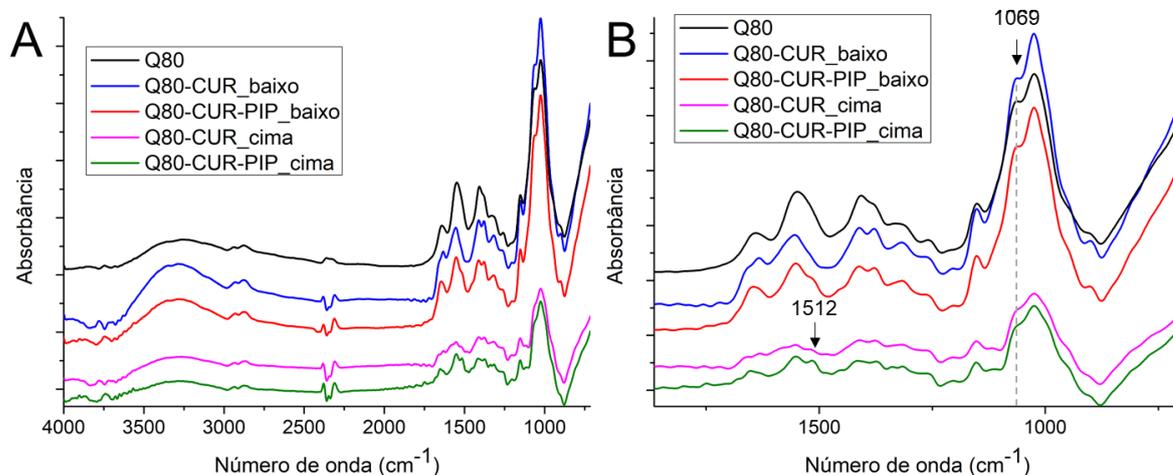
Nas **Figuras 31 e 32** constam os espectros de FTIR para as membranas produzidas a partir da formulação Q100 e Q80, respectivamente. Foi possível observar diferenças espectrais entre as análises dos lados de cima e de baixo das membranas contendo CUR e PIP.

**Figura 31. (A)** Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membranas de Q100 contendo CUR e PIP. **(B)** Aproximação do espectro na região de 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ .



Em geral, os lados de baixo apresentaram espectro muito semelhante aos das formulações puras, sendo notável apenas pequeno aumento de intensidade de absorvância na banda de  $1377 \text{ cm}^{-1}$ , que é característica de deformação simétrica de grupo  $\text{CH}_3$ . Os espectros dos lados de cima apresentaram alterações significativas, sendo indicativo de interações entre os grupos O-H e N-H de CUR e QTS. Isso pode ser verificado a partir da diminuição de intensidade de absorção e sobreposição das bandas características do estiramento do grupo C=O e do dobramento do grupo N-H das aminas primárias da QTS, encontradas nas regiões de  $1653$  e  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Assim como, menor intensidade de absorção nas bandas de  $1163 \text{ cm}^{-1}$  (C-O-C) e nas bandas de  $1069$  e  $1023 \text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento de grupo C-O da QTS. Nota-se também na **Figura 31** o surgimento de uma banda em  $1630 \text{ cm}^{-1}$  sendo representativa do grupo C=O presente na CUR e na PIP.<sup>97</sup>

**Figura 32. (A)** Espectros de FTIR obtidos via modo ATR para membranas de Q80 contendo CUR e PIP. **(B)** Aproximação do espectro na região de 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ .



Na **Figura 32** observa-se a diminuição de intensidade de absorção da banda de 1069  $\text{cm}^{-1}$ , que é representativa da presença de XY na matriz polimérica, ao se comparar com a membrana de Q100. Os espectros obtidos para lados de cima e de baixo seguem o mesmo perfil do que se discutiu acima. Além disso, nota-se o surgimento de uma nova banda na membrana de lado de cima para a formulação contendo CUR e PIP na região de 1512  $\text{cm}^{-1}$ , sendo atribuída a vibrações do grupo C=O de CUR.<sup>42</sup>

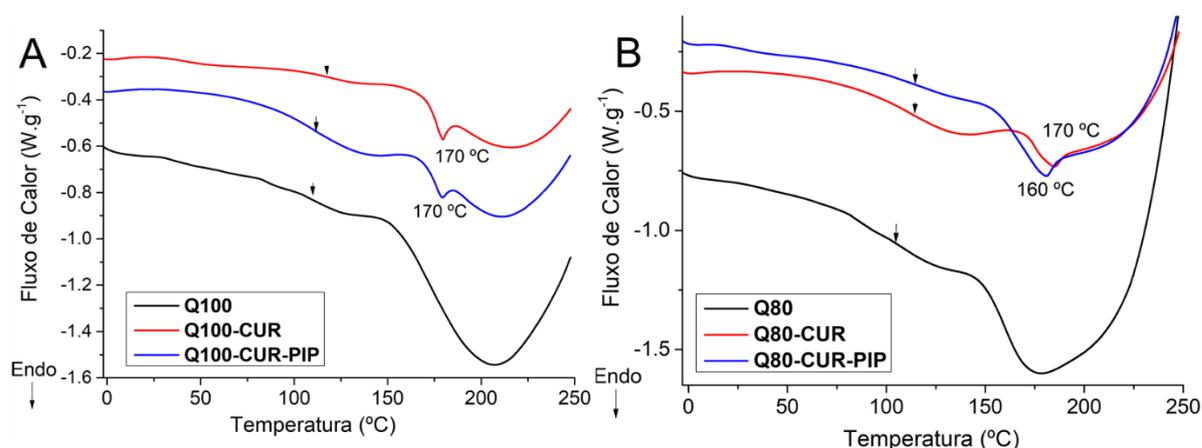
Não foi possível observar alterações espectrais ao se comparar formulações contendo CUR e PIP, possivelmente pelo fato de que as interações intermoleculares que ocorrem entre os dois compostos serem fracas, como as forças de van der Waals.

A partir dessas observações se percebe que há preferência de deposição da CUR no lado de cima das membranas durante o processo de secagem do solvente utilizado, ou seja, há maior concentração de CUR na parte opaca das matrizes geradas. Isso pode ser explicado pelo trajeto realizado pelo solvente no interior das membranas conforme ocorre o processo de sua evaporação, causando o transporte do composto ativo até a superfície de cima do material. Portanto, ao se realizar possíveis aplicações da membrana para tratamento de ferimentos de pele, deve-se priorizar o contato da pele com o lado de maior concentração, a fim de se otimizar as propriedades do ativo em termos de atividade e permeabilidade.

#### 4.4.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Analisou-se as curvas calorimétricas das membranas compostas por QTS e XY enriquecidas com CUR e PIP através de técnica de DSC. Os polímeros utilizados nas membranas são majoritariamente amorfos e não apresentam fenômenos térmicos relacionados a fusão. Tal efeito é apenas observado para os compostos CUR e PIP, sendo anteriormente determinado que apresentam  $T_m$  em 174,3 °C e 127,5 °C, respectivamente. Para melhor observar os efeitos térmicos de biopolímeros se torna necessário realizar duas corridas no DSC. A primeira corrida é realizada para apagar a memória térmica das cadeias poliméricas e após uso da técnica de *quench cooling*, que consiste em realizar aquecimento e posterior resfriamento do material, se realiza a segunda corrida. Na **Figura 33** se observam as curvas de DSC para as membranas contendo CUR e PIP.

**Figura 33.** Curvas de DSC das segundas corridas para **(A)** Q100-CUR e Q100-CUR-PIP e **(B)** Q80-CUR e Q80-CUR-PIP.



A determinação das duas transições vítreas observadas nas curvas de Q100 e Q80 foi afetada pela adição de CUR, visto sobreposição de fenômeno endotérmico de fusão da CUR na mesma região. Quanto a adição de PIP nas formulações, não se observou o evento de fusão característico nas curvas das membranas analisadas. Apesar disso, foi possível determinar as  $T_{g1}$  da QTS e os valores encontram-se na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Temperaturas de transição vítrea (Tg) das curvas de DSC das membranas Q100 e Q80 puras e enriquecidas com CUR e PIP.

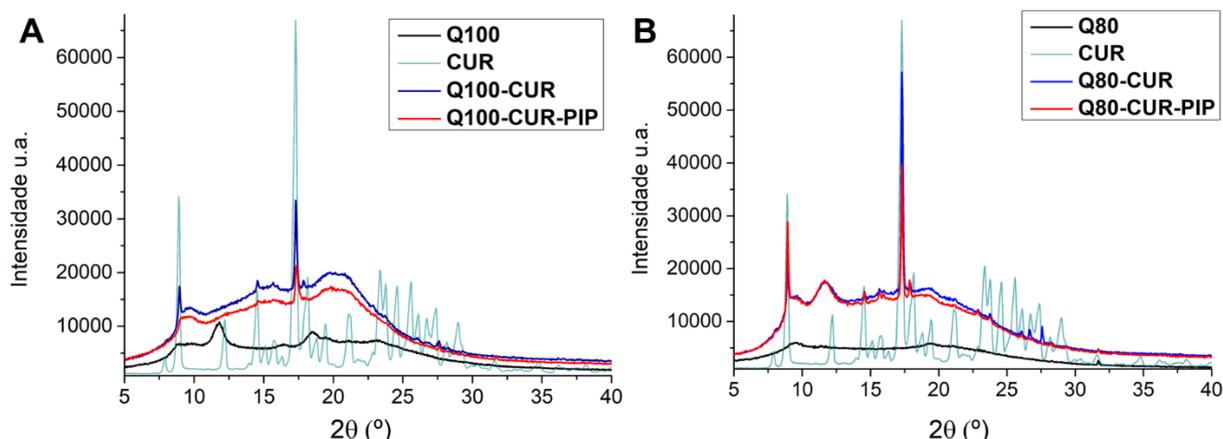
Formulação	Tg <sub>1</sub> (°C) QTS	T <sub>m</sub> (°C) CUR
<b>Q100</b>	108,0	-
<b>Q100-CUR</b>	118,0	171,0
<b>Q100-CUR-PIP</b>	110,0	170,0
<b>Q80</b>	103,0	-
<b>Q80-CUR</b>	114,0	170,0
<b>Q80-CUR-PIP</b>	115,0	160,0

Observa-se que a presença de CUR e PIP nas matrizes gerou aumento de temperatura de transição vítrea da QTS. Indicando interação entre os constituintes que possibilita maior compactação na matriz polimérica devido o menor volume livre entre as cadeias. Outra observação interessante é que a T<sub>m</sub> da CUR teve redução similar dentre as formulações, sendo a maior modificação observada em Q80-CUR-PIP. Com isso, se infere que com a sua incorporação na matriz de QTS ocorre alteração na estrutura cristalina da CUR para uma configuração mais amorfa. O efeito de alteração de temperatura de fusão da CUR em membranas compostas por QTS também foi observado em estudos conduzidos por Parize *et al*, em que se notou que a presença do ativo na matriz de QTS possibilita interações que geram deslocamento do pico endotérmico da CUR para menores temperaturas por se ter um sistema mais amorfo.<sup>28,98,99</sup>

#### 4.4.2.4. Difração de pó por raio-X (XRPD)

Análises de XRPD foram realizadas nas membranas de QTS e XY enriquecidas com CUR e PIP para observar diferenças nos padrões de difração gerados pelas interações dos compostos em cada formulação. Na **Figura 34** constam os difratogramas obtidos para os compostos puros e para as formulações de misturas.

**Figura 34.** Padrões de XRPD para **(A)** XY, QTS e CUR puros e **(B)** membranas contendo misturas de CUR e PIP.



Pode-se notar que os picos de cristalização de maior intensidade no difratograma de CUR ocorrem em  $8,90^\circ$ ,  $14,50^\circ$ ,  $17,30^\circ$  e  $23,4^\circ$ , entre outros de menor intensidade, indicando um material altamente cristalino. Ao se adicionar CUR nas formulações de Q100 e Q80 observa-se presença dos picos de  $8,90^\circ$  e  $17,30^\circ$  característicos em menor intensidade e desaparecimento dos demais picos de cristalização, indicando maior amorfização do composto em decorrência de sua incorporação às matrizes poliméricas. Observa-se que ao acrescentar PIP nas formulações ocorreu pequena diminuição de intensidade dos picos de CUR. Isso pode indicar que a interação entre CUR-PIP gera material com características mais amorfas do que nas membranas com os componentes puros. As diferenças observadas nos padrões de difração são mais pronunciadas nas membranas de Q100, sendo indicativo de maior capacidade de interação com os compostos ativos quando se compara com as formulações de Q80.<sup>59,85</sup>

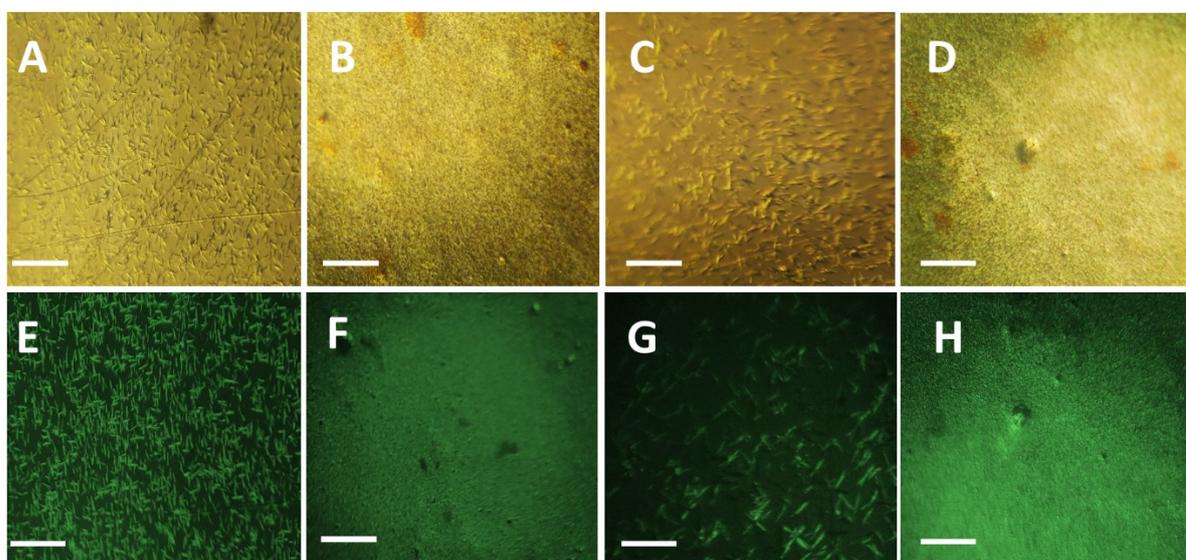
Para obter mais informações sobre diferenças na cristalinidade e dispersão de CUR nas membranas pode se utilizar da técnica de microscopia ótica convencional e com luz polarizada.

#### 4.4.2.5. Microscopia ótica com luz polarizada (PLOM)

As membranas foram analisadas através de microscópio de ótica convencional e com filtro polarizador de luz a fim de observar possíveis características diferentes nas matrizes poliméricas geradas pela presença de compostos cristalinos provenientes da adição de CUR e PIP. O fenômeno de

birrefringência que ocorre ao se utilizar o filtro de luz polarizada permite observar regiões claras e escuras na superfície da membrana, sendo regiões representativas de materiais cristalinos e amorfos, respectivamente. A **Figura 35** mostra as microscopias obtidas para cada membrana.

**Figura 35.** Microscopia ótica convencional (parte superior) e microscopia de luz polarizada (parte inferior) das membranas **(A,E)** Q100-CUR; **(B,F)** Q100-CUR-PIP; **(C,G)** Q80-CUR e **(D,H)** Q80-CUR-PIP. As barras em branco indicam tamanho de 200  $\mu\text{m}$ .



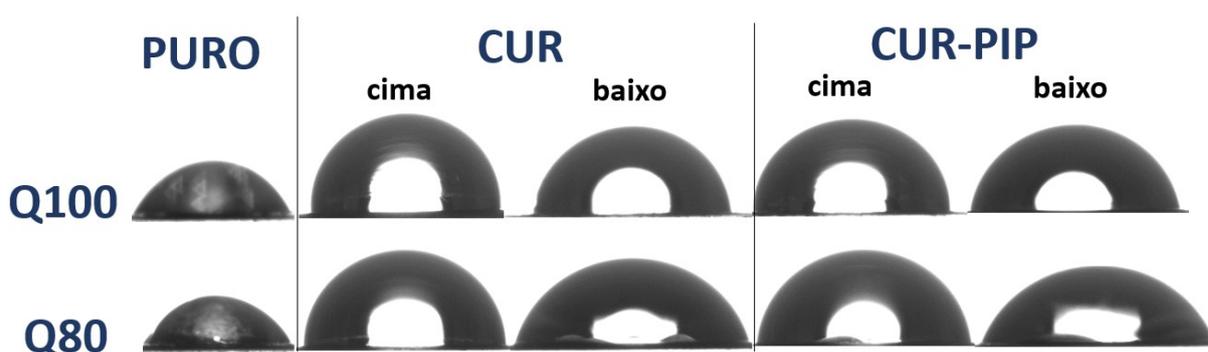
A partir das microscopias de ótica convencional se observa que as membranas que eram originalmente incolores apresentaram coloração amarelada. Adicionalmente, nota-se em E e G a presença de material cristalino disperso nas matrizes poliméricas com aspecto característico de cristais de CUR, sendo mais um indício da efetiva incorporação do composto. Na membrana de formulação Q100-CUR se nota material cristalino de menor tamanho, podendo indicar uma melhor solubilização e dispersão.<sup>101,102</sup>

A adição de PIP às formulações tornou a CUR mais amorfa e conseqüentemente melhor dispersa na matriz, sendo observável na mudança do formato estrutural e tamanho dos materiais cristalinos, que é evidenciada nas análises com luz polarizada. Isso é justificável pela capacidade de PIP de atuar como promotor de solubilidade através de interações intermoleculares fracas com a CUR, como a de van der Waals.<sup>103</sup>

#### 4.4.2.6. Molhabilidade por ângulo de contato

A técnica de ângulo de contato foi realizada nas superfícies de cima e de baixo das membranas para determinar a molhabilidade de cada material. Conforme discutido no item 4.3.7, se torna importante conhecer o grau de hidrofobicidade das membranas a serem utilizadas como curativos em ferimentos de pele, pois o material precisa ter a capacidade de absorver fluídos expelidos pela pele durante o processo de renovação celular. A **Figura 36** mostra as fotografias geradas no software para cada gota de água pingada na superfície das membranas contendo CUR e PIP.<sup>83</sup>

**Figura 36.** Fotografias obtidas nos ensaios de ângulo de contato das gotas de água nas superfícies das membranas contendo CUR e PIP.



A partir das fotografias se determinou os ângulos de contato de cada gota e as médias das leituras constam na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Ângulos de contato determinados para as membranas de QTS, XY, CUR e PIP.

Formulação (n=10)	Ângulo de Contato (°)	
	Lado de Cima	Lado de Baixo
Q100	55,25 ± 0,98	
Q100-CUR	95,05 ± 0,08	82,94 ± 0,03
Q100-CUR-PIP	84,01 ± 0,22	79,27 ± 0,11
Q80	53,13 ± 0,96	
Q80-CUR	85,60 ± 0,21	76,55 ± 0,12
Q80-CUR-PIP	83,70 ± 0,26	76,16 ± 0,48

As membranas puras de Q100 e Q80 apresentaram alta hidrofiliicidade com baixos ângulos de contato. Ao se adicionar CUR nas formulações houve aumento proporcional da hidrofobicidade da superfície analisada, em decorrência da propriedade de baixa solubilidade em água da CUR. O grau de ângulo de contato determinado é maior nos lados de cima de todas as membranas, indicando preferência de deposição da CUR no lado superior, corroborando com as observações macroscópicas e análises de FTIR.<sup>104-106</sup>

Com a adição de PIP se observa em geral menor grau de ângulo de contato, o que se deve a maior solubilidade em água da PIP quando comparado à CUR. Portanto, a CUR diminui a molhabilidade do material, porém com a presença de PIP nas formulações esse efeito é reduzido e a molhabilidade foi melhorada nessas membranas. A maior eficácia de adesão celular para membranas poliméricas ocorre com materiais com ângulo de contato na faixa de 40-80°, e as membranas produzidas exibem ângulos de contato apropriados para a aplicação desejada, sendo que as formulações de Q80 apresentaram os valores mais adequados.<sup>104-106</sup>

#### 4.4.2.7. Determinação de grau de dissolução das membranas

O grau de dissolução das membranas contendo CUR e PIP foi determinado em estudo de 24 h ao se adicionar amostras de cada membrana em soluções tamponadas com pH 5,5 e 7,4. A integridade física de uma membrana quando em contato com meio líquido é uma das características mais importantes para que possa ser utilizada como um curativo de pele com ferimento, devido a presença de exsudatos durante seu processo natural de renovação. Os graus de dissolução (%) das membranas consta na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Grau de dissolução (%) das membranas Q100 e Q80 contendo CUR e PIP em soluções tampão acetato pH 5,5 e fosfato pH 7,4 a 37 °C após 24 h.

<b>Formulação</b>	<b>G.D. (%) pH 5,5</b>	<b>G.D. (%) pH 7,4</b>
Q100	62,6 ± 3,70	3,11 ± 0,80
Q100-CUR	54,3 ± 1,52	2,35 ± 1,17
Q100-CUR-PIP	57,7 ± 2,21	8,62 ± 2,12
Q80	20,2 ± 1,51	18,1 ± 0,93
Q80-CUR	12,8 ± 1,62	9,73 ± 0,73
Q80-CUR-PIP	14,8 ± 1,28	12,6 ± 0,64

Após o término do experimento notou-se que as membranas de Q100 apresentaram altos graus de dissolução em pH 5,5 e o material se tornou pouco maleável, o que não é desejável para um curativo de ferimentos de pele. Dessa forma, as formulações de Q80 são preferíveis para a aplicação almejada.

Pode-se observar que tanto no pH 5,5 quanto no pH 7,4 os graus de dissolução de Q100 e Q80 decresceram ao se acrescentar CUR nas formulações, sendo um indício da efetiva incorporação do composto nas matrizes poliméricas e de melhora da estabilidade do material nos meios líquidos estudados.

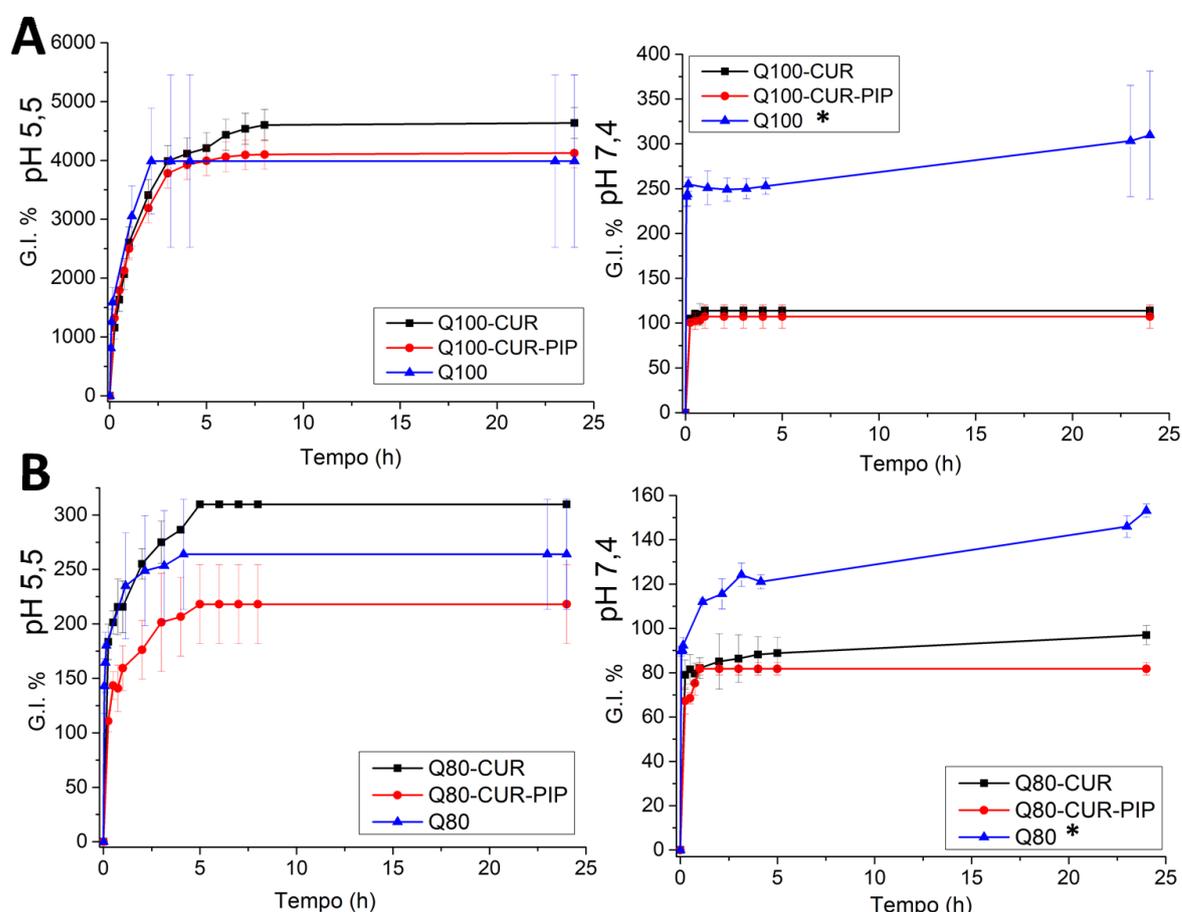
Com a adição de PIP nas soluções filmogênicas o grau de dissolução aumentou ao se comparar com as membranas contendo apenas CUR. A possível interação entre CUR-PIP pode tornar o sistema mais amorfo, favorecendo interações com as moléculas de água presentes no meio e consequente dissolução da membrana. Apesar disso, o grau de dissolução para essas formulações foi menor do que dos sistemas puros, evidenciando-se um aumento da estabilidade das membranas.<sup>40</sup>

As observações obtidas através deste experimento e do estudo de ângulo de contato forneceram mais informações sobre a estabilidade e molhabilidade das membranas nos dois pHs simulados ao da pele, havendo concordância entre as tendências observadas em ambos experimentos. Observou-se a efetiva incorporação da CUR e PIP nas membranas produzidas a partir de Q100 e Q80. Adicionalmente se notou que o sistema Q80 mostrou-se como sendo o sistema com o melhor perfil para a aplicação desejada.

#### 4.4.2.8. Determinação de grau de intumescimento

Os perfis de grau de intumescimento das membranas produzidas a partir de Q100 e Q80 enriquecidas com CUR e PIP foram obtidos em duplicata. Os estudos foram conduzidos em soluções tamponadas de pH 5,5 e 7,4, sendo pH simulado de pele saudável e com ferimentos, respectivamente, e as amostras foram mantidas sob aquecimento de 37°C durante 24 h para determinar a capacidade de absorção de líquidos destes materiais. A **Figura 37** mostra os perfis de intumescimento nos dois pHs estudados para as membranas feitas a partir da formulação Q100 e Q80.

**Figura 37.** Perfil de intumescimento das formulações **(A)** Q100-CUR e Q100-CUR-PIP e **(B)** Q80-CUR e Q80-CUR-PIP em função do tempo em pH 5,5 e 7,4 a 37 °C.



\* Indica que valores médios com diferenças estatisticamente significativas entre os graus de intumescimento, de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

No pH 5,5 as membranas puras e carregadas com CUR e PIP apresentaram maiores graus de intumescimento ao se comparar com os experimentos realizados no pH 7,4. No pH mais ácido a QTS possui maior volume livre entre as cadeias poliméricas, tendo sua capacidade de absorção de água aumentada. Já no pH 7,4 as moléculas de QTS se agregam mais facilmente, dificultando a difusão de moléculas de água e de CUR para o interior da matriz polimérica. Esse efeito também é observado nas membranas contendo XY, e adicionalmente, as capacidades de absorção de água são drasticamente reduzidas pela interação eletrostática dos dois polímeros.<sup>107,108</sup>

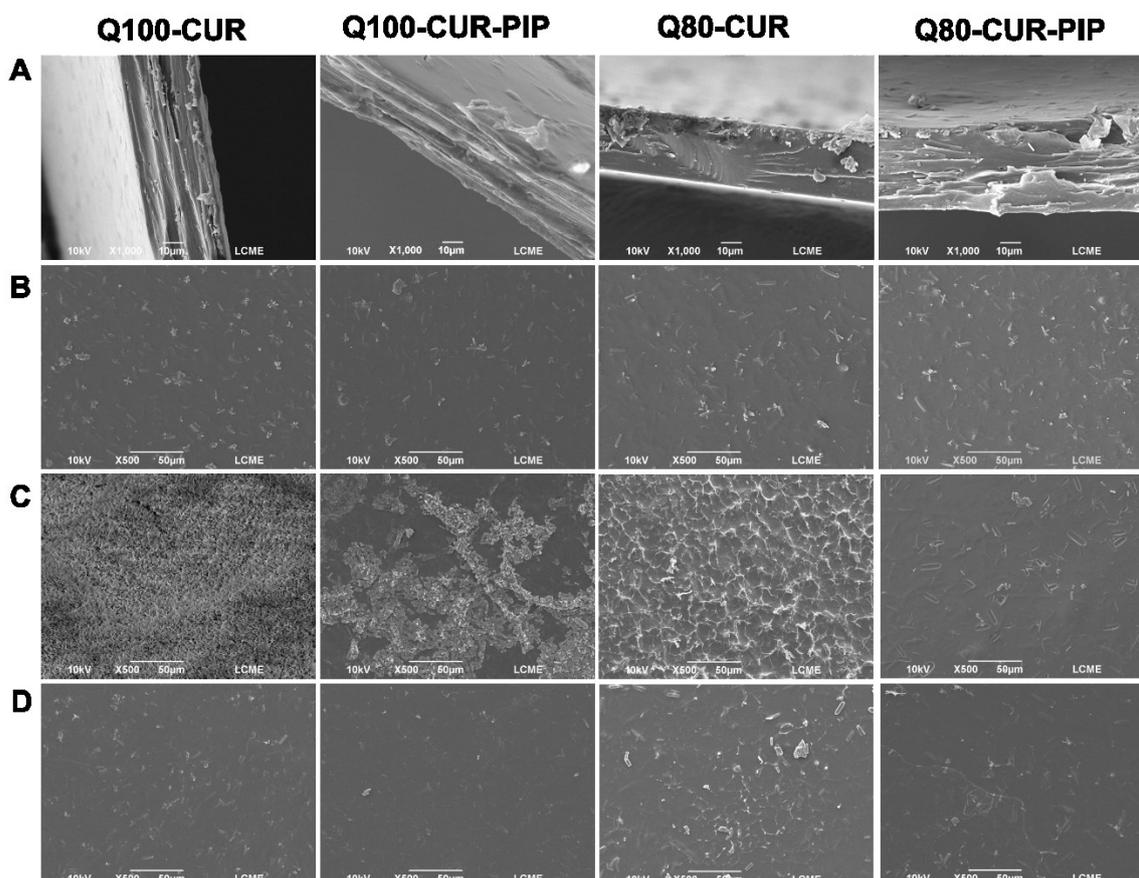
As amostras das formulações produzidas a partir de Q100 contendo CUR e PIP não apresentaram diferença estatística dentre suas médias de G.I.%. Já a membrana Q80-CUR-PIP teve comportamento diferente das demais formulações. Com a adição de CUR e PIP nas formulações os graus de intumescimento determinados foram menores em ambos pHs. A interação intermolecular entre CUR e PIP pode gerar complexos com melhor compactação e assim reduzir as possíveis ligações de hidrogênio entre CUR e QTS. Com isso, o efeito de agregação das cadeias poliméricas é maior e o volume livre para absorção de água menor.<sup>86,107,108</sup>

Após término dos ensaios de intumescimento as amostras foram congeladas para posterior liofilização e análise SEM para analisar mudanças morfológicas geradas pela absorção de água.

#### 4.4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Membranas secas e intumescidas em soluções tampão de pH 5,5 e 7,4 foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura para observar modificações morfológicas ocorridas após absorção de água e processo de liofilização. As microscopias SEM das membranas analisadas estão contidas na **Figura 38**.

**Figura 38.** Microscopias SEM de **(A,B)** fratura e superfície para membranas secas, respectivamente e **(C,D)** superfície das membranas após intumescimento em pH 5,5 e 7,4, respectivamente. As escalas utilizadas foram de 50  $\mu\text{m}$  para microscopias de superfície e 10  $\mu\text{m}$  para as de fratura.



Nas imagens de fratura de Q100-CUR e Q80-CUR nota-se similaridade com morfologias e rugosidades das membranas puras, sendo visível a presença de material cristalino característico de CUR e de outros pequenos aglomerados dispersos no interior da matriz polimérica. Já nas imagens das membranas contendo PIP se observa que houve aumento moderado da rugosidade do material após processo de fratura. Além disso, a matriz apresentou menor quantidade de cristais insolúveis dispersos no seu interior, sendo um indício de melhor solubilização dos compostos ativos nas soluções filmogênicas.

As superfícies de todas as membranas secas apresentaram características morfológicas similares, com matriz contínua e alta concentração de cristais não dissolvidos de CUR, estando de acordo com o que se observou na microscopia PLOM.

As microscopias obtidas para as membranas que foram intumescidas e liofilizadas em pH 5,5 (C) e pH 7,4 (D) mostram interessantes propriedades para cada formulação. É visível a diferença de rugosidade e da quantidade de pequenos aglomerados encontrados na superfície das amostras dos experimentos em pH 5,5. Uma possível explicação para o aparecimento de tais aglomerados seria o acúmulo de sais de acetato provenientes da solução tampão utilizada no experimento. Neste pH se observam as maiores diferenças de morfologia, sendo efeito mais intenso nas membranas Q100-CUR e Q80-CUR. No entanto, não houve início de dissolução do material como foi observado nas microscopias das membranas puras de Q100, indicando maior proteção pela presença de CUR e PIP frente ao processo de absorção de água. Já a modificação estrutural nas amostras dos ensaios de pH 7,4 foi consideravelmente menor e notou-se também maiores alterações nas membranas contendo apenas CUR.

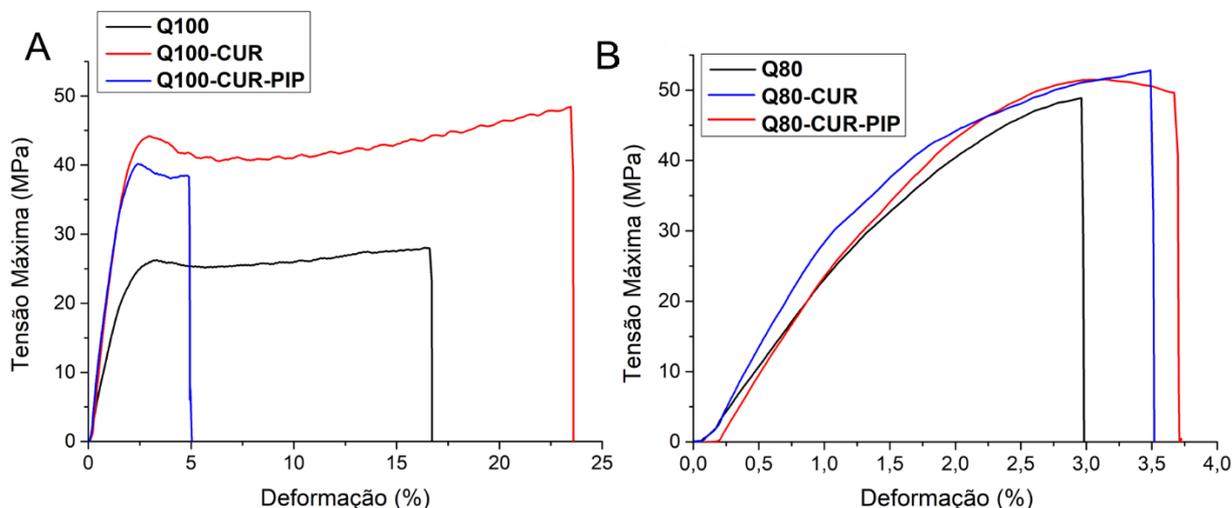
As análises de microscopia SEM apresentaram maiores informações sobre as propriedades microscópicas e sobre mudanças que ocorrem em suas morfologias após o intumescimento do material polimérico. Tais informações estão de acordo com o que se observou em todas as caracterizações, especialmente nos estudos de microscopia PLOM e de determinação de grau de dissolução e de intumescimento.

#### 4.4.2.10. Ensaio de tensão vs deformação

O estudo das propriedades mecânicas das membranas produzidas é essencial para obter informações de resistência e maleabilidade, que são características importantes para um material que se deseja aplicar como curativo de pele. Para isso realizou-se ensaios de tensão vs deformação para as formulações contendo CUR e PIP nas condições de membranas secas e ambientadas em atmosfera de 58% e intumescidas em solução tampão de fosfato pH 7,4.

A partir da **Figura 39** se obtém as propriedades mecânicas das membranas secas, que estão compiladas na **Tabela 12**.

**Figura 39.** Ensaio de tensão vs deformação para as membranas **(A)** Q100 e **(B)** Q80 enriquecidas com CUR e PIP nas condições secas ambientadas a 58% de umidade.



**Tabela 12.** Propriedades mecânicas das membranas secas de QTS e XY contendo CUR e PIP.

Formulação (n=5)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Elongação Máxima (%)
Q100	1435,0 ± 227,2 <sup>a</sup>	27,7 ± 2,11 <sup>a</sup>	16,6 ± 2,00
Q100-CUR	2462,1 ± 267,7 <sup>b,e,f</sup>	49,4 ± 2,78 <sup>b,f,g</sup>	24,2 ± 4,89 <sup>a</sup>
Q100-CUR-PIP	1756,8 ± 110,6 <sup>a,g</sup>	38,2 ± 2,89 <sup>a,c</sup>	5,49 ± 1,37 <sup>d,e</sup>
Q80	2655,5 ± 216,1 <sup>b,c,d</sup>	49,5 ± 1,65 <sup>b,c,d,e</sup>	3,19 ± 0,37 <sup>a,b,c</sup>
Q80-CUR	2214,9 ± 254,8 <sup>c,e,g,h</sup>	49,7 ± 2,75 <sup>d,f,h</sup>	3,33 ± 0,45 <sup>b,d,f</sup>
Q80-CUR-PIP	2677,9 ± 274,6 <sup>d,f,h</sup>	51,3 ± 3,15 <sup>e,g,h</sup>	4,26 ± 0,57 <sup>c,e,f</sup>

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

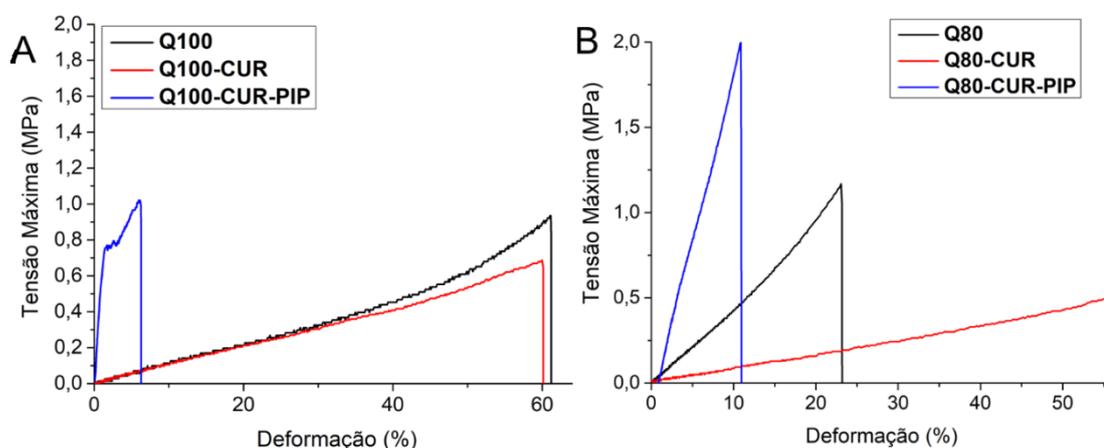
Para as membranas produzidas a partir da formulação Q100 foram observadas as maiores diferenças nas propriedades mecânicas quando secas. Com a adição de CUR houve aumento de módulo de elasticidade, de tensão máxima e de alongação máxima, ou seja, a membrana se tornou consideravelmente mais resistente e também mais flexível. Já com a presença de PIP, a membrana Q100-CUR-PIP apresentou maior rigidez e menor flexibilidade em comparação com a formulação pura, visto aumento de módulo de elasticidade e tensão máxima em conjunto com menor alongação máxima. No entanto, os valores de módulo de

elasticidade e tensão máxima determinados foram menores que a membrana contendo apenas CUR, logo a rigidez é comparativamente menor. Isso pode indicar que em ambas formulações ocorre interação com as cadeias poliméricas de QTS, porém CUR sozinha apresenta interação mais forte com a matriz polimérica do que o complexo CUR-PIP.<sup>92,109</sup>

Já nos ensaios das membranas secas das formulações Q80-CUR e Q80-CUR-PIP não se observou diferenças tão consideráveis nas propriedades mecânicas, sendo suportado pelo tratamento estatístico que demonstrou não haver distinção entre as médias obtidas. Apesar disso, se notou que ao adicionar CUR o material se tornou mais flexível, visto menor valor de módulo de elasticidade e maior alongação máxima. A membrana Q80-CUR-PIP apresentou efeito similar ao observado na membrana Q100-CUR, tendo maiores valores de módulo de elasticidade, tensão máxima e alongação máxima. Logo, para esta formulação, o complexo CUR-PIP apresentou maior interação com a matriz polimérica, gerando a alteração de rigidez e maior resistência ao *stress* mecânico que se observou.<sup>109</sup>

As membranas que passaram por processo de intumescimento em solução tampão pH 7,4 tiveram suas propriedades mecânicas alteradas. Em geral, as membranas se tornaram menos maleáveis e mais frágeis devido a absorção e retenção de água nas matrizes poliméricas. Os efeitos gerados podem ser observados na **Figura 40**.<sup>92</sup>

**Figura 40.** Ensaios de tensão vs deformação para as membranas **(A)** Q100 e **(B)** Q80 enriquecidas com CUR e PIP intumescidas em meio fisiológico simulado de pH 7,4.



**Tabela 13.** Propriedades mecânicas das membranas intumescidas de QTS e XY contendo CUR e PIP em meio fisiológico simulado de pH 7,4.

Formulação (n=5)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Elongação Máxima (%)
Q100	0,59 ± 0,16 <sup>a,b,c</sup>	0,40 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	65,2 ± 3,28 <sup>a</sup>
Q100-CUR	0,88 ± 0,10 <sup>b,d,f</sup>	0,50 ± 0,08 <sup>a,c,f</sup>	58,0 ± 4,35 <sup>a</sup>
Q100-CUR-PIP	40,3 ± 15,2 <sup>g</sup>	1,70 ± 0,64 <sup>d,g</sup>	6,88 ± 1,51 <sup>b</sup>
Q80	6,92 ± 1,09 <sup>a,d,e</sup>	1,92 ± 0,30 <sup>c,d,e</sup>	19,9 ± 2,25
Q80-CUR	0,98 ± 0,14 <sup>c,e,f</sup>	0,46 ± 0,08 <sup>b,f</sup>	47,9 ± 6,78
Q80-CUR-PIP	28,4 ± 3,86 <sup>g</sup>	2,24 ± 0,77 <sup>e,g</sup>	9,34 ± 3,06 <sup>b</sup>

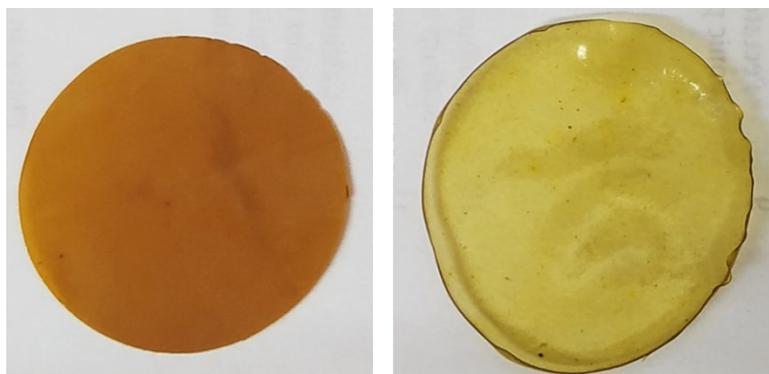
\* Valores médios com mesmas letras sobrescritas em uma determinada coluna não exibem diferença superior a 5% de significância, de acordo com o teste Tukey (ANOVA).

Os dados da **Tabela 13** mostram que nas condições avaliadas as membranas enriquecidas com CUR e PIP apresentaram maiores módulos de elasticidade e menores valores de elongação máxima do que as membranas puras intumescidas, ou seja, possuíam maior resistência a deformação. Esse efeito provavelmente se deve ao menor grau de intumescimento no pH 7,4, estando de acordo com o que foi observado previamente. Outra observação interessante é que mesmo após o intumescimento, as membranas Q100-CUR-PIP e Q80-CUR-PIP tiveram as maiores tensões máximas (1,70 e 2,24 MPa, respectivamente), ou seja, foram as amostras mais resistentes frente a aplicação de *stress* mecânico.

#### 4.4.3. Cinética de liberação *in vitro* das formulações contendo CUR e PIP

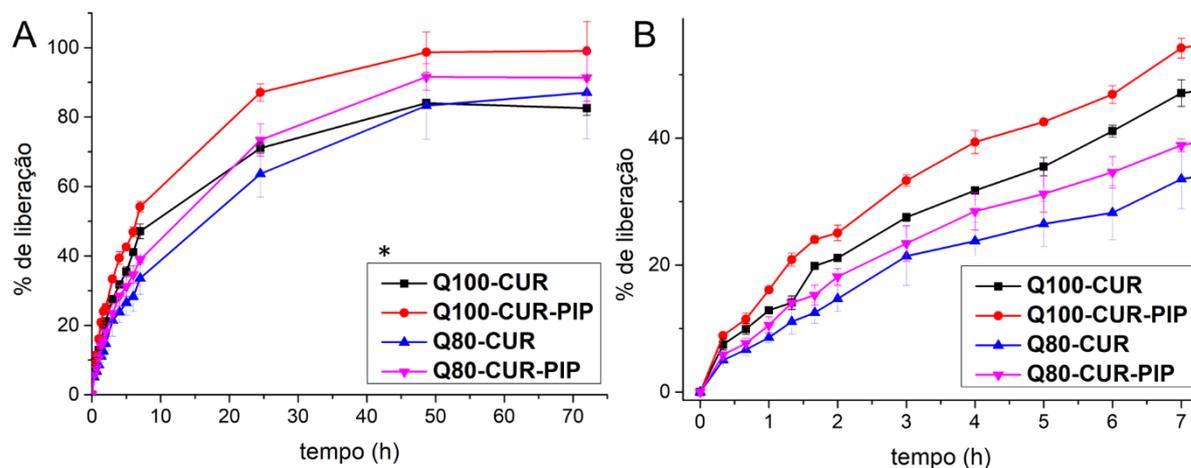
O estudo de cinética de liberação *in vitro* das membranas contendo CUR e PIP foi realizado em meio tamponado PBS em pH 7,4 para simular o pH de pele com ferimentos. Foi acrescentado ao meio líquido 0,5% (v/v) do surfactante não iônico Tween 80 para se melhorar a solubilização da CUR. Essa condição é necessária em estudos de liberação de compostos ativos pois evita que se alcance a concentração de saturação.

**Figura 41.** Imagens de amostra da membrana Q80-CUR-PIP antes e após ensaio de liberação de CUR em solução PBS pH 7,4 e 0,5% de Tween 80 (v/v).



A **Figura 41** mostra imagens da amostra utilizada da membrana Q80-CUR-PIP antes e após conclusão do ensaio. É possível observar mudanças macroscópicas pelo processo de intumescimento, como maior tamanho e maleabilidade, e também a coloração que mudou de laranja para amarelo claro. O surfactante escolhido para auxiliar no controle de solubilização de CUR se demonstrou satisfatório, pois houve liberação efetiva do composto na faixa de 33-55% nas primeiras 7 h de experimento e chegando ao máximo de 83-99% após 50 h, conforme se observa na **Figura 42**. Por ser da classe de surfactante não-iônico, o Tween 80 não afeta as interações eletrostáticas que ocorrem entre os constituintes da membrana.<sup>110</sup>

**Figura 42. (A)** Perfil de liberação da CUR a partir das diferentes formulações de membranas em tampão PBS pH 7,4 contendo 0,5% de Tween 80 (v/v). **(B)** Aproximação da região de 0-7 h de experimento de liberação da CUR.



\* Indicam que valores médios das membranas analisadas não exibem diferença superior a 5% de significância, de acordo com o teste Tukey (ANOVA).

Durante as primeiras 7 h de ensaio de liberação se observou maiores porcentagens de liberação para Q100-CUR e Q100-CUR-PIP. Isso pode ser explicado pelo maior grau de intumescimento apresentado por essas formulações nessa faixa de pH. Adicionalmente se observou que as membranas apresentaram comportamento de liberação prolongada, característica interessante para um material a ser utilizado como curativo. Outra tendência observada até o final do experimento, foi que ambas formulações contendo PIP tiveram maior eficiência na liberação de CUR, sendo diferença mais significativa para Q100-CUR-PIP, apesar de que essas formulações apresentaram graus de intumescimento menores. Uma possível explicação é a interação entre CUR-PIP, amplamente observada nos estudos de caracterização dos materiais, capaz de gerar alterações morfológicas na CUR que promovem sua melhor solubilização no meio utilizado para o estudo de liberação.<sup>41,111</sup>

A **Tabela 14** traz o ajuste dos pontos experimentais dos primeiros 60% de liberação da CUR para diferentes equações cinéticas, mostrando as constantes cinéticas ( $k$ ),  $R^2$  e os parâmetros extras de cada equação analisada.

A partir dos dados obtidos pode-se notar que o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas foi o mais adequado para ajustar as curvas de perfis de liberação da CUR, visto os maiores valores de  $R^2$ . Adicionalmente, se observou que o modelo

de Peppas-Sahlin também apresentou bom ajuste para todas as amostras analisadas.

**Tabela 14.** Ajuste dos pontos experimentais de liberação da CUR para diferentes modelos cinéticos.

	<b>Modelo Cinético</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>2</sub></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Parâmetro extra*</b>
<b>Q100-CUR</b>	Zero	7,440	-	0,8852	-
	Primeira + F <sub>MAX</sub>	0,3293	-	0,9616	49,45 <sup>a</sup>
	Higuchi	16,03	-	0,9686	-
	Korsmeyer-Peppas	13,47	-	0,9942	0,620 <sup>b</sup>
	Peppas-Sahlin	9,162	4,216	0,9949	0,450 <sup>c</sup>
<b>Q100-CUR-PIP</b>	Zero	8,793	-	0,8336	-
	Primeira + F <sub>MAX</sub>	0,3504	-	0,9824	52,68 <sup>a</sup>
	Higuchi	19,10	-	0,9832	-
	Korsmeyer-Peppas	16,57	-	0,9951	0,605 <sup>b</sup>
	Peppas-Sahlin	13,32	3,750	0,9944	0,450 <sup>c</sup>
<b>Q80-CUR</b>	Zero	5,349	-	0,8847	-
	Primeira + F <sub>MAX</sub>	0,3315	-	0,9716	35,23 <sup>a</sup>
	Higuchi	11,52	-	0,9636	-
	Korsmeyer-Peppas	9,345	-	0,9914	0,649 <sup>b</sup>
	Peppas-Sahlin	6,449	3,101	0,9899	0,450 <sup>c</sup>
<b>Q80-CUR-PIP</b>	Zero	6,332	-	0,8806	-
	Primeira + F <sub>MAX</sub>	0,2163	-	0,9858	51,05 <sup>a</sup>
	Higuchi	13,66	-	0,9723	-
	Korsmeyer-Peppas	11,16	-	0,9968	0,647 <sup>b</sup>
	Peppas-Sahlin	8,004	3,489	0,9955	0,450 <sup>c</sup>

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

Os parâmetros n e m destes dois modelos estão relacionados ao comportamento de liberação de um composto ativo. O parâmetro n é relacionado com a forma geométrica do sistema e é representado por três comportamentos diferentes, em que valores iguais a 0,5 demonstram difusão do modelo Fickiano (caso I) e iguais a 1 modelo não Fickiano (caso II). Já valores entre 0,5 e 1 (caso III) representam comportamento anômalo de transporte dos ativos para fora da matriz polimérica.

Este último caso é governado simultaneamente pelos fenômenos de difusão do solvente e intumescimento das cadeias poliméricas, que devem apresentar velocidades com magnitudes similares para ocorrerem em sobreposição. O expoente  $m$  está relacionado a comportamento de difusão puramente Fickiano e pode ser igualado ao parâmetro  $n$  do modelo de Korsmeyer-Peppas quando o mecanismo de relaxação das cadeias poliméricas é negligenciável.<sup>112</sup>

Em todos os sistemas estudados se observou valores de  $n$  entre 0,5 e 1,0, representando comportamento anômalo, logo a liberação da CUR foi dependente da difusão do ativo e da taxa de intumescimento das matrizes poliméricas. Outro fator que concorda com esta informação é o fato de que os valores calculados para o expoente  $m$  são diferentes dos expoentes  $n$ . Dessa forma, o mecanismo de relaxação das cadeias de QTS e XY foram determinantes para a liberação efetiva da CUR.

#### **4.4.4. Estudo de solubilidade de CUR através de análise fluorimétrica**

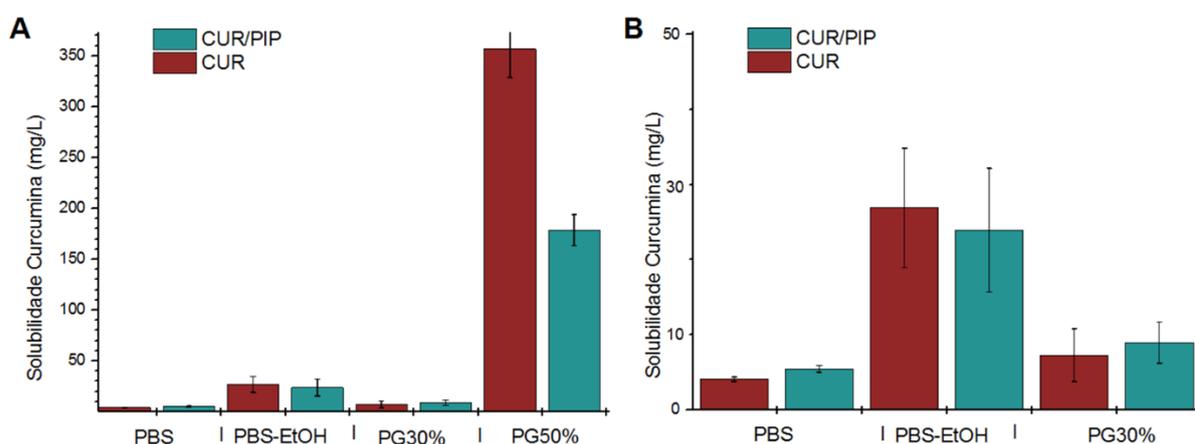
A solubilidade da CUR foi determinada para solventes específicos a serem utilizados no estudo de permeação *ex vivo* através de análise fluorimétrica. O estudo também foi realizado com misturas de CUR e PIP para avaliar de que forma a interação dos compostos afeta a solubilidade de CUR nos solventes analisados. Os dados obtidos após quantificação com curvas de calibração estão compilados na **Tabela 15** e na **Figura 43**.

Os solventes estudados foram escolhidos de acordo com o que se usa de forma padrão no estudo de permeação *ex vivo* para avaliação de compostos pouco solúveis em água e com baixa permeação, como a CUR. Considerando que soluções aquosas de propilenoglicol (PG) são utilizadas como promotoras de solubilidade em soluções controle dos ativos, neste estudo foram avaliados as proporções de 30% e 50% para observar qual teria maior eficácia na solubilização de CUR. A solução tampão de PBS pH 7,4 foi utilizada para promover o intumescimento e liberação de CUR nas amostras de membranas que ficam em contato com a pele. Já na câmara receptora, foi adicionado 30% de etanol à solução de PBS para manter a CUR solubilizada no meio líquido para manter condições *sink*.

**Tabela 15.** Solubilidade da CUR pura e com presença de PIP em diferentes solventes.

Solventes	Solubilidade CUR (mg.L <sup>-1</sup> )	
	CUR pura	CUR-PIP
PBS 100%	4,08 ± 0,29	5,45 ± 0,45
PBS + EtOH 30%	26,9 ± 7,95	23,9 ± 8,23
PG 30%	7,28 ± 3,53	8,93 ± 2,75
PG 50%	356,8 ± 28,3	178,6 ± 15,3

**Figura 43.** (A) Solubilidade (mg.L<sup>-1</sup>) de CUR pura e mistura de CUR e PIP em diferentes solventes. (B) Aproximação da região de solubilidade de CUR menor que 50 mg.L<sup>-1</sup>.



Na **Figura 43** se observa que a CUR pura é mais solúvel (356,8 mg.L<sup>-1</sup>) na solução aquosa contendo 50% de PG. Nos outros 3 solventes, a solubilidade determinada foi muito menor, com valores abaixo de 30 mg.L<sup>-1</sup>. Isso pode ser explicado pela maior probabilidade de ocorrer ligações de hidrogênio entre os grupos álcool do PG e as hidroxilas da CUR comparativamente às soluções contendo etanol. Portanto, a mistura de solventes com maior concentração de PG tem maior capacidade de solubilização, seguida da mistura de solução de PBS e 30% de etanol. <sup>113,114</sup>

A quantificação de soluções de CUR quando na presença de PIP apresentaram valores menores de solubilidade em todos os solventes analisados. Uma possível explicação pode ser dada pelas interações que ocorrem entre CUR-PIP, o que diminuiria a quantidade de grupos de CUR prováveis de interagir com a água. Outra

possível ocorrência é a competição entre moléculas de CUR e PIP por sítios de solvatação da água pelo fato de que PIP é mais solúvel em água do que CUR. A diminuição de solubilidade da CUR em água pura com a adição de PIP também foi determinada por Traxler *et al.*<sup>115</sup>

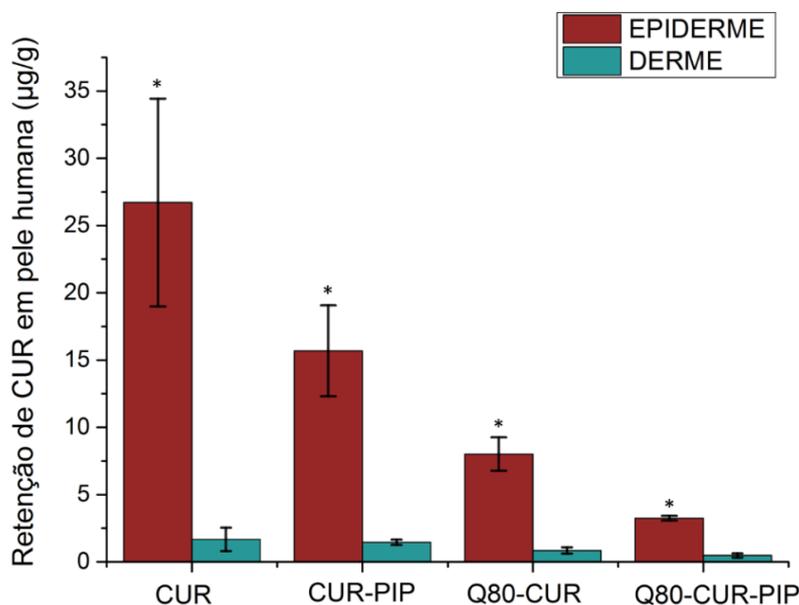
#### 4.4.5. Ensaio de permeação *ex vivo* de CUR em pele humana

Os ensaios de permeação *ex vivo* foram realizados a fim de avaliar a permeação de CUR em pele abdominal humana. As formulações Q80-CUR e Q80-CUR-PIP foram analisadas em conjunto com soluções controle de PG contendo CUR pura e mistura de CUR-PIP pelo período de 8 h. Para manter as condições *sink* no experimento se utilizou solução PBS/EtOH (70:30) pH 7,4. De acordo com a deposição preferencial da CUR no lado superior das membranas, que foi observada nos estudos de FTIR e molhabilidade, manteve-se contato desse lado com a pele nas câmaras de Franz.

O planejamento dos ensaios de permeação requereram alterações no preparo das membranas como forma de otimização, visto a menor taxa de liberação no ensaio *in vitro* nas primeiras 7 h (33-55%). Na literatura se encontram estudos que apontam baixos níveis de absorção de CUR pela pele devido à baixa solubilidade em meio fisiológico. Para viabilizar o ensaio e posterior quantificação de CUR por análise fluorimétrica, se tornou necessário aumentar a dosagem dos ativos em todas as formulações. As quantidades de CUR foram aumentadas para 120 mg e de PIP para 12 mg para manter a proporção mássica de 10%. Utilizou-se ultrassom de ponteira para realizar solubilização de maior concentração de CUR nas soluções filmogênicas.<sup>116</sup>

Após o término dos ensaios realizou-se quantificação fluorimétrica em cada amostra removida da solução controle (permeação) e da extração de CUR da pele (retenção). Os dados obtidos demonstraram que não foi possível detectar a quantidade de CUR que permeou na pele, possivelmente sendo um valor muito baixo. Isso pode ter ocorrido pela baixa liberação de CUR nas soluções contidas na câmara receptora e até mesmo por maior interação da CUR com os compostos presentes nas camadas da pele, como proteínas e lipídeos. Apesar disso, conseguiu-se quantificar CUR liberada que foi retida na epiderme e derme, conforme mostra a **Figura 44**.<sup>117</sup>

**Figura 44.** Quantidade de CUR retida na pele humana após 8 h. Os valores são representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).



\*indicam diferenças estatisticamente significativas entre as quantidades retidas na epiderme.

A partir da **Figura 44** se observa que a retenção da CUR foi maior na epiderme para todas as amostras, sendo a camada mais externa da pele. Adicionalmente, não se obteve diferença estatística entre os valores determinados para CUR retida na derme. Essas observações indicam que a CUR não teve boa taxa de difusão entre as camadas mais profundas da pele e pode apresentar maior interação com os constituintes da epiderme. O resultado observado ainda se torna positivo para a aplicação almejada, visto que para que um composto ativo ou fármaco tenha ação tópica na pele é preferencial que permaneça retido nas camadas mais externas da pele em vez de permear para a corrente sanguínea. Pois nesse último caso a ação do composto seria sistêmica e deve-se ter maior controle de toxicidade e biocompatibilidade. <sup>28,117</sup>

As soluções controle de CUR e CUR-PIP apresentaram maiores quantidades de retenção, o que já era esperado, visto que a CUR estava em sua forma livre e passou diretamente por difusão do solvente, não havendo processo de intumescimento para sua liberação.

Outra observação interessante foi que o sistema CUR-PIP teve menor retenção do que CUR pura, tanto na solução controle quanto na matriz Q80. Uma justificativa seria a menor solubilidade da CUR nos solventes analisados quando na

presença de PIP, conforme se discutiu no item 4.4.4. Gerando menor probabilidade de interação com os componentes da pele, visto que a CUR estaria em sua forma mais cristalina. Outra consideração a ser feita é que no estudo de liberação *in vitro* da CUR, o efeito da interação com PIP foi mais pronunciado após as 7 primeiras horas de experimento. Logo, neste presente estudo não foi possível analisar essa faixa de tempo de liberação da CUR das membranas analisadas.

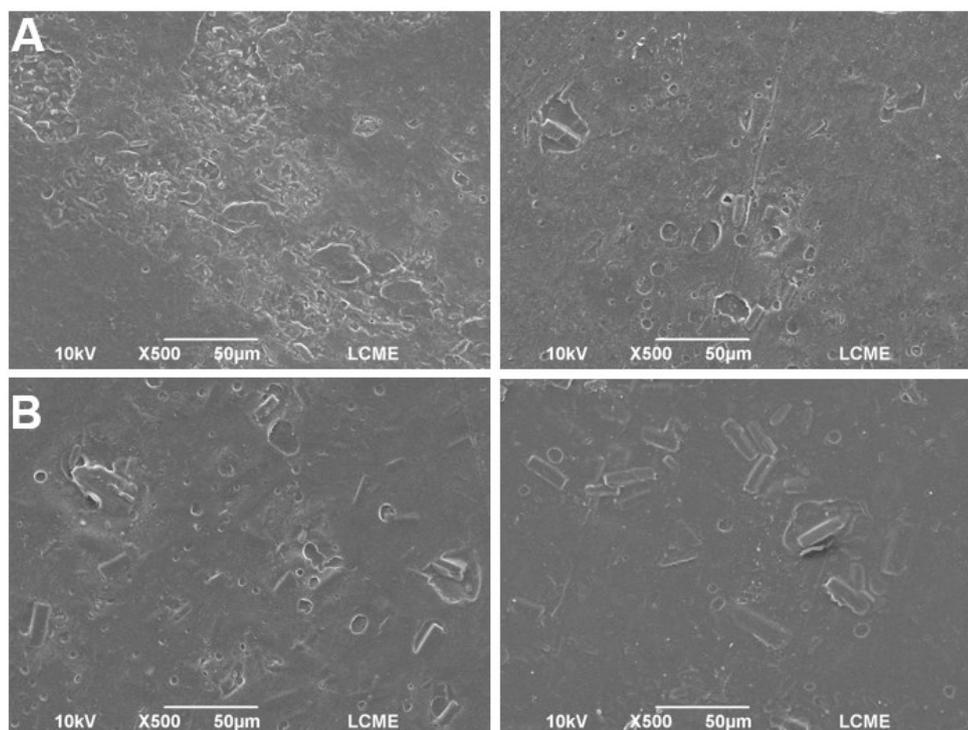
Na literatura encontrou-se estudos que apontaram maior permeabilidade da CUR ao se adicionar PIP nas formulações, como o estudo conduzido por Jantarat *et al*, em que se alcançou um aumento de 1,89 vezes na taxa de permeação ao se comparar com a membrana sem PIP. No entanto, nos experimentos foram utilizadas amostras de pele de rato, que reconhecidamente possuem estrutura diferente da pele humana e composição menos complexa, podendo potencializar o efeito de permeação da CUR.<sup>41</sup>

Com isso, se notou que os experimentos de liberação *in vitro* e *ex vivo* não apresentaram boa correlação entre si. Nos ensaios *in vitro* se utilizou maior quantidade de solvente e de surfactante que promovem a solubilização e liberação da CUR. Já nos ensaios *ex vivo* se utilizou de parâmetros mais semelhantes ao que se teria em uma aplicação da membrana como curativo de pele.

#### **4.4.6. Morfologia da superfície das membranas após permeação**

As membranas utilizadas nos ensaios de permeação *ex vivo* foram analisadas através de microscopia SEM para avaliar as mudanças morfológicas geradas pela liberação da CUR e pelo contato com a pele humana. As imagens foram feitas com aproximação de 500x e constam na **Figura 45**.

**Figura 45.** Imagens de SEM da superfície de secagem de cima, que teve contato com a pele (à esquerda) e da superfície de secagem de baixo, que teve contato com a câmara doadora (à direita) das membranas **(A)** Q80-CUR e **(B)** Q80-CUR-PIP após ensaios de permeação.



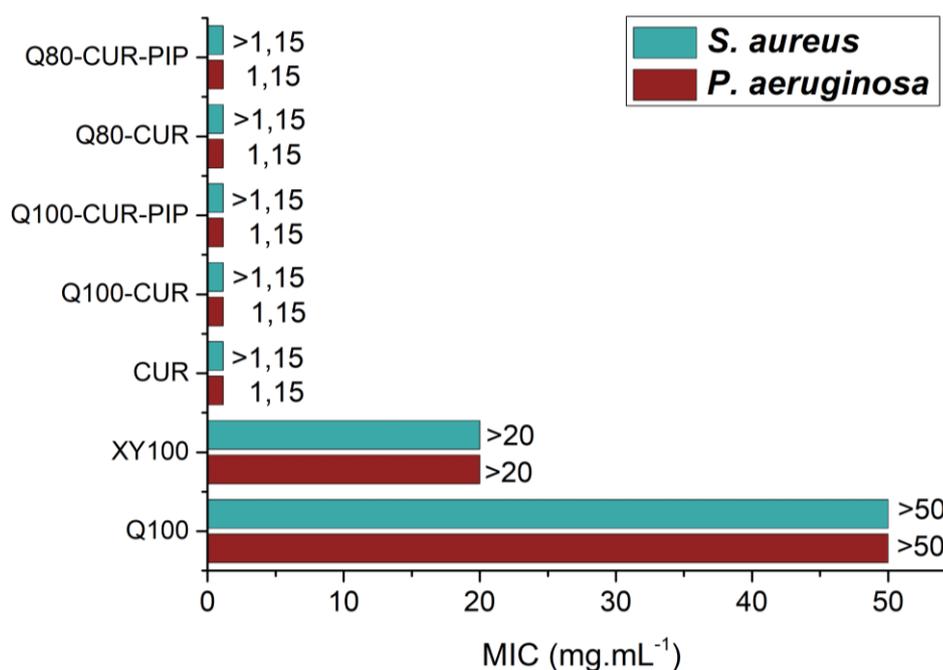
Na **Figura 45** se observa que após ensaio de permeação ocorreram alterações morfológicas em ambos lados das membranas, sendo as maiores mudanças nos lados de cima das membranas, que tiveram contato com a pele. Além da liberação da CUR, o contato com os constituintes da pele também pode gerar degradação na matriz, através de interação com as cadeias poliméricas.<sup>26</sup>

A microscopia SEM da formulação Q80-CUR apresentou mais sinais de degradação e de liberação de CUR. Para a membrana Q80-CUR-PIP também se notou regiões que indicam liberação da CUR no lado superior, apesar de que em menor quantidade. Tais observações estão de acordo com o que foi discutido para o ensaio de permeação, em que se verificou maior retenção de CUR nas camadas da pele para a formulação contendo apenas CUR.

#### 4.4.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição

O processo de regeneração celular que ocorre em ferimentos cutâneos é complexo e suscetível a contaminações externas por micro-organismos, como fungos e bactérias. Esses micro-organismos podem ter crescimento desenfreado em situações de desequilíbrio imunológico e assim piorar os sintomas de um paciente e prolongar o tratamento. Para avaliar a atividade antibacteriana da CUR nas formulações desenvolvidas escolheu-se cepas de duas bactérias, sendo uma Gram-positiva (+) *Staphylococcus aureus* e a outra Gram-negativa (-) *Pseudomonas aeruginosa*. O método de microdiluição escolhido permitiu a utilização dos géis filmogênicos como material a ser analisado em vez das membranas secas. Dessa forma, minimizou-se a possibilidade de contaminações por micro-organismos que poderiam ocorrer durante o processo de secagem. Usou-se as mesmas concentrações dos constituintes que nos ensaios de permeação *ex vivo*. A **Figura 46** mostra as concentrações inibitórias mínimas calculadas para os estudos das cepas de bactérias.<sup>1,2</sup>

**Figura 46.** Concentração inibitória mínima (MIC) dos géis filmogênicos de QTS e XY enriquecidos com CUR e PIP determinados *in vitro* pelo método de microdiluição.



Preparou-se géis filmogênicos contendo QTS e XY puras para atuarem como controle do experimento. Pode-se observar que não apresentaram atividade bactericida para nenhuma das cepas analisadas. Já a CUR pura inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* na concentração inibitória de 1,15 mg.mL<sup>-1</sup> e não exibiu atividade para *S. aureus* nas faixas de diluição analisadas, sendo que houve crescimento bacteriano em todos os poços de diluição. Ao se analisar as formulações feitas a partir de Q100 e Q80 se notou que a atividade de CUR não teve alteração em nenhuma das situações. Os valores não foram afetados pela presença das matrizes poliméricas ou de PIP na mistura. Apesar disso, as membranas produzidas ainda poderiam ser utilizadas em tratamentos de pele para inibir o crescimento do micro-organismo *P. aeruginosa*.

Na literatura se encontram valores de MIC da CUR com magnitude muito menor do que as determinadas. Estudos conduzidos por Gunes *et al* e Teow *et al* demonstraram que a CUR tem boa atividade bactericida para ambas bactérias. Uma possível explicação para as diferenças encontradas seria a morfologia da CUR presente nos géis filmogênicos. Com o aumento da concentração do ativo na mistura se obteve uma solubilização menos efetiva do que com as concentrações iniciais, e possivelmente a CUR apresentou estrutura mais cristalina. Para que a CUR tenha capacidade inibitória de crescimento desses micro-organismos ela deve conseguir permear efetivamente as paredes celulares. Ambas bactérias analisadas possuem bicamada fosfolipídica, além de outras camadas mais internas que podem dificultar a permeação de fármacos e compostos ativos como a CUR. Como se observou no estudo de permeação *ex vivo*, a CUR não teve permeação efetiva em meios fisiológicos ao se utilizar as formulações de QTS e XY escolhidas.<sup>118,119</sup>

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas atualmente utilizados como tratamento de ferimentos de pele, como gazes de algodão, apresentam algumas desvantagens para o paciente, como alta periodicidade de manutenção e forte bioadesão. Se torna necessário estudar e desenvolver novos sistemas que tenham outras características que possam beneficiar o paciente. O presente trabalho discutiu sobre o desenvolvimento e caracterização de membrana polimérica composta por QTS e XY e enriquecidos com CUR e PIP visando aplicação de tratamento cutâneo.

Inicialmente analisou-se as interações de CUR, PIP e P123. Observou-se que a PIP gerou supressão de emissão de fluorescência da CUR, indicando interação intermolecular entre os compostos. Através de análise calorimétrica se verificou que CUR e PIP tornaram-se mais amorfas ao serem misturadas com P123. Ao analisar as interações apenas de CUR e PIP se observou que ocorre aumento de intensidade de fluorescência da CUR. No entanto, não foi possível realizar quantificações pois ocorre interferência espectral ao se atingir alta concentração de PIP na solução. Estudou-se misturas com diferentes proporções entre CUR e PIP e se notou que a proporção de 40% de PIP foi capaz de alterar a estrutura de CUR para sua forma mais amorfa.

Em seguida, desenvolveu-se membranas poliméricas compostas por diferentes proporções de misturas de QTS e XY. Após realizar as caracterizações das membranas se determinou que a proporção de mistura que gerou melhorias ao material foi 80:20 (m/m). Através de análises de DSC se observou diminuição das T<sub>gs</sub> da QTS em todas as misturas analisadas. Os padrões de XRPD da QTS foram modificados pela presença da XY nas matrizes poliméricas. A membrana Q80 apresentou menor grau de dissolução e maior grau de intumescimento nos pHs 5,5 e 7,4. Além disso, observou-se nos ensaios mecânicos que Q80 teve a maior resistência, mesmo após passar por processo de intumescimento.

As membranas Q80 foram enriquecidas com CUR e PIP e realizou-se caracterização dos materiais produzidos. Análises de DSC mostraram que houve diminuição da temperatura de fusão da CUR nas membranas contendo PIP. Nas microscopias PLOM se notou alteração na estrutura cristalina da CUR nas membranas com PIP, pois se obteve uma superfície com material mais amorfo. Adicionalmente, observou-se outras melhorias nas membranas que continham PIP,

sendo observado mudanças na uniformidade de dispersão do ativo nas matrizes poliméricas, nas propriedades mecânicas e liberação *in vitro* do ativo. Apesar disso, as membranas de CUR e PIP tiveram menor grau de intumescimento. A liberação de CUR a partir das membranas em solução de Tween 80 se ajustou ao modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, apresentando liberação de até 99% após 50 h. As membranas produzidas apresentaram atividade antibacteriana em ensaios *in vitro* contra *P. aeruginosa*, com concentração inibitória mínima de 1,15 mg.mL<sup>-1</sup>. Análises de permeação *ex vivo* mostraram que a PIP reduz a permeação e retenção da CUR nas camadas mais externas. Sendo a CUR retida em maior concentração na epiderme.

Por fim, se avaliou que os materiais desenvolvidos têm potencial de utilização em curativos de pele, apesar do baixo grau de intumescimento e de permeação em pele *ex vivo* determinadas no estudo. Torna-se necessário aprimorar as formulações das membranas visando obter melhor capacidade de absorção de água e liberação da CUR. Estes materiais por apresentarem uma maior solubilidade da CUR e torná-la mais biodisponível, em uma etapa futura podem ter suas características citotóxicas avaliadas contra linhagens tumorais, a fim de avaliar também o potencial destas membranas contra câncer.

## 6. REFERÊNCIAS

- (1) SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. *Dermatologia*, 3rd ed.; Artes Médicas; São Paulo, 2007.
- (2) JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. *Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas*; Editora Atheneu: São Paulo, 2003.
- (3) MESQUITA, R. M. G. R. Caracterização Do Tratamento De Feridas Complexas Em Um Hospital Geral. Mestrado em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.
- (4) DAI, C.; SHIH, S.; KHACHEMOUNE, A. Skin Substitutes for Acute and Chronic Wound Healing: An Updated Review. *J. Dermatol. Treat.* **2020**, *31* (6), 639–648. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>.
- (5) DIAS, J. R.; GRANJA, P. L.; BÁRTOLO, P. J. Advances in Electrospun Skin Substitutes. *Prog. Mater. Sci.* **2016**, *84*, 314–334. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2016.09.006>.
- (6) ENUMO, A. Desenvolvimento de Membranas a Base de Quitosana Contendo Curcumina Encapsulada Em Copolímeros Anfífilicos Para Posterior Recobrimento Em Fibras de Acetato de Celulose. Dissertação (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina., Florianópolis, 2020.
- (7) ETHRIDGE, R. T.; LEONG, M.; PHILLIPS, M. T. *Tratado de Cirurgia*; Elsevier: Rio de Janeiro, 2010.
- (8) SMANIOTTO, P. H. de S.; FERREIRA, M. C.; ISAAC, C.; GALLI, R. Sistematização de Curativos Para o Tratamento Clínico Das Feridas. *Rev. Bras. Cir. Plást.* **2012**, *27* (4), 623–626. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752012000400026>.
- (9) CASTAÑO, O.; PÉREZ-AMODIO, S.; NAVARRO-REQUENA, C.; MATEOS TIMONEDA, M. Á.; ENGEL, E. Instructive Microenvironments in Skin Wound Healing: Biomaterials as Signal Releasing Platforms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 95–117. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.012>.
- (10) TEJADA, S.; MANAYI, A.; DAGLIA, M.; F. Nabavi, S.; Sureda, A.; Hajheydari, Z.; Gortzi, O.; Pazoki-Toroudi, H.; M. Nabavi, S. Wound Healing Effects of

- Curcumin: A Short Review. *Curr. Pharma. Biotech.* **2016**, *17* (11), 1002–1007. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160721123109>.
- (11) OLIVEIRA, R. G. de; Alencar - Filho, E. B.; Vasconcellos, M. L. A. A. A Influência Da Piperina Na Biodisponibilidade de Fármacos: Uma Abordagem Molecular. *Quím. Nova* **2014**, *37* (1), 69–73. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100013>.
- (12) MOORTHI, C.; Krishnan, K.; Manavalan, R.; Kathiresan, K. Preparation and Characterization of Curcumin–Piperine Dual Drug Loaded Nanoparticles. *Asian Pacific J. of Trop. Biomed.* **2012**, *2* (11), 841–848. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60241-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60241-X).
- (13) CALAHORRA, A.; AKHTAR, M.; SARKAR, A. Recent Advances in Emulsion-Based Delivery Approaches for Curcumin: From Encapsulation to Bioaccessibility. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *71*, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.009>.
- (14) SELIG, H. F.; LUMENTA, D. B.; GIRETZLEHRNER, M.; JESCHKE, M. G.; UPTON, D.; KAMOLZ, L. P. The Properties of an “Ideal” Burn Wound Dressing – What Do We Need in Daily Clinical Practice? Results of a Worldwide Online Survey among Burn Care Specialists. *Burns* **2012**, *38* (7), 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.04.007>.
- (15) KHAN, F.; TANAKA, M. Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *19* (1), 17. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>.
- (16) HOQUE, J.; PRAKASH, R. G.; PARAMANANDHAM, K.; SHOME, B. R.; HALDAR, J. Biocompatible Injectable Hydrogel with Potent Wound Healing and Antibacterial Properties. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (4), 1218–1230. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01104>.
- (17) MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and Synthetic Polymers for Wounds and Burns Dressing. *Int. J. Pharm.* **2014**, *463* (2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>.
- (18) CIHAN, E.; Polat, M.; POLAT, H. Designing of Spherical Chitosan Nano-Shells with Micellar Cores for Solvation and Safeguarded Delivery of Strongly Lipophilic Drugs. *Eng. Asp.* **2017**, *529*, 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.074>.

- (19) ARAVAMUDHAN, A.; RAMOS, D. M.; NADA, A. A.; KUMBAR, S. G. Natural Polymers. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Elsevier, 2014; pp 67–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1>.
- (20) ENUMO, A.; PEREIRA, C. I. D.; PARIZE, A. L. Temperature Evaluation of Curcumin Keto–Enolic Kinetics and Its Interaction with Two Pluronic Copolymers. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (26), 5641–5650. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b04150>.
- (21) NECHITA, P.; ROMAN, M. Review on Polysaccharides Used in Coatings for Food Packaging Papers. *Coatings* **2020**, *10* (6), 566. <https://doi.org/10.3390/coatings10060566>.
- (22) KUMAR, S.; NEGI, Y. S. Cellulose and Xylan Based Prodrug of Diclofenac Sodium: Synthesis, Physicochemical Characterization and In Vitro Release. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2014**, *63* (6), 283–292. <https://doi.org/10.1080/00914037.2013.830256>.
- (23) SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e Caracterização de Xilanas de Sabugos de Milho. *Polímeros* **1998**, *8* (2), 25–33. <https://doi.org/10.1590/S0104-14281998000200005>.
- (24) LUÍS, Â.; Pereira, L.; Domingues, F.; Ramos, A. Development of a Carboxymethyl Xylan Film Containing Licorice Essential Oil with Antioxidant Properties to Inhibit the Growth of Foodborne Pathogens. *LWT* **2019**, *111*, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.040>.
- (25) PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a Starting Material for Wound Healing Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>.
- (26) AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achiev. Life Sci.* **2016**, *10* (1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>.
- (27) FRANK, L. A.; ONZI, G. R.; MORAWSKI, A. S.; POHLMAN, A. R.; GUTERES, S. S.; CONTRI, R. V. Chitosan as a Coating Material for Nanoparticles Intended for Biomedical Applications. *React. Funct. Polym.* **2020**, *147*, 104459. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104459>.
- (28) ENUMO, A.; ARGENTA, D. F.; BAZZO, G. C.; CAON, T.; STULZER, H. K.; PARIZE, A. L. Development of Curcumin-Loaded Chitosan/Pluronic Membranes

- for Wound Healing Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.253>.
- (29) BUSH, J. R.; LIANG, H.; DICKINSON, M.; BOTCHWEY, E. A. Xylan Hemicellulose Improves Chitosan Hydrogel for Bone Tissue Regeneration: XYLAN HEMICELLULOSE IMPROVES CHITOSAN HYDROGEL FOR BONE REPAIR. *Polym. Adv. Technol.* **2016**, *27* (8), 1050–1055. <https://doi.org/10.1002/pat.3767>.
- (30) KARAASLAN, M. A.; Tshabalala, M. A.; Buschle-Diller, G. Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Aspen Hemicellulose and Chitosan: Effect of Crosslinking Sequence on Hydrogel Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124* (2), 1168–1177. <https://doi.org/10.1002/app.35075>.
- (31) KRISHNAN, R.; Rajeswari, R.; Venugopal, J.; Sundarrajan, S.; Sridhar, R.; Shayanti, M.; Ramakrishna, S. Polysaccharide Nanofibrous Scaffolds as a Model for in Vitro Skin Tissue Regeneration. *J Mater Sci: Mater Med* **2012**, *23* (6), 1511–1519. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4630-6>.
- (32) CHEN, J.; HE, Z.-M.; Wang, F.-L.; Zhang, Z.-S.; Liu, X.; Zhai, D.-D.; Chen, W.-D. Curcumin and Its Promise as an Anticancer Drug: An Analysis of Its Anticancer and Antifungal Effects in Cancer and Associated Complications from Invasive Fungal Infections. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *772*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.038>.
- (33) AKBİK, D.; Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Rohanizadeh, R. Curcumin as a Wound Healing Agent. *Life Sciences* **2014**, *116* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.08.016>.
- (34) JIANG, T.; Liao, W.; Charcosset, C. Recent Advances in Encapsulation of Curcumin in Nanoemulsions: A Review of Encapsulation Technologies, Bioaccessibility and Applications. *Food Res. Int.* **2020**, *132*, 109035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109035>.
- (35) HUSSAIN, Z.; Thu, H. E.; Ng, S.-F.; Khan, S.; Katas, H. Nanoencapsulation, an Efficient and Promising Approach to Maximize Wound Healing Efficacy of Curcumin: A Review of New Trends and State-of-the-Art. *Coll. Surf B. Bioint.* **2017**, *150*, 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.036>.

- (36) PATEL, N. A.; Patel, N. J.; Patel, R. P. Formulation and Evaluation of Curcumin Gel for Topical Application. *Pharm. Dev. and Tech.* **2009**, *14* (1), 83–92. <https://doi.org/10.1080/10837450802409438>.
- (37) DELJOO, S.; RABIEE, N.; RABIEE, M. Curcumin-Hybrid Nanoparticles in Drug Delivery System. *Asian J. Nanosci. Mater.* **2018**, *2* (1), 66–91.
- (38) PHAM, L.; Dang, L. H.; Truong, M. D.; Nguyen, T. H.; Le, L.; Le, V. T.; Nam, N. D.; Bach, L. G.; Nguyen, V. T.; Tran, N. Q. A Dual Synergistic of Curcumin and Gelatin on Thermal-Responsive Hydrogel Based on Chitosan-P123 in Wound Healing Application. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109183. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109183>.
- (39) PATIL, V. M.; Das, S.; Balasubramanian, K. Quantum Chemical and Docking Insights into Bioavailability Enhancement of Curcumin by Piperine in Pepper. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (20), 3643–3653. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b01434>.
- (40) CHEN, S.; Li, Q.; McClements, D. J.; Han, Y.; Dai, L.; Mao, L.; Gao, Y. Co-Delivery of Curcumin and Piperine in Zein-Carrageenan Core-Shell Nanoparticles: Formation, Structure, Stability and in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Food Hydrocoll.* **2020**, *99*, 105334. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105334>.
- (41) JANTARAT, C.; Sirathanarun, P.; Boonmee, S.; Meechoosin, W.; Wangpittaya, H. Effect of Piperine on Skin Permeation of Curcumin from a Bacterially Derived Cellulose-Composite Double-Layer Membrane for Transdermal Curcumin Delivery. *Sci. Pharm.* **2018**, *86* (3), 39. <https://doi.org/10.3390/scipharm86030039>.
- (42) STASILOWICZ, A.; Tykarska, E.; Lewandowska, K.; Kozak, M.; Miklaszewski, A.; Kobus-Cisowska, J.; Szymanowska, D.; Plech, T.; Jencyk, J.; Cielecka-Piontek, J. Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin as an Effective Carrier of Curcumin – Piperine Nutraceutical System with Improved Enzyme Inhibition Properties. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 1811–1821. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1801670>.
- (43) BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers.

- J. Control. Release* **2008**, *130* (2), 98–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>.
- (44) CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(Ethylene Oxide)–Poly(Propylene Oxide) Block Copolymer Micelles as Drug Delivery Agents: Improved Hydrosolubility, Stability and Bioavailability of Drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66* (3), 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.03.022>.
- (45) ZHAO, L.; Du, J.; Duan, Y.; Zang, Y.; Zhang, H.; Yang, C.; Cao, F.; Zhai, G. Curcumin Loaded Mixed Micelles Composed of Pluronic P123 and F68: Preparation, Optimization and in Vitro Characterization. *Coll. Surf B. Bioint.* **2012**, *97*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.017>.
- (46) BANERJEE, S.; Omlor, A.; Wolny, J. A.; Han, Y.; Lermyte, F.; Godfrey, A. E.; O'Connor, P. B.; Schünemann, V.; Danaie, M.; Sadler, P. J. Generation of Maghemite Nanocrystals from Iron–Sulfur Centres. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (26), 9564–9569. <https://doi.org/10.1039/C9DT00514E>.
- (47) THANITWATTHANASAK, S.; Sagis, L. M. C.; Chitprasert, P. Pluronic F127/Pluronic P123/Vitamin E TPGS Mixed Micelles for Oral Delivery of Mangiferin and Quercetin: Mixture-Design Optimization, Micellization, and Solubilization Behavior. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, *274*, 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.089>.
- (48) KULTHE, S. S.; Choudhari, Y. M.; Inamdar, N. N.; Mourya, V. Polymeric Micelles: Authoritative Aspects for Drug Delivery. *Des. Mon. & Pol.* **2012**, *15* (5), 465–521. <https://doi.org/10.1080/1385772X.2012.688328>.
- (49) AKASH, M. S. H.; REHMAN, K. Recent Progress in Biomedical Applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical Perspectives. *J. Cont. Rel.* **2015**, *209*, 120–138. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.032>.
- (50) JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Thermosensitive Sol–Gel Reversible Hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>.
- (51) KLAIKHERD, A.; NAGAMANI, C.; Thayumanavan, S. Multi-Stimuli Sensitive Amphiphilic Block Copolymer Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (13), 4830–4838. <https://doi.org/10.1021/ja809475a>.

- (52) MOURYA, V. K.; INAMDAR, N.; NAWALE, R. B.; KULTHE, S. S. Polymeric Micelles: General Considerations and Their Applications. *Ind. J. Pharm. Educ. Res.* **2011**, *45*–2, 128–138.
- (53) BRUGNEROTTO, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer* **2001**, *42* (8), 3569–3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8).
- (54) TANASALE, M. F. J. D. P.; Bijang, C. M.; Rumpakwara, E. Preparation of Chitosan with Various Molecular Weight and Its Effect on Depolymerization of Chitosan with Hydrogen Peroxide Using Conventional Technique. *Int. J. Chemtech. Res.* **2019**, *12* (01), 112–120. <https://doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120113>.
- (55) WANG, R.; Han, J.; Jiang, A.; Huang, R.; Fu, T.; Wang, L.; Zheng, Q.; Li, W.; Li, J. Involvement of Metabolism-Permeability in Enhancing the Oral Bioavailability of Curcumin in Excipient-Free Solid Dispersions Co-Formed with Piperine. *Int. J. Pharm.* **2019**, *561*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.027>.
- (56) LUO, Y.; PAN, X.; LING, Y.; Wang, X.; Sun, R. Facile Fabrication of Chitosan Active Film with Xylan via Direct Immersion. *Cellulose* **2014**, *21* (3), 1873–1883. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0156-4>.
- (57) ASTM International. ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. *ASTM Stand* **2012**, No. 12. <https://doi.org/10.1520/D0882-12.2>.
- (58) HU, D.; Qiang, T.; Wang, L. Quaternized Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Sodium Carboxymethylcellulose Blend Film for Potential Wound Dressing Application. *Wound Med.* **2017**, *16*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2016.12.003>.
- (59) MAZZARINO, L.; BELLETTINI, I. C.; MINATTI, E.; LEMOS-SENNA, E. Development and Validation of a Fluorimetric Method to Determine Curcumin in Lipid and Polymeric Nanocapsule Suspensions. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46* (2), 219–226. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000200008>.
- (60) ZHANG, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* **2010**, *12* (3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.

- (61) SILVA, J. A. Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Permeação Cutânea de Diclofenaco de Dietilamônio Em Sistemas Tópicos Nanoemulsionados. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Departamento Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, 2008.
- (62) SAHU, A.; Kasoju, N.; Goswami, P.; Bora, U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. *J. Biomater. Appl.* **2011**, *25* (6), 619–639. <https://doi.org/10.1177/0885328209357110>.
- (63) DATTA, M.; LAL, S. Organoclay Pluronic F68 – Montmorillonite, as a Sustained Release Drug Delivery Vehicle for Propranolol Hydrochloride. *Eur. Chem. Bull.* **2014**, *3* (6), 593–604. <https://doi.org/10.17628/ECB.2014.3.593>.
- (64) HAZRA, M. K.; Roy, S.; Bagchi, B. Hydrophobic Hydration Driven Self-Assembly of Curcumin in Water: Similarities to Nucleation and Growth under Large Metastability, and an Analysis of Water Dynamics at Heterogeneous Surfaces. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141* (18), 18C501. <https://doi.org/10.1063/1.4895539>.
- (65) DEBNATH, S.; MISHRA, J. Understanding the Intrinsic Fluorescence of Piperine in Microheterogeneous Media: Partitioning and Loading Studies. *New J. Chem.* **2020**, *44* (20), 8317–8324. <https://doi.org/10.1039/D0NJ00770F>.
- (66) KRISSIA, J.; Araya-Sibaja, A. M.; Vega-Baudrit, J. R.; Teodolito Guillen-Giron; Huertas, F. V.; Quirós, M. I. Eutectic Mixture from Natural Products: Preparation of Curcumin-Piperine Multicomponent Organic Material. **2019**. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10048.76802>.
- (67) GULSEREN, İ.; Guri, A.; Corredig, M. Effect of Interfacial Composition on Uptake of Curcumin–Piperine Mixtures in Oil in Water Emulsions by Caco-2 Cells. *Food Funct.* **2014**, *5* (6), 1218. <https://doi.org/10.1039/c3fo60554j>.
- (68) CHEN, S.; McClements, D. J.; Jian, L.; Han, Y.; Dai, L.; Mao, L.; Gao, Y. Core–Shell Biopolymer Nanoparticles for Co-Delivery of Curcumin and Piperine: Sequential Electrostatic Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan Shells on the Zein Core. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (41), 38103–38115. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11782>.
- (69) PENG, N.; Qing-Jun, W.; Kiran, T.; Fei, H.; Chandan, P.; Zhao-Jun, W. Antioxidant Properties of Maillard Reaction Products Derived from Shrimp Shell Chitosan and Xylose, Fructose or Glucose. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* **2018**, *17* (4), 445–450. <https://doi.org/10.37290/ctrn2641-452X.17:445-450>.

- (70) LI, X.; Shi, X.; Wang, M.; Du, Y. Xylan Chitosan Conjugate - A Potential Food Preservative. *Food Chem.* **2011**, *126* (2), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.037>.
- (71) DENG, W.; Luo, J.; Yan, X. Maillard Reaction between Chitosan and Xylan in Ionic Liquids. *Ferroelectrics* **2020**, *562* (1), 39–45. <https://doi.org/10.1080/00150193.2020.1760582>.
- (72) HAO, G.; Hu, Y.; Shi, L.; Chen, J.; Cui, A.; Weng, W.; Osako, K. Physicochemical Characteristics of Chitosan from Swimming Crab (*Portunus Trituberculatus*) Shells Prepared by Subcritical Water Pretreatment. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1646. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81318-0>.
- (73) SIONKOWSKA, A.; Planecka, A.; Lewandowska, K. Influence of UV-Irradiation on Molecular Weight of Chitosan. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* **2013**, *18*, 21–28.
- (74) YU, X.; ZHAO, M.; HU, J.; ZENG, S.; BAI, X. Correspondence Analysis of Antioxidant Activity and UV–Vis Absorbance of Maillard Reaction Products as Related to Reactants. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, *46* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.010>.
- (75) NI, Z.-J.; LIU, X.; Xia, B.; Hu, L.-T.; Thakur, K.; Wei, Z.-J. Effects of Sugars on the Flavor and Antioxidant Properties of the Maillard Reaction Products of Camellia Seed Meals. *Food Chem: X* **2021**, *11*, 100127. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100127>.
- (76) WANG, Q.; Du, Y.; Fan, L. Properties of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Films for Drug-Controlled Release. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96* (3), 808–813. <https://doi.org/10.1002/app.21518>.
- (77) DONG, Y.; Ruan, Y.; Wang, H.; Zhao, Y.; Bi, D. Studies on Glass Transition Temperature of Chitosan with Four Techniques. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93* (4), 1553–1558. <https://doi.org/10.1002/app.20630>.
- (78) JAVED, A. Effects of Plasticizing and Crosslinking on Coatings Based on Blends of Starch-PVOH and Starch-Lignin. Doctoral Thesis (Chemistry Engineering), Faculty of Health, Science and Technology, Karlstad University, 2018.
- (79) XU, J.; Xia, R.; Yuan, T.; Sun, R. Use of Xylooligosaccharides (XOS) in Hemicelluloses/Chitosan-Based Films Reinforced by Cellulose Nanofiber: Effect

- on Physicochemical Properties. *Food Chem.* **2019**, *298*, 125041. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125041>.
- (80) WANG, Z.; Zeng, R.; Tu, M.; Zhao, J. Synthesis, Characterization of Biomimetic Phosphorylcholine-Bound Chitosan Derivative and *in Vitro* Drug Release of Their Nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128* (1), 153–160. <https://doi.org/10.1002/app.38151>.
- (81) TRINCA, R. B.; Westin, C. B.; da Silva, J. A. F.; Moraes, Â. M. Electrospun Multilayer Chitosan Scaffolds as Potential Wound Dressings for Skin Lesions. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>.
- (82) OLIVEIRA, S. M.; Alves, N. M.; Mano, J. F. Cell Interactions with Superhydrophilic and Superhydrophobic Surfaces. *J. Adhes. Sci. Technol.* **2014**, *28* (8–9), 843–863. <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697776>.
- (83) ARIMA, Y.; IWATA, H. Effect of Wettability and Surface Functional Groups on Protein Adsorption and Cell Adhesion Using Well-Defined Mixed Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2007**, *28* (20), 3074–3082. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.013>.
- (84) MU, X.; YU, H.; Zhang, C.; Chen, X.; Cheng, Z.; Bai, R.; Wu, X.; Yu, Q.; Wu, C.; Diao, Y. Nano-Porous Nitrocellulose Liquid Bandage Modulates Cell and Cytokine Response and Accelerates Cutaneous Wound Healing in a Mouse Model. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.070>.
- (85) ZHONG, L.-X.; Peng, X.-W.; Yang, D.; Cao, X.-F.; Sun, R.-C. Long-Chain Anhydride Modification: A New Strategy for Preparing Xylan Films. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (3), 655–661. <https://doi.org/10.1021/jf304818f>.
- (86) SCHNELL, C. N.; Galván, M. V.; Zanuttini, M. A.; Mocchiutti, P. Hydrogels from Xylan/Chitosan Complexes for the Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Cellulose* **2020**, *27* (3), 1465–1481. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02850-x>.
- (87) WADHWA, S.; Paliwal, R.; Rai Paliwal, S.; P. Vyas, S. Chitosan and Its Role in Ocular Therapeutics. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9* (14), 1639–1647. <https://doi.org/10.2174/138955709791012292>.
- (88) BOER, M.; Duchnik, E.; Maleszka, R.; Marchlewicz, M. Structural and Biophysical Characteristics of Human Skin in Maintaining Proper Epidermal

- Barrier Function. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2016**, *1*, 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>.
- (89) KHAN, M. U. A.; Iqbal, I.; Ansari, M. N. M.; Razak, S. I. A.; Raza, M. A.; Sajjad, A.; Jabeen, F.; Riduan Mohamad, M.; Jusoh, N. Development of Antibacterial, Degradable and PH-Responsive Chitosan/Guar Gum/Polyvinyl Alcohol Blended Hydrogels for Wound Dressing. *Molecules* **2021**, *26* (19), 5937. <https://doi.org/10.3390/molecules26195937>.
- (90) NURUNNABI, M.; Revuri, V.; Huh, K. M.; Lee, Y. Polysaccharide Based Nano/Microformulation: An Effective and Versatile Oral Drug Delivery System. In *Nanostructures for Oral Medicine*; Elsevier, 2017; pp 409–433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00015-8>.
- (91) ROHINDRA, D. R.; Nand, A. V.; Khurma, J. R. Swelling Properties of Chitosan Hydrogels. *S. Pac. J. Nat. App. Sci.* **2004**, *22* (1), 32. <https://doi.org/10.1071/SP04005>.
- (92) SOLIER, Y. N.; SCHNELL, C. N.; GALVÁN, M. V.; Mocchiutti, P.; Zanuttini, M. A. Fast Preparation of Flexible Wet-Resistant and Biodegradable Films From a Stable Suspension of Xylan/Chitosan Polyelectrolyte Complexes. *J. Polym. Environ.* **2022**, *30* (1), 114–124. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02181-8>.
- (93) NASERI-NOSAR, M.; ZIORA, Z. M. Wound Dressings from Naturally-Occurring Polymers: A Review on Homopolysaccharide-Based Composites. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *189*, 379–398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.003>.
- (94) PATIL, S.; Bharimalla, A. K.; Mahapatra, A.; Dhakane-Lad, J.; Arputharaj, A.; Kumar, M.; Raja, A. S. M.; Kambli, N. Effect of Polymer Blending on Mechanical and Barrier Properties of Starch-Polyvinyl Alcohol Based Biodegradable Composite Films. *Food Biosci.* **2021**, *44*, 101352. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101352>.
- (95) SHARIATINIA, Z.; FAZLI, M. Mechanical Properties and Antibacterial Activities of Novel Nanobiocomposite Films of Chitosan and Starch. *Food Hydrocoll.* **2015**, *46*, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.026>.
- (96) SETYANINGSIH, D.; Santoso, Y. A.; Hartini, Y. S.; Murti, Y. B.; Hinrichs, W. L. J.; Patramurti, C. Isocratic High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Simultaneous Quantification of Curcumin and Piperine in a Microparticle

- Formulation Containing Curcuma Longa and Piper Nigrum. *Heliyon* **2021**, 7 (3), e06541. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06541>.
- (97) JARDIM, K. V.; JOANITTI, G. A.; Azevedo, R. B.; Parize, A. L. Physico-Chemical Characterization and Cytotoxicity Evaluation of Curcumin Loaded in Chitosan/Chondroitin Sulfate Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, 56, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.036>.
- (98) NAIR, R. S.; Morris, A.; Billa, N.; Leong, C.-O. An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2019**, 20 (2), 69. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1279-6>.
- (99) PARIZE, A. L.; Stulzer, H. K.; Laranjeira, M. C. M.; Brighente, I. M. da C.; Souza, T. C. R. de. Evaluation of Chitosan Microparticles Containing Curcumin and Crosslinked with Sodium Tripolyphosphate Produced by Spray Drying. *Quím. Nova* **2012**, 35 (6), 1127–1132. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600011>.
- (100) SINGH, P. K.; Wani, W.; Kaul-Ghanekar, R.; Prabhune, A.; Ogale, S. From Micron to Nano-Curcumin by Sophorolipid Co-Processing: Highly Enhanced Bioavailability, Fluorescence, and Anti-Cancer Efficacy. *RSC Adv.* **2014**, 4 (104), 60334–60341. <https://doi.org/10.1039/C4RA07300B>.
- (101) SOU, K. Curcumin Towards Nanomedicine. *Recent Pat. Nanomed.* **2012**, 2 (2), 133–145. <https://doi.org/10.2174/1877912311202020133>.
- (102) LI, L.; WAN, W.; CHENG, W.; Liu, G.; Han, L. Oxidatively Stable Curcumin-loaded Oleogels Structured by B-sitosterol and Lecithin: Physical Characteristics and Release Behaviour *in Vitro*. *Int J. Food Sci. Technol.* **2019**, 54 (7), 2502–2510. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14208>.
- (103) BASPINAR, Y.; Üstündas, M.; Bayraktar, O.; Sezgin, C. Curcumin and Piperine Loaded Zein-Chitosan Nanoparticles: Development and in-Vitro Characterisation. *Saudi Pharm. J.* **2018**, 26 (3), 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.010>.
- (104) ZAHIRI, M.; Khanmohammadi, M.; Goodarzi, A.; Ababzadeh, S.; Sagharjoghi Farahani, M.; Mohandesnezhad, S.; Bahrami, N.; Nabipour, I.; Ai, J. Encapsulation of Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticle within Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) and Gelatin Fiber Mat for Wound Healing and Layered Dermal

- Reconstitution. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *153*, 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.255>.
- (105) QIAO, Y.; DUAN, L. Curcumin-Loaded Polyvinyl Butyral Film with Antibacterial Activity. *E-Polym.* **2020**, *20* (1), 673–681. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0042>.
- (106) PADALKAR, K. V.; GAIKAR, V. G. Extraction of Piperine from *Piper Nigrum* (Black Pepper) by Aqueous Solutions of Surfactant and Surfactant + Hydrotrope Mixtures. *Sep. Sci. Technol.* **2008**, *43* (11–12), 3097–3118. <https://doi.org/10.1080/01496390802063887>.
- (107) LIU, Y.; Cai, Y.; Jiang, X.; Wu, J.; Le, X. Molecular Interactions, Characterization and Antimicrobial Activity of Curcumin–Chitosan Blend Films. *Food Hydrocoll.* **2016**, *52*, 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.005>.
- (108) DIVAKARAN, A. V.; Azad, L. B.; Surwase, S. S.; Torris A. T., A.; Badiger, M. V. Mechanically Tunable Curcumin Incorporated Polyurethane Hydrogels as Potential Biomaterials. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (7), 2120–2130. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b04964>.
- (109) KALAYCIOGLU, Z.; Torlak, E.; Akın-Evingür, G.; Özen, İ.; Erim, F. B. Antimicrobial and Physical Properties of Chitosan Films Incorporated with Turmeric Extract. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *101*, 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.174>.
- (110) CHIGNELL, C. F.; Bilskj, P.; Reszka, K. J.; Motten, A. G.; Sik, R. H.; Dahl, T. A. SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59* (3), 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x>.
- (111) SLIKA, L.; Moubarak, A.; Borjac, J.; Baydoun, E.; Patra, D. Preparation of Curcumin-Poly (Allyl Amine) Hydrochloride Based Nanocapsules: Piperine in Nanocapsules Accelerates Encapsulation and Release of Curcumin and Effectiveness against Colon Cancer Cells. *Mater. Sci. Eng. C.* **2020**, *109*, 110550. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110550>.
- (112) BRUSCHI, M. L. Mathematical Models of Drug Release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*; Elsevier, 2015; pp 63–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.

- (113) SHARMA, V.; Pathak, K. Effect of Hydrogen Bond Formation/Replacement on Solubility Characteristics, Gastric Permeation and Pharmacokinetics of Curcumin by Application of Powder Solution Technology. *Acta Pharm. Sin. B.* **2016**, *6* (6), 600–613. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.015>.
- (114) UCISIK, M. H.; Küpcü, S.; Schuster, B.; Sleytr, U. B. Characterization of CurcuEmulsomes: Nanoformulation for Enhanced Solubility and Delivery of Curcumin. *J. Nanobiotechnol.* **2013**, *11* (1), 37. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-37>.
- (115) TRAXLER, F.; Schinnerl, J.; Brecker, L. Spectroscopic Studies on the Molecular Interactions of Curcumin and Piperine. *Monatsh. Chem.* **2020**, *151* (3), 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02563-z>.
- (116) ABLA, M. J.; BANGA, A. K. Quantification of Skin Penetration of Antioxidants of Varying Lipophilicity. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35* (1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00728.x>.
- (117) CAON, T.; MAZZARINO, L.; Simões, C. M. O.; Senna, E. L.; Silva, M. A. S. Lipid- and Polymer-Based Nanostructures for Cutaneous Delivery of Curcumin. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2017**, *18* (3), 920–925. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0554-7>.
- (118) GUNES, H.; Gulen, D.; Mutlu, R.; Gumus, A.; Tas, T.; Topkaya, A. E. Antibacterial Effects of Curcumin: An *in Vitro* Minimum Inhibitory Concentration Study. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32* (2), 246–250. <https://doi.org/10.1177/0748233713498458>.
- (119) TEOW, S.-Y.; Liew, K.; Ali, S. A.; Khoo, A. S.-B.; Peh, S.-C. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus Aureus*: A Brief Review. *J. Trop. Med.* **2016**, *2016*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/2853045>.
- (120) MORI, S.; BARTH, H. G. *Size Exclusion Chromatography*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1999. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03910-6>.
- (121) MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31* (3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (SEC) DA XY.

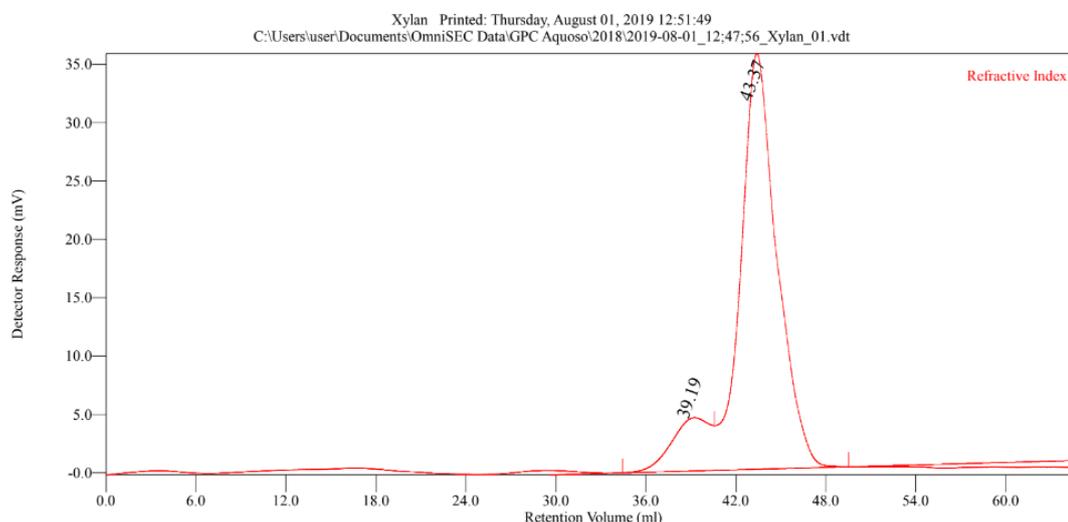
#### Metodologia

A análise foi realizada no Laboratório de Cromatografia por Exclusão de Tamanho (LASEC) da Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS. A massa molar da XY foi obtida através de análise SEC. Utilizou-se o equipamento da marca Malvern Panalytical, no modelo Viscotek GPCmax VE2001 equipado com colunas OHpak SB-807 HQ e OHpak SB-806 HQ e acoplado a um índice de refração modelo Viscotek Detector VE3580 da marca Malvern Panalytical. Dissolveu-se 10 mg de XY em 1,5 mL de  $\text{NaNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e após, a solução foi filtrada com um filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22  $\mu\text{m}$ . O  $\text{NaNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  foi utilizado como eluente nas análises com vazão de 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$  a 35 °C. Calculou-se as distribuições de massa molar com o uso de 10 padrões de polietilenoglicol (PEG) e de óxido de polietileno (PEO), sendo de 238, 599, 2100, 6690, 18600, 42700, 86200, 222000, 450000, 969000 g.mol $^{-1}$ . A curva de calibração é obtida com um gráfico de Log Mw vs volume de retenção dos padrões.

#### Resultados

A **Figura A1** mostra a curva cromatográfica da análise de SEC para XY. É possível notar que a XY é representada por duas populações que diferem em suas massas molares. Na **Tabela A1** constam os dados obtidos na análise.

**Figura A1.** Cromatograma obtido através de análise SEC para amostra de XY.



**Tabela A1.** Dados obtidos na cromatografia SEC para XY.

<b>Pico</b>	<b>Abundância (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>M<sub>w</sub> (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> (g.mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>39,192</b>	13,30	9967	23192	2327
<b>43,367</b>	86,70	271	493	1818

O valor de  $M_n$  corresponde a massa molar numérica média e  $M_w$  a massa molar ponderada média. A largura da distribuição é representada pela polidispersidade, que pode ser determinada a partir da razão  $M_w/M_n$ .<sup>120</sup> Há um componente que eluiu primeiro, este possui alta massa molecular ( $M_n = 9967 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_w = 23192 \text{ g.mol}^{-1}$ ), é menos abundante e tem polidispersidade de  $2327 \text{ g.mol}^{-1}$ . Já o segundo componente, que eluiu posteriormente apresentou baixa massa molecular ( $M_n = 271 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $M_w = 493 \text{ g.mol}^{-1}$ ), é mais abundante na amostra e tem polidispersidade de  $1818 \text{ g.mol}^{-1}$ . Para o caso de se considerar apenas um pico de eluição da XY, novos parâmetros são obtidos através da análise, sendo que há apenas um valor para cada massa molecular ( $M_n = 307 \text{ g.mol}^{-1}$  e  $M_w = 3265 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e apresentou polidispersidade de  $10621 \text{ g.mol}^{-1}$ .

## ANEXO 2. DETERMINAÇÃO DE TEOR DE AÇÚCAR REDUTOR NA XY

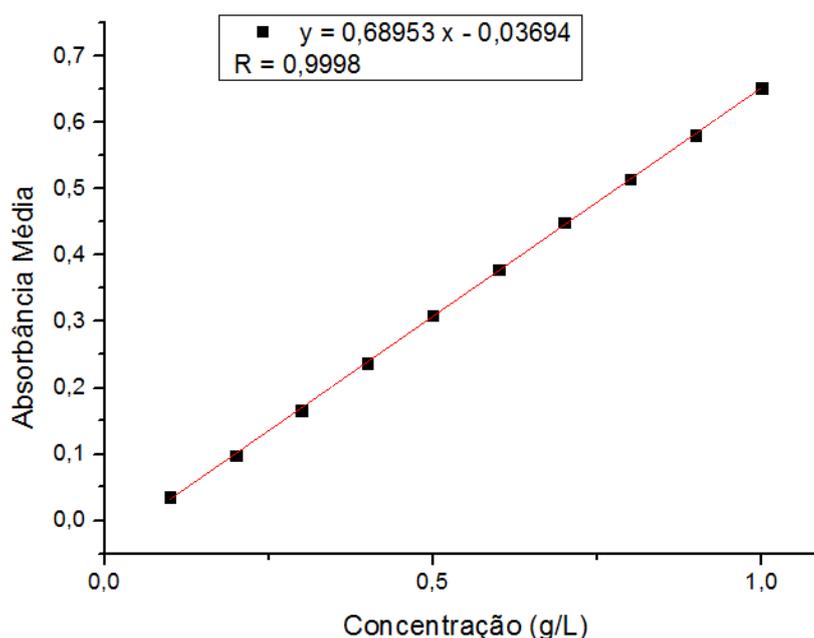
### Metodologia

Para determinar o teor de açúcar redutor contido na estrutura da XY utilizou-se o método do reagente DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico), pois este reage com açúcares redutores e forma composto colorido que tem absorção máxima em 540 nm.<sup>121</sup> Logo, utilizou-se técnica de espectroscopia de UV-Vis para obter a concentração do produto da reação, que é diretamente proporcional ao teor de açúcar redutor na amostra. Construiu-se curva de calibração com gráfico de absorbância vs concentração de glicose. Os testes com XY foram realizados em duplicata e analisados em equipamento UV-Vis da marca Nova, modelo 1800UV em 540 nm.

### Resultados

O DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico) apresenta coloração amarelada. Pode reagir com grupos carbonilas dos açúcares redutores, sendo reduzido para ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, composto que tem coloração laranja escuro e apresenta sua absorbância máxima em 540 nm. A partir da curva de calibração obtida para o DNS (**Figura A2**) foi possível determinar o teor de açúcar redutor nas amostras de XY. Os dados calculados constam na **Tabela A2**.

**Figura A2.** Curva de calibração de DNS+Açúcar obtido em 540 nm.



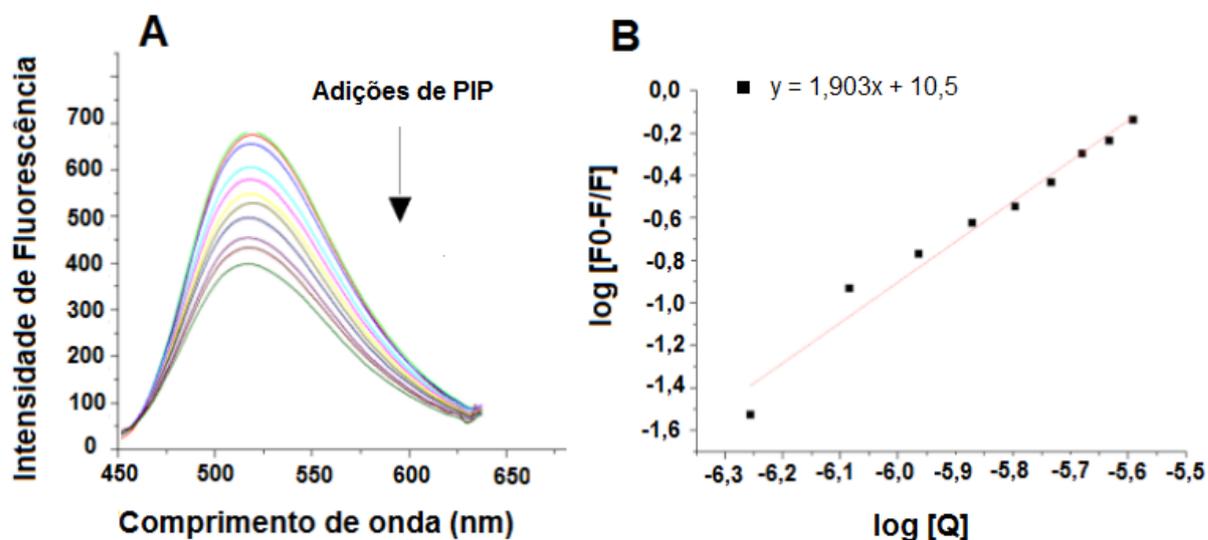
**Tabela A2.** Dados calculados para XY após análise de microscopia de UV-Vis.

<b>C<sub>XY</sub> (g/L)</b>	<b>Absorbância</b>	<b>C<sub>AR</sub> (g/L)</b>	<b>C<sub>AR</sub> (g/g)</b>	<b>A.R. %</b>	<b>Média %</b>	<b>SD</b>
0,50	0,18	0,30	0,60	60,05	61,39	1,90
0,50	0,19	0,31	0,63	62,74		

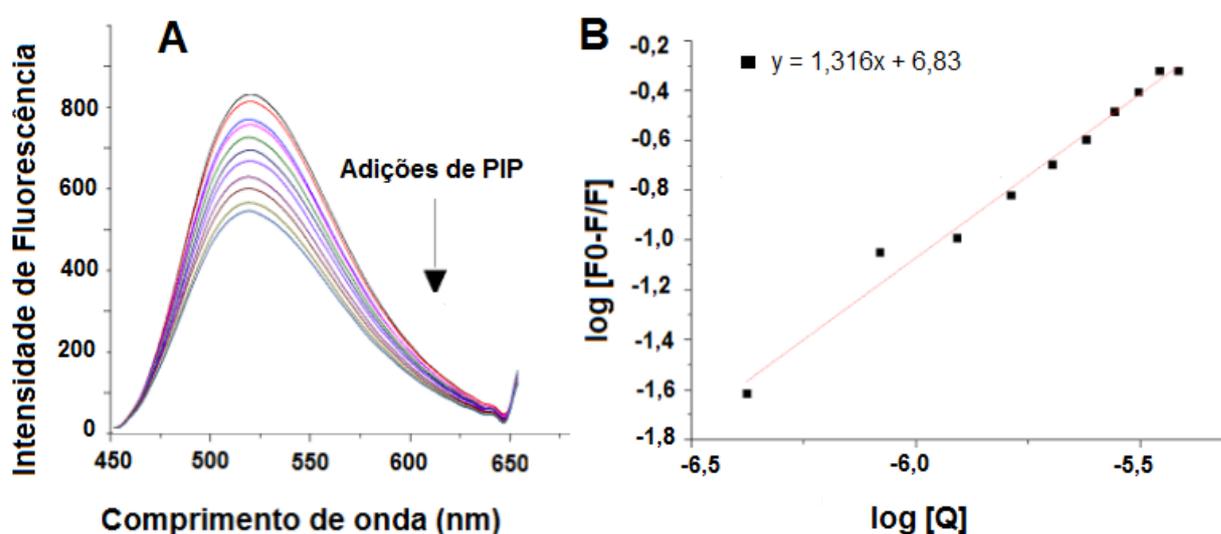
Através do uso do método de DNS foi possível determinar que a porcentagem média de açúcares redutores na amostra de XY foi de 61,39 % com desvio padrão de 1,90.

## ANEXO 3. ESTUDO DE FLUORESCÊNCIA DE CUR, PIP E P123.

**Figura A3.1.** (A) Espectro de emissão da CUR ( $0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) na presença de P123 ( $0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso. (B) Gráfico produzido a partir da equação de Stern-Volmer.

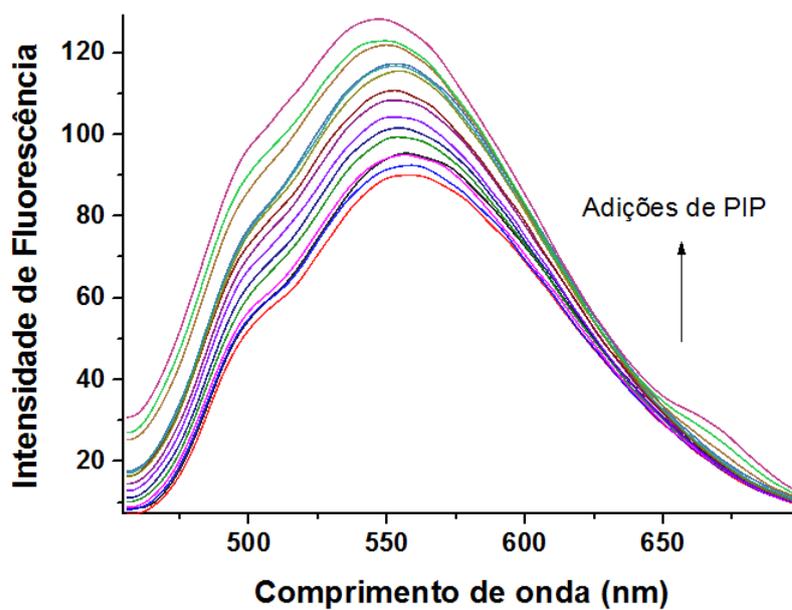


**Figura A3.2.** (A) Espectro de emissão da CUR ( $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) na presença de P123 ( $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) variando em função da concentração de PIP em solvente aquoso. (B) Gráfico produzido a partir da equação de Stern-Volmer.

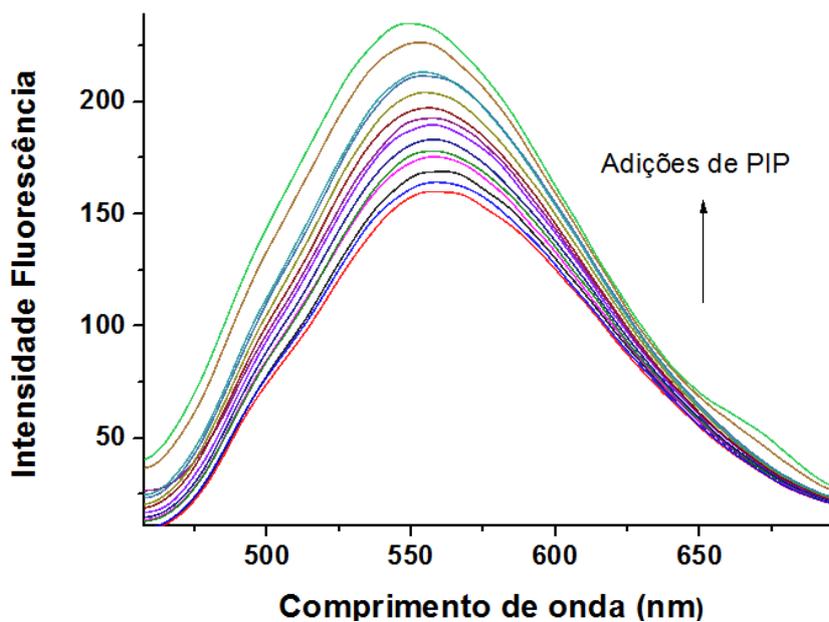


## ANEXO 4. ESTUDO DE FLUORESCÊNCIA DE CUR E PIP

**Figura A4.1.** Espectro de emissão de fluorescência de CUR ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura A4.2.** Espectro de emissão de fluorescência de CUR ( $0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após sucessivas adições de PIP em solvente aquoso na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



## ANEXO 5. MICROSCOPIA SEM DAS MEMBRANAS DE QTS E XY.

**ANEXO A5.** Microscopias SEM das superfícies das membranas **(A)** 60; **(B)** Q50 e **(C)** Q40 para os pHs 5,5 (cima) e 7,4 (baixo). As escalas utilizadas são de 50  $\mu\text{m}$ .

