Raquel de Souza Ribeiro, Talita Goulart da Silva, Luciara da Silva, Ester da Costa de Almeida, Roberta Helena Mendonça. Estudo da Incorporação de Maravilha Curativa em matrizes de Policaprolactona e Quitosana. *In Propriedades e Aplicações dos Biomateriais, Editores Carlos Nelson Elias, Ana Karine Rocha de Andrade Nattrodt e Roberto Hirsch Monteiro. Edição digital 2022.* ***definir pela organização ISBN XXX, DOI YYY e pág.***

ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE MARAVILHA CURATIVA EM MATRIZES DE POLICAPROLACTONA E QUITOSANA

Raquel de Souza Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, raquel.rib@outlook.com, 0000-0003-2178-2868

Talita Goulart da Silva, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tgoulart11@gmail.com, 0000-0001-8170-5528

Luciara da Silva, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, luciaraufrrj@hotmail.com, 0000-0002-3882-7471

Ester Costa de Almeida, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, estercosta@ufrrj.com.br, 0000-0002-2446-1173

Roberta Helena Mendonça, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, robertahmendonca@uffrrj.br, 0000-0003-1034-7027

RESUMO

A Engenharia Tecidual é um campo de inovação promissor, o qual busca novas alternativas para o tratamento de tecidos danificados por doença, lesão ou trauma. Este trabalho tem por objetivo produzir matrizes de Policaprolactona (PCL) e Quitosana, em diferentes proporções mássicas, e analisar a incorporação do fármaco Maravilha Curativa do DrHumphrey's, sob diferentes temperaturas. Assim, a pesquisa visa, além de potencializar a absorção de fármaco das matrizes, ser o estudo inicial da criação de um biopolímero biocompatível capaz de absorver e liberar fármacos para uso futuro no âmbito da Engenharia de Tecidos Ósseos. Neste ensaio, as matrizes produzidas, através de metodologia própria, foram imersas no fármaco citado sob temperatura ambiente e à 50°C, e as análises realizadas foram Variação de Massa e Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os resultados mostram que as amostras com maior porcentagem de quitosona tendem a melhor incorporarem o fármaco. No entanto, a metodologia adotada para confecção das matrizes não garantiu as proporções mássicas estipuladas inicialmente. Além disso, é possível observar que o carreamento a quente fora mais bem sucedido do que o feito sob temperatura ambiente, aumentando a capacidade de absorção das amostras testadas, apesar de não demonstrarem grandes variações.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; biopolímero; incorporação de fármacos.

1 Introdução

A Engenharia Tecidual é uma inovação confiável, a qual combate lesões teciduais ao mesmo tempo que reproduz o microambiente fisiológico. Ao revolucionar a medicina tradicional, a Engenharia de Tecidos possui atualmente pesquisas relacionadas a construção de transportadores para liberação de fármacos, acompanhamento de doenças e

até substituição de órgãos (RAHMATI, *et al*., 2021 VUNJAK-NOVAKOVIC e WOBMA, 2016).

No âmbito da liberação de fármacos, já fora comprovado que dois fatores são importantes para a melhor entrega de medicamentos: a liberação controlada e a eficiência da segmentação. Ambos podem ser alcançados com a escolha do material transportador. Esta decisão é a melhor forma para minimizar efeitos colaterais e garantir uma alta concentração do fármaco na área a ser tratada (DENG, GOULD, ALI, 2021; JOHARI, *et al.*, 2021).

A quitosana é um polímero natural excelente para este tipo de aplicação. Este material além de possuir alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, apresenta naturalmente boa adesão mucosa. Ademais, dispõe de grupos funcionais que facilitam modificações químicas, detém atividade antibacteriana, apresenta capacidade de absorção e ação antioxidante. No entanto, este polímero demonstra baixa solubilidade em PH neutro ou alcalino (AHSAN, *et al*., 2018; DEEPTHI, *et al*., 2016; JOHARI, *et al.*, 2021).

O polímero sintético policaprolactona, PCL, é amplamente utilizado na área biomédica, incluindo sistemas de liberação de fármacos. Isto se deve a sua compatibilidade com uma grande variedade de ingredientes farmacêuticos. Além disso, o poliéster possui degradação lenta, a facilidade de fabricação, baixo custo e fácil manipulação pela sua baixa temperatura de *melting* (Tm) (DENG, GOULD, ALI, 2021; HUTMACHER e WOODRUFF, 2010).

A mistura destes dois polímeros pode ser observada em trabalhos como os de Deng, Gould, Ali (2021)*;* Johari, *et al* (2021) e Soares (2022). Segundo Johari (2021), esta combinação pode ser feita de forma mecânica ou química, ao ligar os grupos funcionais dos dois polímeros. O presente trabalho, através de metodologia própria, irá aquecer o PCL em solução de quitosana para que facilite a junção mecânica dos mesmos.

A *Hamamelis Virginiana* conhecida como "*Witch Hazel*" é uma pequena árvore da família *Hamamelidaceae*, originada na América do Norte. Na sua casca e folha estão presentes os taninos hamamelitaninos e proantatocianidinas, juntamente com alguns polifenóis e ácido gálico. Ambos, casca e folhas, são utilizados para a obtenção do extrato e do destilado desta planta que possui propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Por este motivo, as aplicações desta planta medicinal abrangem desde o tratamento de distúrbios gastrointestinais, hemorroidas e doenças de pele (queimaduras leves, acnes e inflamações) até a indústria de cosméticos, estando presentes em loções, cremes e tônicos capilares (ALIZADEH, NASROLLAHZADEH e ROSTAMI-VARTOONI, 2016; DAWID-PAC, 2013).

Este trabalho tem por objetivos produzir matrizes de PCL e quitosana através de uma nova metodologia, realizar o estudo da incorporação do fármaco Maravilha Curativa (*Hamamelis Virginiana*), sob temperaturas diferentes, e compreender a influência da proporção mássica e da temperatura na capacidade de absorção das amostras. É um estudo que almeja ser a pesquisa inicial para o desenvolvimento de um biopolímero biocompatível a ser utilizado na Engenharia Tecidual.

Cabe pontuar por fim que este ensaio fora realizado em paralelo com o trabalho descrito no artigo publicado de Ribeiro, *et al* (2022).

2 Materiais e métodos

2.1 Preparo das amostras de PCL e Quitosana

No preparo das matrizes foram utilizadas PCL em esferas, (Capa 6500, com peso molecular médio 50,000g/mol), e Quitosana em pó, de baixo peso molecular. A pesagem dos materiais fora realizada fazendo uso de vidro relógio e de balança analítica. Além disso, os

filmes foram produzidos de acordo com as proporções mássicas da Tabela 1, visando analisar a capacidade da quitosana de aprimorar a capacidade de absorção dos materiais formados.

Tabela 1. Proporções massa/massa e massas de Quitosana e PCL.

Amostras	Quitosana (%)	PCL (%)	Massas de PCL (g)	Massas de Quitosana (g)
1	-	100	1,06	0
2	25	75	1,06	0,35
3	40	60	1,06	0,71
4	50	50	1,06	1,06

A Figura 1 descreve o processo desenvolvido e empregado neste trabalho. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

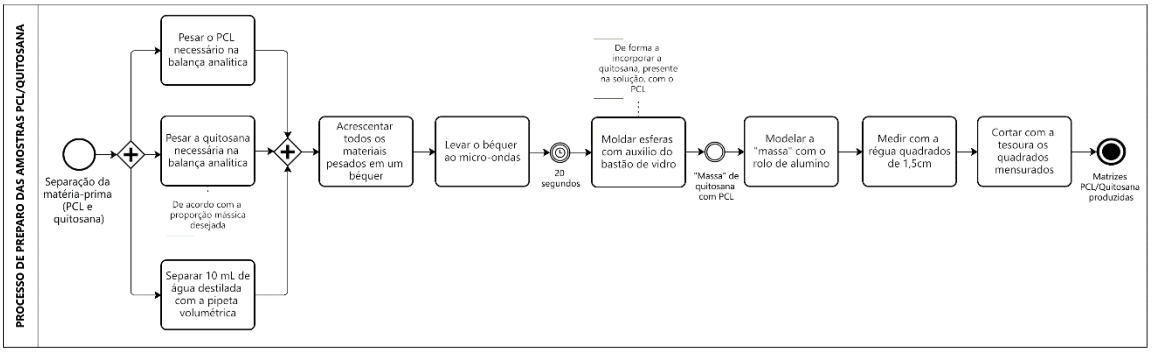


Figura 1. Processo de Preparo das Amostras PCL/Quitosana.

Vale ressaltar que o tempo de aquecimento foi o suficiente para alcançar a temperatura de amolecimento do PCL, deixando o material no ponto de "melting". Além disso, no preparo das amostras de PCL puro utilizou-se o mesmo método sem o acréscimo da Quitosana na solução de água destilada.

2.2 Variação de massa das matrizes em Maravilha Curativa

Neste trabalho, utilizou-se o medicamento Maravilha Curativa do *Dr. Humphrey's*, forma a qual a *Hamamelis Virginiana* é comercializada, produzido pela empresa Pinus Farma. A composição do medicamento consiste no extrato alcóolico da planta.

Para a análise da capacidade de absorção do fármaco citado, utilizou-se o método da análise da variação de massa (VM), Equação 1. Na determinação da VM, é necessário medir-se a massa inicial (Mo) e a massa final (Mf) ao final do tempo pré-determinado para o experimento.

$$VM\ (\%) = \frac{Mf - Mo}{Mo} \times 100 \qquad (1)$$

Ademais, este estudo sucedeu sob temperaturas diferentes, um sob temperatura ambiente e outro sob temperaturas mais altas. Em ambos os experimentos, as matrizes foram colocadas em béqueres separados de 10 mL, identificados e submersos em 1 mL de Maravilha Curativa, medida com uma pipeta volumétrica de 1mL.

2.2.1 Variação de Massa das matrizes sob temperatura ambiente em Maravilha Curativa

No ensaio, observou-se a VM das matrizes imersas em Maravilha Curativa, medindo-se a variação da massa (Mf) relativa à sua massa inicial (Mo) em intervalos de 15 minutos na

primeira hora e depois em intervalos de 30 minutos pelas 8 horas seguintes, ou até que a massa se estabiliza-se, ou seja, deixava-se de variar.

Para medição da Mf nos intervalos, manuseava-se a matriz com o auxílio da pinça, secava-se o filme em papel toalha por 3 segundos de cada lado e depositava-a sobre uma placa petri já na balança analítica tarada, para coletar o peso real da amostra.

2.2.2. Variação de Massa das matrizes a quente em Maravilha Curativa

Dentro de uma vidraria maior, posicionada em cima da manta aquecedora, colocou-se os béqueres com as amostras em solução para realizar o experimento em banho maria. Na Figura 2, é possível verificar a metodologia utilizada.

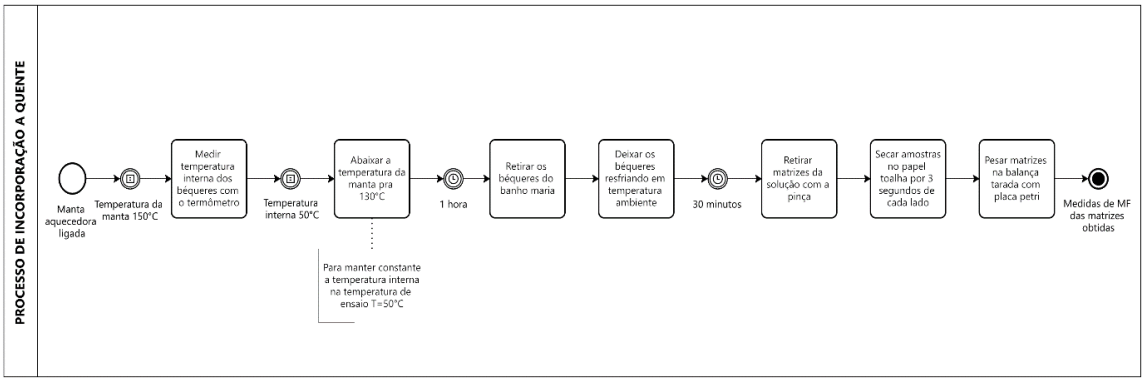


Figura 2. Processo de incorporação a quente das Amostras PCL/Quitosana.

2.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O equipamento Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (Nicolet, modelo 6700 - IQ/DQI/UFRJ), fora utilizado para as análises de interações entre PCL e quitosana.

3 Resultados

3.1 Produção das matrizes

O procedimento ocorreu como descrito na Figura 1. Durante o processo, mais especificamente no aquecimento do PCL em solução de quitosana, foi possível visualizar claramente quando o PCL alcançou a sua temperatura de “melting” por conta da sua coloração. Uma vez que na temperatura ambiente o material citado apresenta tonalidade branca opaca e após a etapa se torna transparente, como mostra na Figura 3.

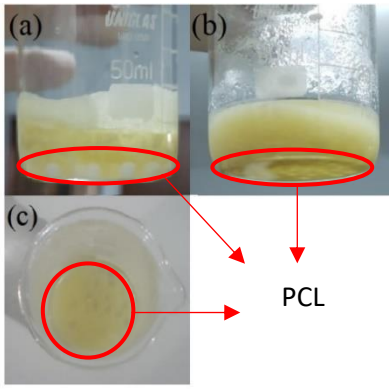


Figura 3. PCL sólido em solução com quitosana (a) antes do aquecimento; (b,c) após aquecimento por micro-ondas.

Além disso, as matrizes produzidas exibem diferença de cor. O filme preparado na solução mais concentrada de quitosana possui tom mais amarelado comparado com as outras amostras, como apresenta a Figura 4.

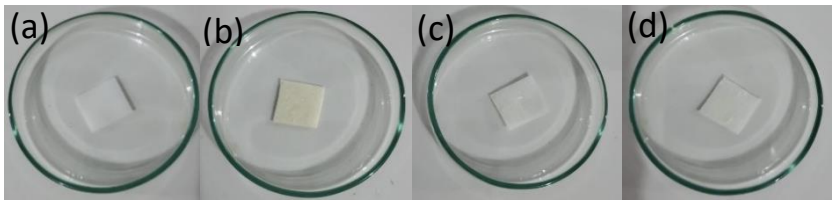


Figura 4. Amostras de PCL/Quitosana em proporções mássicas diferentes. (a) PCL puro;(b) 50% PCL/50% de Quitosana (c) 60% PCL/40% de Quitosana; (d) 75% PCL/25% de Quitosana.

3.2 Estudo da Variação de Massa das Amostras

Para a execução deste estudo, os dados dos pesos das matrizes, após carreamento, foram plotados na ferramenta de gráficos e análises, *OriginProTrial* 2019.

3.2.1 Variação de Massa das matrizes sob temperatura ambiente em Maravilha Curativa

A Figura 5 mostra os resultados obtidos para o fármaco Maravilha Curativa sob temperatura ambiente, após as medidas realizadas e o cálculo da Equação 1. Nela, é importante destacar o número pequeno de pontos; isto se deve as duas horas decorridas de experimento. Portanto, não é possível afirmar que ocorreu a estabilização da variação de massa. Cabe relembrar que neste procedimento as amostras imersas em Maravilha Curativa foram medidas na primeira hora em um intervalo de 15 minutos e na segunda hora, de 30 em 30 minutos.

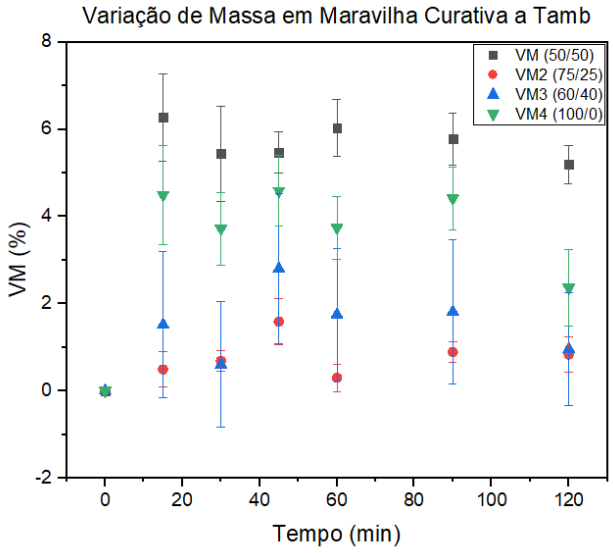


Figura 5. Variação de Massa em Maravilha Curativa a temperatura ambiente.

3.2.2 Variação de Massa das matrizes a quente em Maravilha Curativa

A incorporação a quente ocorreu de acordo com o processo descrito na Figura 2 e os resultados foram obtidos com base na Equação 1. A pesagem sucedeu antes e após o procedimento, porque durante ele as amostras amoleciam, tornando difícil a pesagem sem danificar as mesmas.

Vale destacar que durante o processo o tempo necessário para que a temperatura interna alcançasse 50°C foi de 40 minutos. Visando manter esta temperatura constante, diminui-se a temperatura da manta aquecedora de 150°C para 130°C. Após 50 minutos de experimento, pode-se observar o borbulhamento do fármaco.

Além disso, após o processo de inchamento a quente, no fundo dos béqueres fora possível visualizar uma deposição de quitosana, levantando a possibilidade de o material ter se desprendido da matriz.

Para mais, na questão do estudo de Variação de Massa, sem a realização da cinética, a Figura 6 mostra os resultados obtidos com essa abordagem.

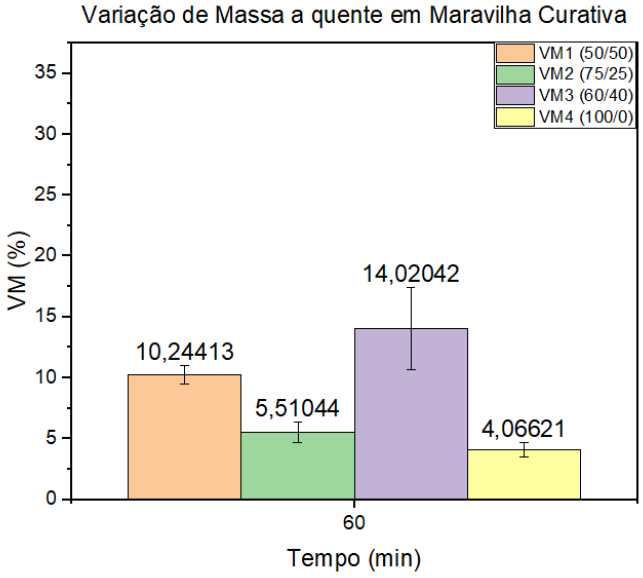


Figura 6. Variação de Massa a quente em Maravilha Curativa.

3.3 Espectrometria de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Nesta pesquisa, realizou-se análises de FTIR para observar possíveis interações do PCL com a quitosana, antes da incorporação do fármaco. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos na análise, feitos na ferramenta *SpectraGryph* 1.2.

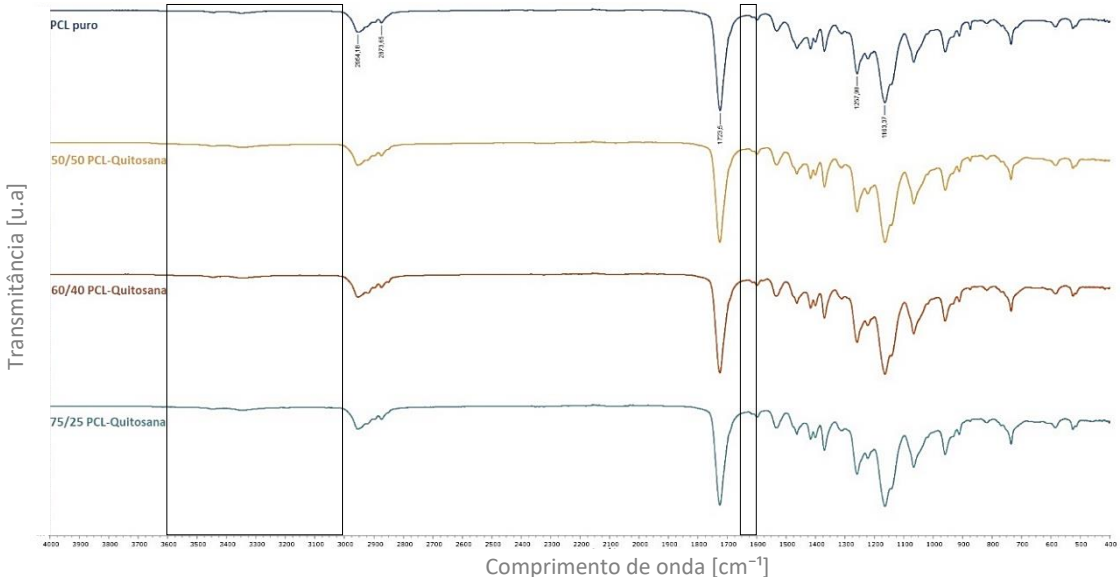


Figura 7. FTIR das amostras produzidas de PCL puro e PCL/Quitosana.

4 Análise e discussão

4.1 Produção das matrizes

Apesar da diferença de coloração entre as matrizes observada na Figura 4, o aumento da presença de quitosana no filme, na Figura 3, deve-se a proporção de quitosana na solução, da cor amarelo, a qual mesmo depois do estágio de modelagem da "massa" continuou presente no béquer. Isto significa que as proporções mássicas previamente estipuladas não puderam ser garantidas.

4.2 Estudo da Variação de Massa das Amostras

4.2.1 Variação de Massa das matrizes sob temperatura ambiente em Maravilha Curativa

Como mostrado na Figura 5, é possível pontuar que dentre os resultados, a maior VM (%) foi obtida na amostra com proporção 50/50 de PCL/Quitosana e a VM (%) decresce conforme a porcentagem de quitosana na matriz diminui, até que o menor resultado fora do filme de PCL puro, reforçando a hipótese da influência da quitosana neste processo.

4.2.2 Variação de Massa das matrizes a quente em Maravilha Curativa

A partir da análise da Figura 6, cabe ressaltar que em comparação com o processo a temperatura ambiente, não há grandes variações na VM(%), como podia ser esperado. Entretanto, ainda assim, alcançou-se melhores resultados e de inchamento, com exceção da matriz de PCL puro.

4.3 Espectrometria de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Tabela 2 (LIMA, 2006; LAWRIE, 2007) mostra as vibrações características da quitosana.

Tabela 2. Bandas no FTIR para a Quitosana.

Bandas (cm^{-1})	Atribuição
1024, 1064 e 1150	Deformação axial do C-O da ligação éter
1380	Deformação angular simétrica do CH_3
1412	Deformação angular $–CH_2$
1599	Deformação angular N-H da amida II
1640	Deformação axial de C=O (amida I)
2871 e 2931	Deformação axial de C-H do CH_2 e CH_3
3312	Deformação axial de 0-H e N-H

Na Figura 7, pode-se averiguar que entre 3000 cm^{-1} e 3600 cm^{-1}, onde se observaria uma mudança em função da presença do grupo -NH da quitosana, visto em alguns casos na literatura (Wu, 2005), não ocorreu. Tal como a deformação axial de C=O do grupo amida, observada entre 1600 cm^{-1} e 1650 cm^{-1}, também referente a quitosana, não apresentou novas quedas, como observado em outro estudo (Zhaodong, et al., 2013). Estes fatos, também podem ser observados em algumas pesquisas (Goulart et al., 2021; Ghosal et al., 2018; Zanetti, et al., 2019), comprovando a capacidade do PCL de encapsular a quitosana, impedindo verificar a interação dos dois polímeros em análises de FTIR.

5 Conclusões

No estudo, foi possível observar que a metodologia empregada para a confecção das matrizes, infelizmente não garantiu as proporções mássicas estipuladas. Além disso, na

análise de FTIR, não foi possível observar as interações entre os dois polímeros utilizados, PCL e Quitosana.

Por fim, a incorporação do fármaco fora bem-sucedida e através do estudo da variação de massa, foi possível comprovar que o inchamento a quente potencializa a capacidade de absorção das matrizes produzidas, obtendo melhores resultados comparados a incorporação sob temperatura ambiente realizada. Cabe também pontuar que resultados ainda melhores, com maiores variações de massa em ambas temperaturas, foram obtidos em Ribeiro, *et al* (2022), no qual utilizou-se o fármaco Tintura de Arnica.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Rede NanoSaúde.

Referências

AHSAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 110, p. 97-109, 2018.

ALIZADEH, M.; NASROLLAHZADEH, M.; ROSTAMI-VARTOONI, A. Green synthesis of perlite supported silver nanoparticles using Hamamelis virginiana leaf extract and investigation of its catalytic activity for the reduction of 4-nitrophenol and Congo red. **Journal of Alloys and Compounds**, Qom, p. 309-314, Abril 2016.

DAWID-PAC, R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. **Postepy Dermatol Alergol**, p. 170-177, Junho 2013.

DENG, X.; GOULD, M.; ALI, M. A. Fabrication and characterisation of melt-extruded chitosan/keratin/PCL/PEG drug-eluting sutures designed for wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111696, 2021.

DEEPTHI, S. et al. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, Kochi, n. 93, p. 1338-1353, Março 2016.

JOHARI, M. A. et al. Comparison Study Between Encapsulation of Acalypha indica Linn Extracts with Chitosan-PCL and Chitosan-OA. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2021. p. 012007.

GHOSAL, K.; GHOSH, D.; DAS, S. K.. Preparation and evaluation of naringin-loaded polycaprolactone microspheres based oral suspension using Box-Behnken design. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 49-57, 2018.

GOULART DA SILVA, T. et al. Polycaprolactone/alendronate systems intended for production of biomaterials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 28, p. 50678, 2021.

HUTMACHER, D. W.; WOODRUFF, M. A. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone. **Progress in Polymer Science**, 7 Abril 2010. 1217-1256.

LAWRIE, G.; Keen, I.; Drew, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LIMA, M. S. P. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico).** 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química; Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

RAHMATI, M. et al. Electrospinning for tissue engineering applications. **Progress in Materials Science**, v. 117, p. 100721, 2021.

RIBEIRO, R. de S. et al. Effect of temperature on the incorporation of Arnica tincture (Arnica Montana) in Polycaprolactone and Chitosan matrices: Efeito da temperatura na incorporação da tintura de Arnica (Arnica Montana) nas matrizes de Polycaprolactona e Quitosana. **STUDIES IN ENGINEERING AND EXACT SCIENCES**, v. 3, n. 3, p. 423-438, 2022.

SOARES, I. et al. Drug Delivery from PCL/Chitosan Multilayer Coatings for Metallic Implants. **ACS omega**, v. 7, n. 27, p. 23096-23106, 2022.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; WOBMA, H. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review**. Tissue Engineering Part B: Reviews, 22 Fevereiro 2016. 101-113.

WU, C. A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan. **Polymer,** v. 46, n. 1, p. 147-155, 2005.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering**: C, v. 97, p. 198-207, 2019.

ZHAODONG W., et al. A novel and simple procedure to synthesize chitosan-graft-polycaprolactone in an ionic liquid. **Carbohydrate Polymers,** v. 94, n. 1, p. 505-510, 2013.