



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Isabel Portela Rabello

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE GELATINA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS
EM ULCERAÇÕES DE MUCOSA ORAL**

CAMPINA GRANDE - PB

2017

Isabel Portela Rabello

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE GELATINA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS
EM ULCERAÇÕES DE MUCOSA ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Coorientador: Dr. Raúl García Carrodegua

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande - PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

R114d Rabello, Isabel Portela.
Desenvolvimento de membranas de gelatina para liberação controlada de fármacos em ulcerações de mucosa oral / Isabel Portela Rabello. – Campina Grande, 2017.
99 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Raúl Garcia Carrodeguas".
Referências.

1. Estomatite Aftosa. 2. Sistemas de Liberação de Fármacos. 3. Biomaterial. 4. Triancinolona Acetonida. 5. Matricaria. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Carrodeguas, Raúl Garcia. III. Título.

CDU 616.31:615.012(043)

VITAE DE ISABEL PORTELA RABELLO

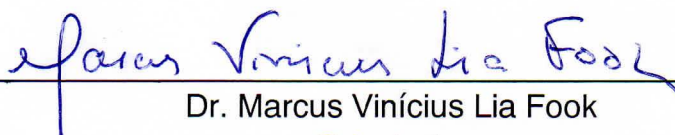
- Cirurgiã Dentista pela Universidade Estadual da Paraíba (2010);
- Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2012);
- Especialista em Dentística pelo Centro Odontológico de Estudos e Pesquisas (2013);
- Especialista em Odontologia do Trabalho pela Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic (2015);

ISABEL PORTELA RABELLO

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE GELATINA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FÁRMACOS EM ULCERAÇÕES DE MUCOSA ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de **Doutor em Ciência
e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 24/02/2017



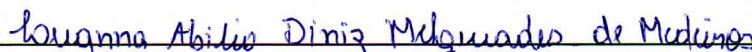
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



Dr.^a Carmem Dolores de Sá Catão
Examinadora Externa
UAMED/UFCG



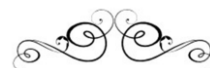
Dr. Helio de Lucena Lira
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.^a Luanna Abílio Diniz Melquiades Medeiros
Examinadora Externa
CSTR/UFCG

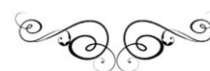


Dr.^a Maria Roberta de Oliveira Pinto
Examinadora Externa
DQ/UEPB



Aos meus pais Ana e Gildo.

Aos meus avós Isa e Edison,
Albertina (*in memoriam*) e
Francisco (*in memoriam*).



AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, um lar estruturado e determinação para estudar e suportar o cansaço de cada madrugada mal dormida, cada fim de semana abdicado, por me conduzir em desafios que eu não sabia que era capaz de vencer.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook pela orientação, ensinamentos e oportunidades proporcionadas ao longo dessa caminhada. Foram muitos os desafios, mas aprendi e cresci com cada um deles.

Ao Dr. Raúl García Carrodegua pela orientação, apoio, prestatividade e bons momentos compartilhados.

Ao Dr. Miguel Angel Rodríguez Barbero por me ensinar que empatia e sensibilidade transcendem aspectos culturais.

Ao corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da UFCG pelos conhecimentos transferidos e apoio para que todas as etapas fossem cumpridas.

Aos meus pais, Gildo e Ana. Ser filha de vocês é motivo de muito orgulho. Obrigada por sempre andarem ao meu lado, pelo apoio, pelo amor que sinto em cada atitude.

A Nathan, por me incentivar a acreditar mais em mim e a tentar ser melhor, dia após dia, no que faço.

Aos meus irmãos, Germana e Guilherme, meus espelhos profissionais. Obrigada por acompanharem cada passo meu e por torcerem sempre por mim.

Aos meus cunhados Rachel e Reinaldo, irmãos que ganhei. Obrigada por sempre se fazerem presentes na minha vida, pelas conversas, brincadeiras e apoio.

A Eduardo, Ana Luísa e Larissa, por me ensinarem que sempre é possível amar mais.

Aos meus avós, tios e primos pelo convívio e alegrias proporcionadas.

A todos os companheiros do CERTBIO pela amizade, ajuda, apoio técnico e tantos momentos bons compartilhados. Em especial a Glória, Thiago, Rosseberg, Greyce, Rita, Wladymyr, Daniel, Rafaella Menezes, Luanna, Rosana, Hudson, Hugo, Otto, Klaidson, Alecsandra, Gislaine, Ítalo, Márcio, Sandro, Samuel, Alana, Anne, Valéria, Thais, Rafaela Quinto, Paulo, Katilayne, Darlyson, Felipe, Rodolfo, Kleilton, Silvia, Dayana, William e Vitor. Agradeço também a todos os membros do NGI, por fazerem de tudo para que o CERTBIO funcione de maneira efetiva em todos os aspectos, em especial a Sr. Sérgio, Pedro, Tânia, Rosita, Suyana, Josilene e

Toninho. Agradeço também a Val e Paulinha, pela convivência nestes anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa pelas contribuições e melhorias desta tese, além da valiosa amizade.

A todos que compõem o Instituto de Cerámica y Vidrio, pela dedicação e hospitalidade durante os seis meses em que convivemos. Em especial a Raúl García, Miguel Angel, Pilar Pena, Luis Contreras, Eugenio García, Sara Serena, Alberto Pérez, Vicente, Miguel Gómez e Nilo Cornejo.

À equipe do Laboratório de Síntese de Peptídeos do Instituto de Química da UNESP, em especial ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, Dr.^a Larissa Mendes e João Augusto Oshiro Junior, pelo apoio e hospitalidade durante a realização dos ensaios desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Engenharia de Alimentos da UFCG, em especial ao Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti-Mata e a Dr.^a Renata Duarte Almeida pela boa vontade e ajuda prestada no desenvolvimento desta Tese.

À Prof.^a Dr.^a Carmem Dolores de Sá Catão por ter sido minha maior incentivadora pelos caminhos da pesquisa. Com você aprendi que com persistência, ética e dedicação podemos vencer todos os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Helio de Lucena Lira, Prof.^a Dr.^a Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros e Prof. Dr.^a Maria Roberta de Oliveira Pinto por aceitarem fazer parte desta banca de defesa de doutorado e pelos ensinamentos transferidos ao longo de minha jornada acadêmica.

À Capes, pelo essencial apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desta etapa.

“No hay medicina que cure lo que no cura la felicidad.”

Gabriel García Márquez

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

A Estomatite Aftosa Recorrente (EAR) é uma das mais comuns alterações patológicas da mucosa oral, de tamanho e duração variáveis, tipicamente encontradas na mucosa oral não-queratinizada. Os agentes tópicos são o primeiro tratamento de escolha para essas ulcerações, por serem eficazes e seguros, porém apresentam como desafio a efetividade da liberação da droga no local da lesão. Medicamentos tópicos são facilmente removidos da área alvo e essa limitação pode ser restringida através do desenvolvimento de membranas que permaneçam em contato prolongado com a mucosa e liberem, gradativamente, o medicamento sobre a lesão. Esta pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento de uma membrana mucoadesiva de gelatina que libere triancinolona acetona e extrato de *Chamomilla* gradativamente sobre a lesão. Preparou-se uma solução a 4% de gelatina associada a 0,8% de glicerina e nela foi incorporada 0,0048% de triancinolona acetona e/ou 0,48% de extrato de *Chamomilla*. A solução final foi vertida em placas de petri e o solvente evaporado em estufa com circulação de ar a 30°C. As membranas foram reticuladas por três técnicas: solução de glutaraldeído a 0,5% e 2,0%, radiação ultravioleta e solução de genipina a 0,1%, 0,001% e 0,0005%; e caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), ensaio de biodegradação *in vitro* e grau de intumescimento, estudo da liberação controlada da triancinolona acetona e de sua associação com o extrato de *Chamomilla*, ensaio de molhabilidade e, por fim, ensaio de bioadesão. Através da análise por MEV pode-se perceber que as membranas de gelatina com extrato de *Chamomilla* apresentam uma superfície homogênea, possivelmente com total incorporação do extrato, enquanto nas membranas com triancinolona acetona pode-se perceber pequenos aglomerados do fármaco. As variáveis apresentaram perfis de micrograma muito próximos quando comparadas através da técnica de AFM, exceto para o caso da membrana com incorporação do extrato de *Chamomilla*, que apresentou maior homogeneidade superficial. As membranas reticuladas por genipina apresentaram o grau de intumescimento e o perfil de biodegradação *in vitro* mais satisfatórios para o uso pretendido do que quando reticuladas por radiação Ultravioleta. Através da solução com concentração de genipina a 0,0005% e tempo de exposição de 1 minuto atingiu-se o período desejado de permanência da membrana em saliva artificial antes de sua completa biodegradação. A presença do extrato de *Chamomilla* na membrana de gelatina incorporada com triancinolona acetona pode auxiliar não só na terapêutica como na modificação do perfil de liberação do fármaco, promovendo uma liberação mais lenta. A membrana que apresentou menor hidrofobicidade e maior bioadesão foi a com incorporação de triancinolona acetona. As variáveis mostraram-se homogêneas em seu comportamento de liberação e com baixo desvio padrão, fato que ressalta a metodologia coerente utilizada para a pesquisa. As membranas produzidas atingiram as expectativas da pesquisa, sendo a variável com a incorporação de ambos os fármacos a mais adequada para o uso pretendido.

Palavras-chave: Estomatite Aftosa. Sistemas de liberação de fármacos. Biomaterial. Triancinolona Acetona. Matricaria.

ABSTRACT

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) is one of the most common pathological oral mucosal lesion, of variable size and duration, typically found in the non-keratinized oral mucosa. Topical agents are the first treatment choice for these kind of ulcerations, because they are effective and safe. However, it present as a challenge the effectiveness of drug delivery at the local site of injury. Topical medications are easily removed from the target area and this limitation may be restricted by the development of membranes which remain in prolonged contact with the mucosa and gradually release the drug into the lesion. For this research, gelatin membranes incorporated with triamcinolone acetonide and chamomile extract were develop in isolation and with the association of both drugs in a membrane. With 4% solution concentration of gelatin associated with 0.8%, concentration of glycerin was prepared and 0.0048% of triamcinolone acetonide and / or 0.48% of chamomile extract was incorporate. The final solution was spilled into petri dishes and the solvent was evaporated in a kiln with air circulation at 30 °C. The membranes were crosslinked by three techniques: glutaraldehyde solution, ultraviolet radiation and genipine solution; therefore, characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), in vitro biodegradation assay and swelling degree measurements, study of Triamcinolone Acetonide controlled release and its association with the chamomile extract, wettability test and, finally, bioadhesion test. About the SEM analysis, the gelatin membranes with chamomile extract a homogeneous surface were observed with total incorporation of the extract, while in the membranes with triamcinolone acetonide could be perceived small agglomerates of the drug. The variables presented very close micrograph profiles when compared through the AFM technique, except for the membrane with the incorporation of the chamomile extract, which presented more homogeneity surface. Genipine-crosslinked membranes showed the swelling degree and the in vitro biodegradation profile more satisfactory for the intended use than when cross-linked by Ultraviolet radiation. Through the solution with 0.0005% genipine concentration and exposure time of 1 minute was reached the desired period of membrane permanence in artificial saliva before its complete biodegradation. The presence of chamomile on the gelatin membrane incorporated with triamcinolone acetonide supported not only in the therapy but also in the modification of the drug release profile, promoting a slower rate release. The membrane that presented less hydrophilicity and more bioadhesion was the one with the incorporation of triamcinolone acetonide. The variables were homogeneous in their drug release behavior and presented low standard deviation, fact that emphasizes the coherent methodology used for this research. The membranes produced reached the expectations of this research, being the variable with the incorporation of both drugs the most adequate for the intended use.

Keywords: Aphthous Stomatitis. Oral transmucosal drug delivery. Biomaterial. Triamcinolone Acetonide. Matricaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estomatite Aftosa Recorrente em suas três variações clínicas. Da esquerda para a direita: menor, maior e herpetiforme.....	25
Figura 2 - Comparação entre a administração de fármaco por métodos convencionais (a) e por liberação controlada (b).....	27
Figura 3 - Estrutura da mucosa oral.....	28
Figura 4 - Representação estrutural da molécula da Triancinolona acetonida.....	31
Figura 5 - Forma de apresentação da triancinolona acetonida.....	31
Figura 6 - Flores de <i>Chamomilla recutita</i>	32
Figura 7 - Estrutura da gelatina, exibindo os aminoácidos mais comumente encontrados e as ligações peptídicas.....	33
Figura 8 - Aminoácidos mais frequentes na estrutura da gelatina.....	34
Figura 9 - Estrutura química da genipina.....	37
Figura 10 - Reação de reticulação da gelatina por genipina.....	37
Figura 11 - Estrutura química do glutaraldeído.....	38
Figura 12 - Reação de reticulação da gelatina por glutaraldeído.....	39
Figura 13 - Processo de obtenção do extrato de <i>Chamomilla</i>	43
Figura 14 - Processo de obtenção das membranas de gelatina.....	44
Figura 15 - Processo de preparação das membranas de gelatina com os fármacos Triancinolona Acetonida (a) e extrato de <i>Chamomilla</i> (b). A imagem (c) refere-se ao aspecto das membranas com os fármacos em sua composição.....	45
Figura 16 - Aspecto da membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído a 0,5% após secagem.....	45
Figura 17 - Amostras expostas à radiação ultravioleta.....	46
Figura 18 - Aspecto das amostras reticuladas por genipina. As imagens (a) e (b) mostram, em sua parte superior, as membranas antes da reticulação, enquanto na parte inferior as membranas após a reticulação. A imagem (c) refere-se ao seu acondicionamento.....	46

Figura 19 - Fluxograma representativo dos passos desenvolvidos nesta pesquisa.....	47
Figura 20 - Microscópio Eletrônico de Varredura da Hitachi, modelo S-4700...	49
Figura 21 - Microscópio de Força Atômica Standa 071905 acoplado ao Dulcinea Control Unit.....	50
Figura 22 - Amostras durante o ensaio de Biodegradação <i>in vitro</i> e grau de intumescimento, mergulhadas em saliva artificial.....	51
Figura 23 - Sistema utilizado como meio de liberação <i>in vitro</i> para o estudo da liberação controlada de fármaco.....	52
Figura 24 - Curva de Calibração para o ensaio em HPLC.....	53
Figura 25 - Equipamento Dataphysics modelo OCA-20, utilizado para o ensaio de molhabilidade.....	53
Figura 26 - Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido.....	53
Figura 27 - Texturômetro equipado com anel de mucoadesão. (a) conjunto preso com auxílio de garras e (b) Anel de mucoadesão e prova cilíndrica de 10 mm de diâmetro.....	55
Figura 28 - Prova cilíndrica durante o ensaio de bioadesão.....	56
Figura 29 - Apresentações comerciais testadas como método comparativo pelo ensaio de bioadesão.....	56
Figura 30 - Membranas de gelatina sem reticulação (G) (a); com reticulação por genipina (GGe) (b) e por radiação ultravioleta (GUV) (c).....	58
Figura 31 - Membranas de gelatina com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (GA05) (a) e a 2,0% (GA20) (b).....	58
Figura 32 - Membrana de gelatina com ambos os fármacos, reticulada por radiação ultravioleta.....	59
Figura 33 - Membranas de gelatina reticuladas por genipina, onde (a) é GCGe; (b) é GGe; (c) é GTGe e (d) é GTCGe.....	59
Figura 34 - Imagens de MEV da membrana de gelatina sem reticulação (a), com reticulação por UV (b), com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (c) e a 2,0% (d) e com reticulação por genipina a 0,0005% (e). Aumento de 200x.....	60

Figura 35 - Imagens de MEV do corte seccional das amostras de membranas de gelatina sem reticulação (a), com reticulação por UV (b), com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (c) e a 2,0% (d) e com reticulação por genipina a 0,0005% (e). Aumento de 1000x.....	61
Figura 36 - Imagens de MEV da membrana da gelatina com incorporação do extrato de <i>Chamomilla</i> (a), com incorporação da triancinolona acetonida (b) e com incorporação de ambos (c), reticuladas por UV. Aumento de 250x.....	62
Figura 37 - Imagens de MEV da membrana da gelatina com incorporação do extrato de <i>Chamomilla</i> (a), com incorporação da triancinolona acetonida (b) e com incorporação de ambos (c), reticuladas por genipina. Aumento de 500x.....	63
Figura 38 - Imagens de MEV da triancinolona acetonida micronizada com aumentos de 2000x (à esquerda) e 50000x (à direita).....	64
Figura 39 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina e perfil extraído do micrograma.....	65
Figura 40 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> e perfil extraído do micrograma.....	65
Figura 41 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com triancinolona acetonida e perfil extraído do micrograma.....	65
Figura 42 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com triancinolona acetonida e <i>Chamomilla</i> e perfil extraído do micrograma.....	66
Figura 43 - Espectro vibracional da membrana de gelatina.....	67
Figura 44 - Figura 36 - Espectro vibracional das membranas obtidas com e sem reticulação, onde G = membrana de gelatina sem reticulação; GGe = membrana de gelatina reticulada por genipina; GA = membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído; GUV = membrana de gelatina reticulada por radiação ultravioleta.....	68
Figura 45 - Espectro vibracional das membranas de gelatina com e sem os fármacos, reticuladas por UV: Membrana de gelatina (GUV), membrana de gelatina com triancinolona acetonida (GTUV), membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> (GCUV) e	

membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTCUV).....	68
Figura 46 - Espectro vibracional das membranas de gelatina com e sem os fármacos, reticuladas por genipina: membrana de gelatina (GGe), membrana de gelatina com triancinolona acetona (GTGe), membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> (GCGe) e membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTGe).....	69
Figura 47 - Espectro vibracional das membranas de gelatina reticuladas por glutaraldeído: membrana de gelatina reticulada com glutaraldeído a 0,5% (GA05) e membrana de gelatina reticulada com glutaraldeído a 2,0% (GA20).....	70
Figura 48 - Grau de Intumescimento para a membrana de gelatina sem reticulação.....	71
Figura 49 - Grau de Intumescimento das diferentes membranas de gelatina reticuladas com UV: membrana de gelatina (GUV), membrana de gelatina com triancinolona acetona (GTUV), membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> (GCUV) e membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTCUV).....	72
Figura 50 - Intumescimento das membranas de gelatina reticuladas por genipina com uma concentração de genipina a 0,1% e tempo de exposição ao agente reticulante de 20, 6, 3 horas, 10 e 1 minuto...	73
Figura 51 - Intumescimento das membranas de gelatina reticuladas por genipina em soluções de concentração a 0,1%, 0,001% e 0,0005% e tempo de exposição de 1 minuto.....	74
Figura 52 - Gráfico da liberação acumulada das membranas de gelatina com triancinolona acetona (GTGe) e gelatina com triancinolona acetona e extrato de <i>Chamomilla</i> (GTGe), ambas reticuladas por genipina a 0,0005%.....	75
Figura 53 - Ângulo de contato entre uma gota de água e as diferentes membranas: (a) GTGe - face lisa; (b) GTGe - face riscada; (c) GCGe - face lisa; (d) GCGe - face riscada; (e) GTGe - face lisa; (f) GTGe - face riscada.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de reagentes utilizados na pesquisa.....	42
Tabela 2 - Relação de amostras desenvolvidas e siglas.....	48
Tabela 3 - Composição da saliva artificial de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2012).....	51
Tabela 4 - Ângulos de contato e condição de molhabilidade.....	54
Tabela 5 - Ângulo de contato obtido durante o ensaio de molhabilidade ± desvio padrão.....	76
Tabela 6 - Valores de força de adesão para as membranas de gelatina com os fármacos em sua composição. Resultados expressos como a média ± desvio padrão.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
CSIC	Conselho Superior de Investigações Científicas
EAR	Estomatite Aftosa Recorrente
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICV	Instituto de Cerâmica e Vidro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
TG	Análise Termogravimétrica
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Biomateriais.....	22
2.2 Estomatite Aftosa Recorrente.....	24
2.2 Mucoadesivos orais para Liberação de Fármacos.....	26
2.4 Triancinolona Acetonida.....	29
2.5 <i>Chamomila recutita</i>	32
2.6 Gelatina.....	33
2.6.1 Reticulação da membrana de gelatina.....	35
2.6.1.1 Radiação Ultravioleta.....	36
2.6.1.2 Genipina.....	36
2.6.1.3 Glutaraldeído.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Local da pesquisa.....	41
3.2 Reagentes.....	41
3.3 Procedimento experimental.....	42
3.4 Análise das Características comportamentais dos biomateriais desenvolvidos nesta pesquisa.....	49
3.4.1 Estudo Morfológico.....	49
3.4.2 Estudo composicional.....	50
3.4.3 Estudo de Biodegradação e Intumescimento <i>in vitro</i>	50
3.4.4 Estudo da liberação controlada do fármaco.....	52
3.4.5 Estudo da molhabilidade.....	53
3.4.6 Estudo da bioadesão.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Estudo Morfológico.....	58
4.2 Estudo composicional.....	67
4.3 Estudo de Biodegradação e Intumescimento <i>in vitro</i>	70
4.4 Estudo da liberação controlada do fármaco.....	74
4.5 Estudo da molhabilidade.....	76

4.6 Estudo da bioadesão.....	78
5 Conclusões	80
Sugestões para Pesquisas futuras.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Biomaterial é toda substância que foi projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usado para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, tanto em humanos quanto em animais (Williams, 2009).

Os biomateriais são utilizados de forma ampla e ilimitada na Medicina, Odontologia e Biotecnologia, sendo uma recente área do conhecimento, embora as primeiras aplicações empíricas tenham sido datadas da Era Pré-histórica. A ampla diversidade e sofisticação de materiais utilizados atualmente na área da saúde é a comprovação do significativo avanço científico e tecnológico ocorrido nos últimos 60 anos (Ratner, 2004; Abramson *et al.*, 2004).

Uma ampla variedade de polímeros tem sido utilizada em dispositivos biomédicos no campo da ortopedia, odontologia, cardiologia e em associação aos tecidos moles do corpo humano. Entre os polímeros de origem natural que possuem papel relevante na área dos biomateriais estão o colágeno e a gelatina. Apesar de esses polímeros apresentarem indubitável importância e uso difundido através de numerosas aplicações, muitas vezes são ofuscados pela grande variedade de polímeros sintéticos utilizados atualmente (Abramson *et al.*, 2004).

Na prática, a gelatina tem sido clinicamente aplicada como enxerto de defeitos temporários e curativo, pelas suas propriedades de biodegradabilidade e citocompatibilidade, e em sistemas de liberação controlada de fármaco pela sua adequada plasticidade, flexibilidade e por apresentar a condição de formar hidrogel (Kim *et al.*, 2004).

A introdução de práticas relativas à liberação controlada de fármaco no reparo de alguma disfunção ou lesão presente em organismos vivos é bastante recente. Em se tratando de lesões de mucosa oral, seja ela causada por trauma ou desequilíbrios fisiológicos, são prescritos medicamentos que atuam de acordo com os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, podendo ser antibióticos, anestésicos ou antiinflamatórios. O procedimento mais utilizado entre os Cirurgiões Dentistas é a prescrição de triancinolona acetona em orabase, que é aplicada diretamente sobre a mucosa ulcerada.

Outro tratamento que pode ser adotado é o uso de agentes calmantes, como é o caso do extrato de *Chamomilla*. Embora a triancinolona acetonida seja a medicação de predileção da classe odontológica para o tratamento indicado, sua forma de apresentação não possibilita um contato íntimo prolongado ao tecido oral, devido sua fácil remoção por ações rotineiras como alimentar-se ou mesmo falar, ocasionando uma recuperação em prazo mais longo do que o desejado. No caso da pomada à base de extrato de *Chamomilla*, esse fator é ainda mais intenso, devido ao seu caráter hidrofílico, solubilizando-se rapidamente quando em meio bucal.

A gelatina foi a matéria-prima escolhida como base para a fabricação da membrana porque, além de suas reconhecidas propriedades de biocompatibilidade, mucoadesividade, solubilidade e biodegradabilidade, promove o crescimento celular mais rápido, acelerando a cicatrização da lesão; possui propriedades hemostáticas, inibindo possíveis sangramentos em uma área que se encontra mais fragilizada; e servirá como barreira mecânica, promovendo o isolamento e proteção da área sensibilizada, reduzindo o alojamento de bactérias e fungos na região da ulceração.

Esta pesquisa estabelecerá condições para que as propriedades da gelatina sejam mantidas e sua associação com os fármacos-alvo resulte em efeitos sinérgicos terapêuticos no tratamento da enfermidade.

Diante do exposto, a presente pesquisa propõe-se a desenvolver uma membrana mucoadesiva de gelatina com liberação controlada de triancinolona acetonida e extrato de *Chamomilla* para possível tratamento de Estomatite Aftosa Recorrente.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Os biomateriais podem ser considerados como produtos adequados para a utilização em seres humanos, com a finalidade de tratamento ou alívio de uma enfermidade ou lesão, e também para a substituição e modificação de sua anatomia ou de um processo fisiológico, podendo ser de origem natural ou sintética. Os biomateriais podem ter, fundamentalmente, origem metálica, polimérica e cerâmica, também podendo apresentar características obtidas da combinação destes, nos chamados compósitos (Biomateriales, 2012).

A diferença mais significativa entre um biomaterial e os outros tipos de materiais é sua habilidade em permanecer em um meio biológico sem prejudicá-lo e sem ter suas propriedades afetadas por ele. Nas últimas duas décadas, o grande progresso em termos de desenvolvimento de novos materiais ou refinamento na composição e microestrutura de materiais já existentes pode ser explicado através do entendimento de alguns conceitos como biocompatibilidade, resposta imunológica do organismo que o aloja e sua interação com as células humanas (Basu; Nath, 2009).

O estudo dos biomateriais está essencialmente atrelado a dois conceitos básicos: funcionalidade e biocompatibilidade, sendo eles os pilares de sustentação no estudo e aplicação desse importante campo da ciência. Funcionalidade é o conjunto de propriedades inerentes ao material que o permite desempenhar uma função desejada, enquanto que biocompatibilidade é a aceitação do material pelo meio biológico que o aloja (Pucci *et al.*, 2002).

Para que assim possam ser considerados, os biomateriais devem estar de acordo com a norma ISO 10993. Essa norma é um guia para seleção e testes de materiais que serão usados na confecção dos dispositivos. Por meio dela, avaliam-se as características do biomaterial, como as propriedades mecânicas, químicas, toxicológicas, biológicas, físicas, elétricas e morfológicas (ISO, 2012).

Existem três importantes aspectos relacionados à biocompatibilidade que os candidatos à biomateriais buscam alcançar nos mais diversos meios fisiológicos. Primeiramente, os biomateriais devem ser compatíveis bioquimicamente, atóxicos, não irritantes, não alergênicos e não carcinogênicos. Em segundo lugar, devem ser

biomecanicamente compatíveis com os tecidos corpóreos circundantes. Por último, uma bioadesividade deve ser estabelecida entre o biomaterial e os tecidos corpóreos, sendo o resultado da não liberação de componentes prejudiciais ao organismo. É necessário enfatizar, no entanto, que a biocompatibilidade de um biomaterial depende do local de sua aplicação (Basu; Nath, 2009).

A seleção de um material biocompatível deve iniciar com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão. Como essas propriedades são extremamente sensíveis a variações da estrutura do material em escala micro ou nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento de como se correlaciona a microestrutura com as propriedades desejadas (Soares, 2002).

Os materiais chamados biocompatíveis podem ser classificados em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. Nenhum material implantado no corpo é totalmente inerte, todos induzem uma resposta do tecido hospedeiro. Os materiais bioativos permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação química entre o tecido e o próprio material, também chamada por bioadesão. Nesse caso, o tecido é capaz de interagir com o material, sem a intervenção de tecido fibroso (Almeida Filho, 2008; Vallet, 1997; Cao, 1996; Hanawa, 1991).

Por tratar-se de dispositivos aplicáveis a diversos órgãos e tecidos do corpo, os biomateriais estão presentes na rotina de diversos profissionais da saúde, a exemplo dos Cirurgiões Dentistas. Desta forma, a meta ideal da Odontologia Moderna é reabilitar o paciente com contorno, função, conforto, estética, fonação e saúde ideais (Misch, 2006).

É constante e atual a procura por materiais biologicamente aceitáveis, que apresentem as propriedades físicas e mecânicas similares às dos tecidos biológicos, além de serem econômicos e de fácil manipulação. Tal busca tem resultado no desenvolvimento tecnológico de biomateriais que possibilitem diferentes alternativas de utilização. O expressivo desenvolvimento de biomateriais para utilização em clínica odontológica na última década tem representado um poderoso instrumento terapêutico (Russo *et al.*, 2010; Bugarin Júnior, 2007).

2.2 Estomatite Aftosa Recorrente

O termo “aphthai” foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates, que viveu entre os séculos V e IV a.C., referindo-se a uma doença oral, provavelmente candidíase. A primeira descrição clínica confiável da Estomatite Aftosa Recorrente (EAR) foi publicada por Mikulicze Kümmel em 1888. Em língua inglesa, a primeira referência à EAR foi publicada por Sibley em 1899, no *British Medical Journal*, descrevendo o que hoje conhecemos como EAR menor. Ele atribuiu a ocorrência das lesões ao estresse psíquico, nomeando-as úlceras neuróticas (Rogers, 1977).

A Estomatite Aftosa Recorrente (EAR) é uma das mais comuns alterações patológicas da mucosa oral, de tamanho e duração variáveis, tipicamente encontradas na mucosa bucal não-queratinizada. Na população geral a prevalência constatada varia de 5 a 66%, a depender das características étnicas de cada grupo populacional, com uma média de 20%. Apesar das constantes pesquisas e da preocupação clínica, sua causa permanece obscura. Diferentes subgrupos de pacientes parecem ter diferentes causas para a ocorrência da EAR. É um processo patológico que gera destruição da mucosa em uma provável reação imunológica mediada pelos linfócitos T, que são originárias da medula óssea e tem como principal função a proteção do corpo contra infecções (Neville *et al.*, 2009; Sirera *et al.*, 2006; Neville *et al.*, 2004; Fraiha *et al.*, 2002).

Os principais agentes etiológicos relacionados são: alergias, predisposição genética, deficiências nutricionais, anormalidades hematológicas, fatores imunológicos, influências hormonais, agentes infecciosos, suspensão do fumo, trauma e estresse. Quando todos os vários subgrupos combinam-se, as várias causas agrupam-se em três categorias: imunodesregulação primária, diminuição da barreira da mucosa e aumento na exposição antigênica, podendo uma ou mais dessas categorias apresentarem-se combinadas em subgrupos de pacientes (Neville *et al.*, 2009).

As alterações imunológicas que são induzidas por eventos estressantes podem provocar efeitos negativos sobre a saúde dos indivíduos. Pessoas submetidas a estresse são mais suscetíveis a padecer de enfermidades infecciosas ou agravar a severidade das mesmas, dificultando, inclusive, a cura de feridas. Outro aspecto relevante quanto ao desequilíbrio do sistema imunológico por agentes estressantes é o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas

são importantes proteínas que atuam como mediadores da comunicação entre células vivas, coordenando respostas quanto à reparação tecidual e outras reações imunes (Kawamura *et al.*, 2001; Leserman *et al.*, 2000; Yudkin *et al.*, 2000).

A Estomatite Aftosa Recorrente demonstra uma tendência definitiva de ocorrer entre familiares. Quando ambos os pais apresentam um história de EAR há 90% de chance de o filho também desenvolver. Ela é classificada de acordo com a variação clínica em: menor, maior e herpetiforme (Figura 1). As lesões diferem entre si em virtude do tamanho, número, tempo de duração e formação ou não de cicatrizes. As ulcerações aftosas menores são as mais frequentes, englobando 80% dos casos. Geralmente medem menos de 10 mm e duram de 10 a 14 dias. As ulcerações aftosas maiores acometem 10% dos pacientes afetados, podendo medir até 30 mm, sendo consideradas mais severas, durando semanas ou meses, e costumam deixar cicatrizes. Já a variação do tipo herpetiforme medem de 1 a 3 mm, porém o número de lesões pode ser muito elevado, chegando a 100 delas por surto. Sua denominação deriva da suposta semelhança com as lesões orais provocadas pela gengivoestomatite herpética primária. No entanto, o vírus do Herpes Simples não apresenta nenhuma relação com a EAR (Neville *et al.*, 2009; Miziara *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2004).



Figura 1: Estomatite Aftosa Recorrente em suas três variações clínicas. Da esquerda para a direita: menor, maior e herpetiforme.

Devido à falta de precisão no estabelecimento da causa da EAR, a terapêutica não é específica, sendo utilizados de forma paliativa antiinflamatórios, antibióticos e anestésicos, além de medicamentos com propriedades naturais e homeopáticos, para alívio da dor, redução da severidade, duração e frequência de aparecimento das úlceras e o restabelecimento das funções orais normais (Gorsky *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2009; Costa e Castro, 2013).

Os agentes tópicos são o primeiro tratamento de escolha para as ulcerações em mucosa oral, por serem eficazes e seguros. O único problema é a obtenção da efetividade da liberação da droga. Medicações tópicas são facilmente removidas da área alvo (Pereira *et al.*, 2006). Essa limitação pode ser eliminada através do desenvolvimento de membranas que permaneçam em contato prolongado com a mucosa e liberem, gradativamente, o medicamento sobre a lesão.

2.3 Mucoadesivos orais para Liberação de Fármacos

Dispositivos mucoadesivos para liberação controlada podem aumentar a efetividade da liberação transmucosa da droga, mantendo sua concentração no organismo em níveis terapêuticos, ou seja, entre o nível efetivo mínimo e o nível tóxico, inibindo a diluição da droga nos fluidos corporais, permitindo direcionamento e localização da droga no sitio específico. São utilizados quando se deseja uma ação mais prolongada, em que tanto a liberação quanto a absorção são mais lentas (Jain, 2008; Pather *et al.*, 2008).

O Sistema de Liberação Controlada de Fármaco pode ser definido como uma formulação ou dispositivo que possibilita o uso terapêutico de uma substância de maneira eficaz e segura através do controle da proporção, tempo e local da liberação da droga no corpo. Esse processo inclui a administração do agente terapêutico, a liberação do princípio ativo e seu transporte através de membranas biológicas no sítio de ação. Também pode ser definido como a interface entre a droga e o paciente, seja através de uma formulação que administre a droga para seu uso terapêutico ou um dispositivo que libere o medicamento no organismo (Jain, 2008).

Alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo da gelatina, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à liberação controlada do produto diretamente no tecido danificado. O sistema de liberação controlada permite a manutenção de níveis constantes da droga no organismo (nível terapêutico) (Figura 2), implicando numa eficiência maior na utilização do agente e aplicação diretamente no sítio de ação, produzindo altas concentrações localizadas, reduzindo ou evitando efeitos colaterais sistêmicos,

proporcionando menor frequência de administração do agente ativo e aumentando o conforto do paciente e eficácia do tratamento (Lee *et al.*, 2001).

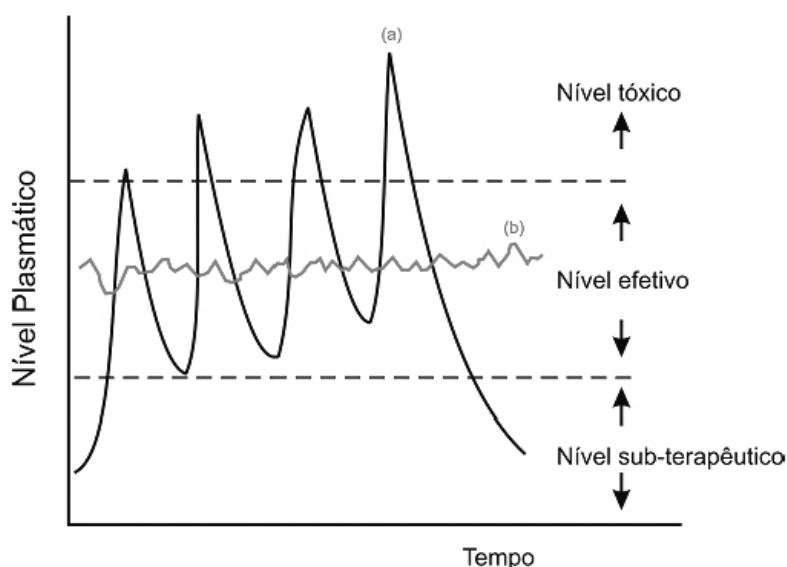


Figura 2 - Comparação entre a administração de fármaco por métodos convencionais (a) e por liberação controlada (b). Adaptado de Freire, 2012.

Os medicamentos podem ser introduzidos no corpo humano através de várias rotas, a depender da doença, do efeito desejado e da disponibilidade do fármaco. A via de administração transmucosa oral (Figura 3) favorece a introdução do fármaco no organismo por difusão, possibilita a atuação mais rápida dos fármacos, com facilidade e conveniência de aplicação, sendo um método indolor, bem aceito pelo paciente e autoadministrável (Rosalen e Groppo, 2013; Jain, 2008).

Entre outras vantagens que a liberação de fármaco pela via transmucosa oral apresenta, estão: evitar que ocorra o metabolismo pré-sistêmico, que consiste na redução da concentração do fármaco antes de atingir a circulação sistêmica, durante o processo de absorção que está geralmente relacionado ao fígado e às paredes do intestino; colaborar com um ambiente menos hostil em comparação ao estomacal em se tratando de drogas instáveis, já que o pH bucal varia entre 5,8 e 7,4 e possui menor conteúdo enzimático; fácil descontinuação do tratamento de sistemas de liberação controlada de drogas em casos de efeitos colaterais; o tempo de renovação celular da mucosa oral permite que dispositivos mucoadesivos permaneçam no local por horas ou mesmo dias, sem que a divisão celular interfira negativamente em sua adesão e ao mesmo tempo possibilitando uma rápida recuperação tecidual; por ser um meio biológico de pequeno volume, adequações de

dosagem podem ser realizadas de maneira fácil e direta, com o mínimo de efeitos colaterais (Pather et al., 2008).

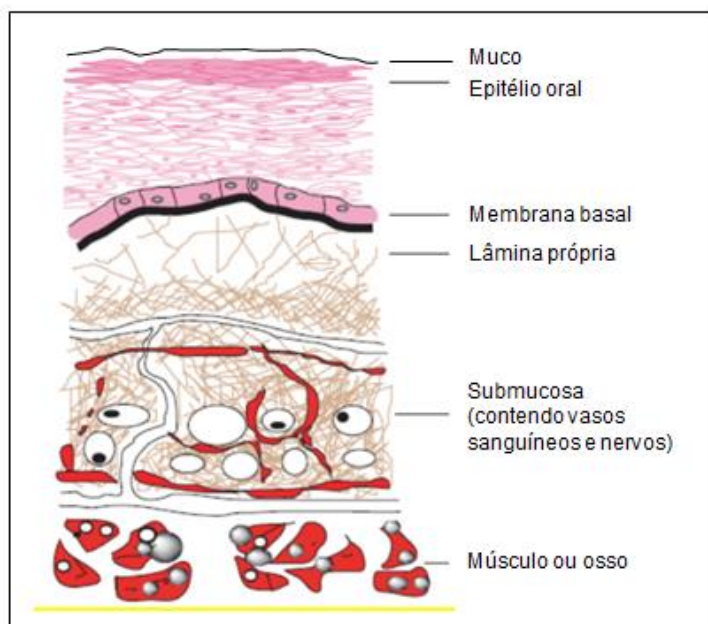


Figura 3 - Estrutura da mucosa oral. Adaptado de Smart, 2005.

Embora a mucosa oral seja uma rota de absorção com muitos pontos positivos a serem considerados, apresenta também algumas desvantagens, como: pequena superfície absorptiva ($0,01 \text{ m}^2$) em comparação ao intestino delgado (100 m^2); salivação, deglutição e movimentação das estruturas orais podem remover a droga de sua região absorptiva de preferência; a mucosa oral é menos permeável se comparada ao intestino delgado; o sabor da droga pode ser uma dificuldade para o paciente, podendo haver um descumprimento do regime de dosagem (Pather et al., 2008).

Membranas com diferentes composições tem sido utilizadas para a liberação controlada de fármacos em mucosa ocular (Mahmoud *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2010; Ludwing, 2005), nasal (Casettari e Illum, 2014; Xu *et al.*, 2014; Nazar *et al.*, 2011), vaginal (Caramella *et al.*, 2015) e bucal (Azim *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Jaipal *et al.*, 2014), sendo tais fármacos das mais diferentes origens e funções no organismo: como ciclodextrina (carboidrato) (Mahmoud *et al.*, 2011), ciprofloxacino (antibiótico) (Jain *et al.*, 2010), vitaminas (Azim *et al.*, 2015), cloridrato de buspirona (ansiolítico) (Jaipal *et al.*, 2014), etc.

Muitas pesquisas desenvolvidas recentemente apresentam a gelatina como um biomaterial de grande aplicabilidade no campo de liberação controlada de fármaco (Raja e Fathima, 2015; Bonferoni *et al.*, 2015; Sagiri *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2014). A associação da gelatina com outros materiais poliméricos, como é o caso da quitosana também tem sido estudada por vários pesquisadores (Jridi *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2014; Pok *et al.*, 2013; Pereda *et al.*, 2011), com o intuito de obter biomateriais com propriedades antimicrobiana, antioxidante, biocompatível e atóxico como membranas biodegradáveis para liberação controlada de fármacos, além de filmes comestíveis, embalagens de alimentos e desenvolvimento de novos materiais.

A triancinolona acetona tem sido utilizada em sistemas de liberação controlada de fármaco com diferentes matrizes poliméricas, como: ácido hialurônico (Saadat *et al.*, 2015), poli-caprolactona (Meng *et al.*, 2014), gelatina, na forma de scaffolds (Niu *et al.*, 2014) e esponjas (Pal, 2013), quitosana - ácido poliacrílico (Ahn *et al.*, 2002), alginato - quitosana (Lucinda-Silva *et al.*, 2010), ácido poliacrílico - hidroxipropilmetilcelulose (Mumtaz; Ch'ng 1995).

2.4 Triancinolona acetona

A história da farmacologia sem dúvida está associada à história das civilizações, a seus avanços e dificuldades, sendo definida como o estudo das drogas ou medicamentos que interagem com os organismos vivos. A partir do momento em que os princípios científicos da farmacologia foram formulados, propôs-se a aplicação prática de métodos apropriados para tratar uma determinada condição ou doença. A isso se deu o nome de farmacologia clínica ou terapêutica (Rosalen e Groppo, 2013).

As terapias com o uso de vegetais e minerais existem há tanto tempo quanto os seres humanos. As doenças humanas e o instinto de sobrevivência têm levado a sua descoberta ao longo das épocas. O uso de terapias, mesmo que bastante rústicas, começou antes dos registros históricos, graças ao instinto do homem primitivo de aliviar a dor de uma lesão colocando-a em água fria, empregando folhas frescas ou protegendo-a com lama. Por meio dessas experiências os seres humanos aprenderam que determinadas terapias eram mais eficazes que outras e, a partir desses achados, surgiu a terapia medicamentosa (Allen Jr. *et al.*, 2007).

Um medicamento é definido como o agente destinado a diagnóstico, mitigação, tratamento, cura ou prevenção de doenças em seres humanos ou animais. Uma das suas mais surpreendentes qualidades reside na diversidade das suas ações e efeitos sobre o organismo. Essa qualidade torna seu uso seletivo em várias condições patológicas comuns e raras, envolvendo órgãos, tecidos ou células (Allen Jr *et al.*, 2007).

A busca por elementos que atuem na dinâmica da reparação tecidual há muito vem sendo motivo de estudo e preocupação, principalmente no que se refere à promoção da bioestimulação celular, o que poderia resultar em aceleração no processo de cicatrização, sem causar efeitos danosos às células, tecidos ou órgãos (Barreto, 2008).

Após a ocorrência de uma lesão num tecido, iniciam-se mecanismos fisiológicos para reparar esse tecido, mas por vezes este processo é lento e causa dor, necessitando de intervenção. A fase inicial do processo de cicatrização caracteriza-se pela formação de uma matriz de proteoglicanos/glucosaminoglicanos, seguida da síntese de colágeno e elastina. O crescimento de fibroblastos e células endoteliais são cruciais na cicatrização de feridas. Para que ocorra cicatrização, as feridas passam pelo processo de inflamação, contração, re-epitelização, remodelação tecidual e formação do tecido de granulação. Atualmente existem muitos recursos que ajudam na cicatrização e amenizam a dor (Mantle *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2009).

A triancinolona acetonida é o medicamento de predileção no caso de ulcerações em mucosa oral, sendo um corticosteroide (anti-inflamatório esteroide imunossupressor) (Figuras 4 e 5), ou seja, um hormônio sintético que mimetiza as ações do cortisol endógeno secretado pela glândula adrenal. Seus efeitos terapêuticos são geralmente atribuídos à supressão de múltiplos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória, levando a uma diminuição dos níveis de mediadores químicos pró-inflamatórios no local da injúria.

Ela atua difundindo-se através das membranas celulares e forma complexos com os receptores citoplasmáticos específicos. Estes complexos penetram no núcleo da célula, unem-se ao DNA, estimulam a transcrição do mRNA e a posterior síntese de várias enzimas responsáveis pelos efeitos dos corticosteroides sistêmicos, diminuindo ou prevenindo as respostas do tecido aos processos inflamatórios e reduzindo os sintomas da inflamação sem tratar a causa subjacente.

Além disso, a triancinolona acetona inibe a acumulação de células inflamatórias, inclusive macrófagos e leucócitos, nas zonas de inflamação; inibe a fagocitose, a liberação de enzimas lisossômicas e a síntese ou liberação de mediadores químicos da inflamação; reduz a dilatação e permeabilidade dos capilares inflamados e reduz a aderência dos leucócitos ao endotélio capilar. Como imunossupressor, pode pressupor a prevenção das reações imunes mediadas pelas células, reduzindo a concentração de linfócitos timodependentes, monócitos e eosinófilos; diminui a união das imunoglobulinas aos receptores celulares de superfície e inibe a síntese ou liberação das interleucinas, diminuindo, assim, a blastogênese dos linfócitos T e a importância da resposta imune primária. Sua união às proteínas é alta. Por via oral, absorve-se de forma rápida e metaboliza-se no fígado. É eliminada principalmente mediante metabolismo seguido de excreção renal dos metabólitos inativos (BATISTUZZO et al., 2006).

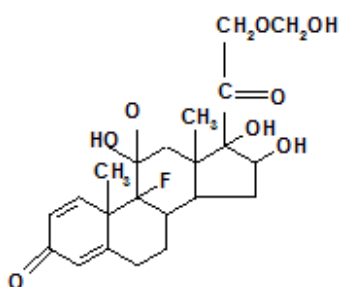


Figura 4 - Representação estrutural da molécula da Triancinolona acetona.



Figura 5 - Forma de apresentação da triancinolona acetona.

A fórmula química da triancinolona acetona é $C_{24}H_{31}FO_6$, possuindo Massa Molar 434,51 g/mol. É considerada um fármaco praticamente insolúvel em meio aquoso, tendo taxa de solubilidade de 0,03 mg/ml (Martins e Veiga, 2002). Os resultados de sua aplicação tornam-se ainda mais intensos se o contato com a mucosa oral for prolongado (Lima *et al.*, 2005; Fattah *et al.*, 2005; Guimarães Júnior, 2005).

2.5 *Chamomilla recutita*

Originalmente, todas as drogas, remédios ou medicamentos eram substâncias provenientes exclusivamente da natureza, oriundos de fontes naturais como plantas, animais e minerais (Rosalen e Groppo, 2013).

Durante os últimos 10 ou 15 anos, a medicina alternativa tem-se tornado extremamente popular. Os medicamentos à base de plantas, orais e tópicos, tornaram-se algumas das terapias alternativas mais utilizadas. Grande parte inclui substâncias vegetais usadas há vários séculos na medicina popular (Baumann, 2007).

A Fitoterapia estuda as plantas medicinais, sendo uma alternativa aos medicamentos de síntese, podendo ser utilizada tanto isoladamente como em conjunto com a terapêutica convencional. É considerada a forma de medicina mais antiga da civilização humana. Há registros do ano 2500 a.C. sobre a utilização de plantas medicinais na China, e em 2800 a.C. foi escrito o primeiro livro com referências a fórmulas de fitoterapia (Pinto, 2013).

Uma alternativa ao tratamento de ulcerações na cavidade oral é a adesão a métodos fitoterápicos, onde ganha destaque o uso da *Chamomilla recutita* (Figura 6).



Figura 6 - Flores de *Chamomilla recutita*.

Conhecida popularmente como *Chamomilla* ou matricaria, é originária da Europa e cultivada em todo o Brasil, a *Chamomilla* é popularmente utilizada como anti-inflamatório e antiespasmódico, possuindo ação calmante, ansiolítica, analgésica, carminativa, cicatrizante, emenagoga, antimicrobiana, desinfetante e emoliente. Essas propriedades devem-se aos componentes do óleo essencial,

nomeadamente α -bisabolol e flavonóides. O α -bisabolol é responsável pela formação do tecido de granulação no processo de cicatrização e os flavonoides atuam inibindo a liberação da histamina. Por outro lado, ensaios *in vitro* revelam a influência na ação proliferativa de linfócitos, o que pode representar um importante passo para o tratamento de problemas do sistema imunológico (Bedi e Shenefelt, 2002; Nascimento *et al.*, 2005; Duarte e Lima, 2003; Ramos *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2010).

2.6 Gelatina

A gelatina é resultante da desnaturação térmica do colágeno, isolado de ossos, pele e tendões de animais. Da mesma maneira que o colágeno, ela é composta por 18 aminoácidos diferentes unidos por ligações peptídicas em sua formação, cuja massa molar média varia entre 20.000 e 250.000 g/mol, dependendo do grau de hidrólise do colágeno (Figura 7). Caracteriza-se pelo grande número de glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 8) e deficiência em aminoácidos sulfurados. De acordo com a preparação, a gelatina pode ser classificada em dois tipos. A gelatina tipo A advém de pré-tratamento ácido, utilizando principalmente pele suína, enquanto que a gelatina de tipo B é proveniente de ossos e pele de gado através de pré-tratamento básico (Ray e Bousmina, 2005).

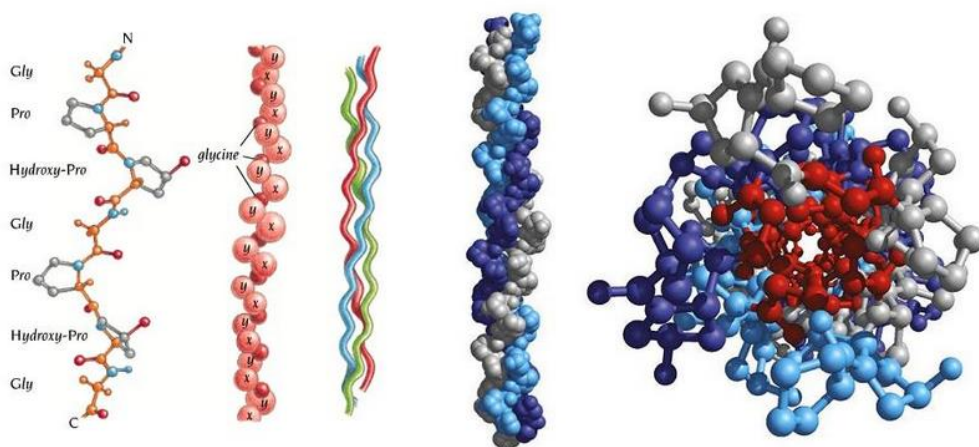


Figura 7 - Estrutura da gelatina, exibindo os aminoácidos mais comumente encontrados e as ligações peptídicas.

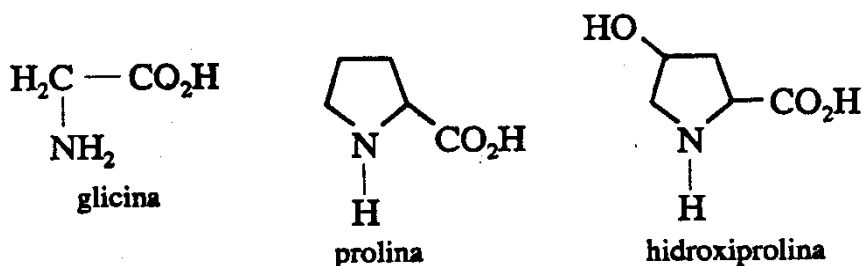


Figura 8 - Aminoácidos mais frequentes na estrutura da gelatina.

É considerada diferente de outras proteínas por apresentar uma notável ausência de ordem interna. Em nível molecular, a formação de gelatina-gel envolve uma reestruturação protéica, com a transição de um estado desordenado para uma estrutura mais ordenada, e as propriedades físicas destes géis resultam do grau de formação de junções microcristalinas (Achet e He, 1995; Ziegler e Foegeding, 1990). A transição vítrea da gelatina pode ser observada entre 43 e 53°C, que é relativa à estrutura amorfa do material, enquanto que a temperatura de fusão é em torno de 125°C, relativa à transição cristalina (Sobral *et al.*, 2011).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrado na pele, ossos, tendões e dentes. Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (Silver e Doillon, 1989).

Tanto o colágeno quanto os seus produtos de degradação são quimicamente atrativos para vários tipos de células. Seu papel na cicatrização de feridas é bem delineado, sendo um substrato natural para as células, altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipos normais. A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte bio-interativa, a qual guia e estimula apropriada formação tecidual (Lee *et al.*, 2001).

A ausência de água na gelatina produz uma distorção na conformação molecular e aumenta o número de ligações de hidrogênio intramoleculares. A desidratação do material não mantém, contudo, a sua estrutura nativa (Mogilner *et al.*, 2002). Segundo Ray e Bousmina (2005), devido a estas características, a gelatina pode ser utilizada para formação de filmes.

Uma característica de grande interesse para a aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos é sua bioadesividade, principalmente em se

tratando de aderência a mucosas corporais como é o foco desta pesquisa (Matsuda *et al.*, 1998).

Usada amplamente em Produtos farmacêuticos, principalmente em cápsulas duras e moles, microesferas e curativos, a gelatina destaca-se devido à excelente compatibilidade celular e ausência de antigenicidade, além da biodegradabilidade, plasticidade, flexibilidade e propriedades hidrogel, sendo um material de uso potencial para a liberação controlada de fármacos. A disponibilidade em diferentes formas e o baixo custo são atrativos adicionais que facilitam a seletividade e a produção em larga escala (Vercik *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2004; Bigi *et al.*, 2000; Agrawal e Athanasiou, 1997).

2.6.1 Reticulação da membrana de gelatina

A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou modificadas são interligadas por pontes de ligações formando uma rede polimérica tridimensional. A reticulação pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, ou reticulação física, formada por várias reticulações reversíveis (interação de van der Waals, ligações iônicas, pontes de hidrogênio). O processo de reticulação está geralmente relacionado à obtenção de uma estrutura física mais rígida (Lamy *et al.*, 2008).

Os filmes de gelatina apresentam limitada resistência mecânica quando comparados com filmes sintéticos e são sensíveis à umidade relativa do ar, devido à característica higroscópica da gelatina e dos agentes plastificantes que geralmente são adicionados. O aumento do grau de reticulação pode ocasionar uma modificação nas características mecânicas. Modificações químicas visando o aumento do grau de reticulação dependem da reatividade das proteínas constituintes, da especificidade do agente modificador e da configuração tridimensional molecular (Sobral *et al.*, 2011; Carvalho e Grosso, 2005; Wong e Wong, 1992).

Alterações realizadas na superfície proteica afetam a solubilidade e as interações entre as proteínas e está relacionado às propriedades apresentadas pela membrana (Phillips *et al.*, 1994). No entanto, apesar da natureza biocompatível dos produtos de partida, o processo de reticulação química normalmente empregado pode comprometer o uso de materiais subsequentes, ainda que completamente

purificado, por causa do imprevisível nível de biocompatibilidade dos grupos ligados à cadeia (Crescenzi *et al.*, 2002).

Dois agentes reticulantes foram considerados para esta pesquisa: a radiação ultravioleta e a genipina. Entretanto, como método comparativo para análise da eficácia desses agentes em se tratando de gelatina, utilizou-se o glutaraldeído.

2.6.1.1 Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta como agente reticulador é um processo físico, de baixo custo, não-térmico, sendo uma tecnologia sem ônus ambientais e que tem recebido crescente atenção nos últimos anos em pesquisas ligadas à área médica e farmacêutica. É crescente a necessidade de desenvolvimento de técnicas de reticulação através do uso de agentes naturais não-tóxicos, não-específicos, de baixo custo e prontamente disponíveis. A reticulação por radiação ultravioleta ocorre através da formação de pontes de hidrogênio e ligações de van der Waals (Bhat e Karim, 2009; Otoni *et al.*, 2012).

Quando a radiação ocorre por curto período de tempo ela possibilita a reticulação entre as moléculas da gelatina, enquanto que em uma irradiação por um período mais prolongado age na cisão das cadeias da molécula (Otoni *et al.*, 2012).

2.6.1.2 Genipina

A genipina (Figura 9) é um agente reticulante de origem natural que detém características promissoras. Possui ação antioxidativa, anti-inflamatória e atividade fibrolítica. Pertence à classe dos iridóides, que são metabólitos secundários encontrados em plantas, sendo obtida a partir da hidrólise enzimática do geniposídeo presente no fruto da *Gardenia jasminoides Ellis*, o jenipapo (Yao *et al.*, 2004; Bigi *et al.*, 2002).

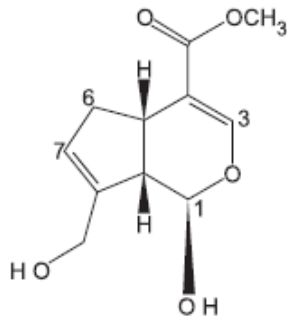


Figura 9 - Estrutura química da genipina (Koo et al., 2004).

A genipina forma ligações cruzadas com materiais protéicos e colágeno, o que é a base dos estudos para sua utilização como agente imobilizante de enzimas e como regulador de dosagem medicamentosa. Sua fórmula molecular é $C_{11}H_{14}O_5$, massa molar de 226,226g/mol e ponto de fusão em torno de $120^{\circ}C$. É solúvel em água, metanol, etanol e éter dietílico (Santoni *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2004).

A reticulação por genipina acontece em duas etapas: primeiro um rápido ataque nucleofílico do grupo amino da lisina ao anel da estrutura da genipina; em seguida acontece uma reação mais lenta, em que o grupo amino da lisina de outro fragmento da gelatina resulta em outra substituição nucleofílica (Figura 10) (Rose *et al.*, 2014).

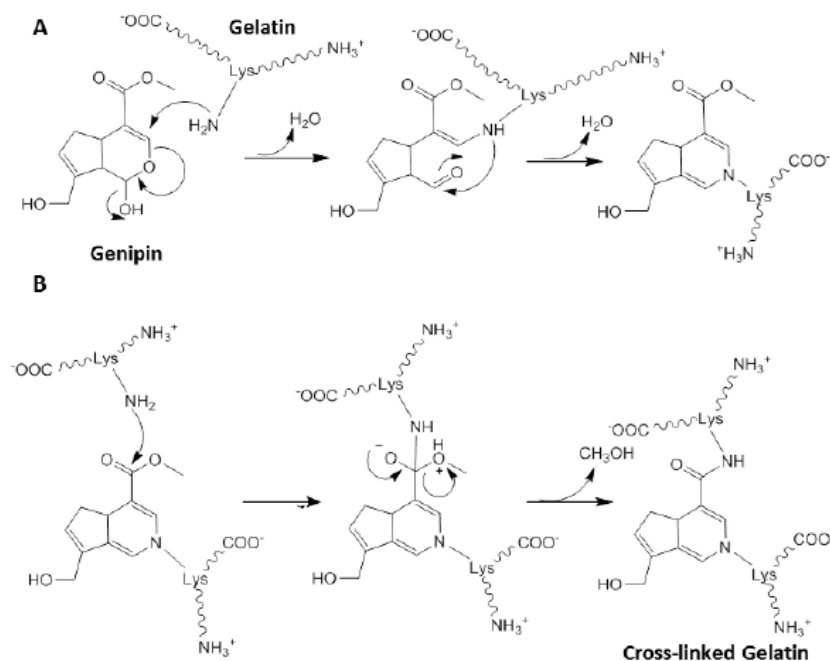


Figura 10 - Reação de reticulação da gelatina por genipina. Fonte: Rose et al., 2014.

2.6.1.3 Glutaraldeído

O glutaraldeído (Figura 11) é o agente de reticulação química mais utilizado em se tratando de materiais colagenosos, em virtude de sua alta eficiência na estabilização destes materiais (Bigi *et al.*, 2001). Por esse motivo ele foi utilizado como padrão comparativo a ser seguido para posteriores comparações aos agentes reticulantes eleitos para serem, de fato, métodos válidos de reticulação para esta pesquisa. O glutaraldeído hoje é um produto de uso suspenso na área da saúde, pelo aumento da ocorrência de casos de infecções por *Mycobacterium de Crescimento Rápido* (MCR) devido ao uso inadequado para desinfecção de agentes termosensíveis (Nota Técnica ANVISA nº2/2007 e nº5/2008). Ademais, ele é um produto tóxico, podendo afetar profissionais que o manuseiam e pacientes expostos a seus resíduos nos materiais utilizados durante o atendimento, além da contaminação ambiental quando o descarte não é realizado corretamente. Esses fatores negativos limitam seu uso quando o produto a ser reticulado trata-se de um Biomaterial, porém pode servir de parâmetro para sua reticulação por outros agentes.

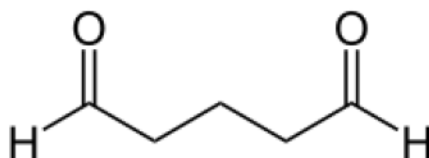


Figura 11 - Estrutura química do glutaraldeído.

A reação de reticulação do material colagenoso pelo glutaraldeído envolve os grupos amino livres da lisina ou hidroxilisina de resíduos de aminoácidos de cadeias polipeptídicas com o grupo aldeído do glutaraldeído (Figura 12). Uma solução com concentração de 0,05% (p/v) é suficiente para reticular cerca de 60% dos grupamentos ϵ -amino e, variando-se a concentração deste, são obtidos filmes de gelatina com propriedades físico-químicas distintas (Bigi *et al.*, 2001).

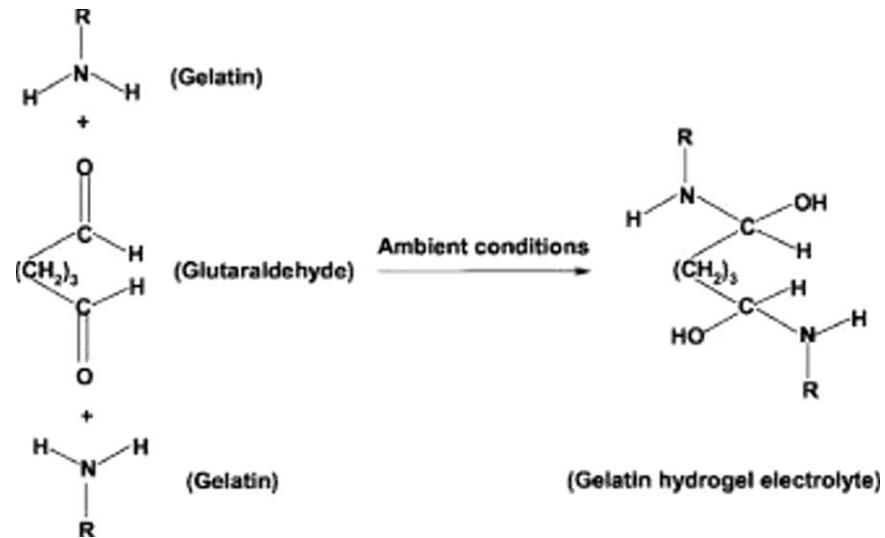


Figura 12 - Reação de reticulação da gelatina por glutaraldeído. Fonte: Choudhury *et al.*, 2007.

O glutaraldeído é um dialdeído linear, líquido, de odor pungente, incolor a levemente colorido, solúvel em água e solventes orgânicos. Tem baixo custo e é facilmente encontrado em soluções aquosas ácidas em concentrações inferiores a 2,0% até 70% (Migneault *et al.*, 2004).

No entanto, se lançado no hospedeiro em virtude da biodegradação do biomaterial, o glutaraldeído é tóxico. Por esse motivo vários agentes, incluindo carbodiimidas, compostos epóxi e genipina tem sido testados para reticular materiais à base de colágeno (Bigi *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1999).

Diante do exposto, o presente estudo pretende unir a gelatina, a triancinolona acetona e a *Chamomilla* em membranas que carreguem um ou ambos os princípios ativos, propondo um novo método de tratamento para as ulcerações em mucosa oral, tanto no sentido da forma de apresentação (membrana) como quanto à união de fármacos que possuem propriedades que se complementam no tratamento desse tipo de afecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A presente pesquisa foi desenvolvida em três locais: no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), localizado na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande, Paraíba, Brasil; no Laboratório de Síntese de Peptídeos do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (IQ-Unesp), em Araraquara, São Paulo, Brasil; e no Instituto de Cerâmica e Vidro (ICV) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), localizado em Madrid, Espanha.

O extrato de *Chamomilla* e as membranas com e sem a incorporação dos fármacos foram desenvolvidas inicialmente no ICV e a técnica reproduzida posteriormente no CERTBIO, com os ajustes necessários. As análises de Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Biodegradação e Intumescimento *in vitro* foram realizadas no ICV, sendo as três últimas reproduzidas no CERTBIO após ajustes de reticulação. Os ensaios de Molhabilidade, Bioadesão e Liberação Controlada de Fármaco foram realizados no Laboratório de Síntese de Peptídeos.

3.2 Reagentes

Para a obtenção do extrato de *Chamomilla*, foram utilizadas Flores de *Chamomilla* (Casa Pajuelo) e Álcool Etílico Absoluto (99,8° GL, Panreac). Para o desenvolvimento das membranas, os reagentes utilizados foram: gelatina 250 LB (>98,0%, origem bovina, Rousselot), Triancinolona Acetonida Micronizada (99,9%, Crystal Pharma), Glicerina (99,9%, Panreac), Glutaraldeído (25%, Panreac), Genipina (≥98,0%, Sigma-Aldrich), Água Destilada de fabricação própria do laboratório e o Extrato de *Chamomilla* desenvolvido durante a pesquisa (Tabela1).

Tabela 1: Relação de reagentes utilizados na pesquisa.

Reagente	Fabricante
Gelatina 250 LB (origem bovina)	Rousselot
Triancinolona acetona micronizada	Crystal Pharma
Flores de <i>Chamomilla</i>	Casa Pajuelo
Álcool etílico absoluto	Panreac
Glicerina	Panreac
Glutaraldeído	Panreac
Genipina	Sigma-Aldrich
Água destilada	---

3.3 Procedimento experimental

- Preparação do extrato de *Chamomilla*:

As flores de *Chamomilla* foram maceradas em um processador (Tata, modelo ML469) e suspensas em álcool etílico sob agitação magnética (Ika Werne, modelo RCT Basic) por 72 horas, na proporção de 1:10 (p/v). A filtragem ocorreu com auxílio de Papel Filtro 50 gr/m² (Filtros Anioia) e o resíduo obtido foi adicionado em nova medida de álcool etílico, para uma segunda extração (Figura 13). Os dois filtrados foram unidos e o solvente evaporado através de um Rotavapor (Buchi, modelo R-210), sob pressão de 90 mbar e temperatura de 38°C. O solvente residual foi eliminado em estufa (Binder, modelo FD) a 50°C por 3 horas. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração a 5°C (Roby *et al.*, 2013; Queiroz, 2008).

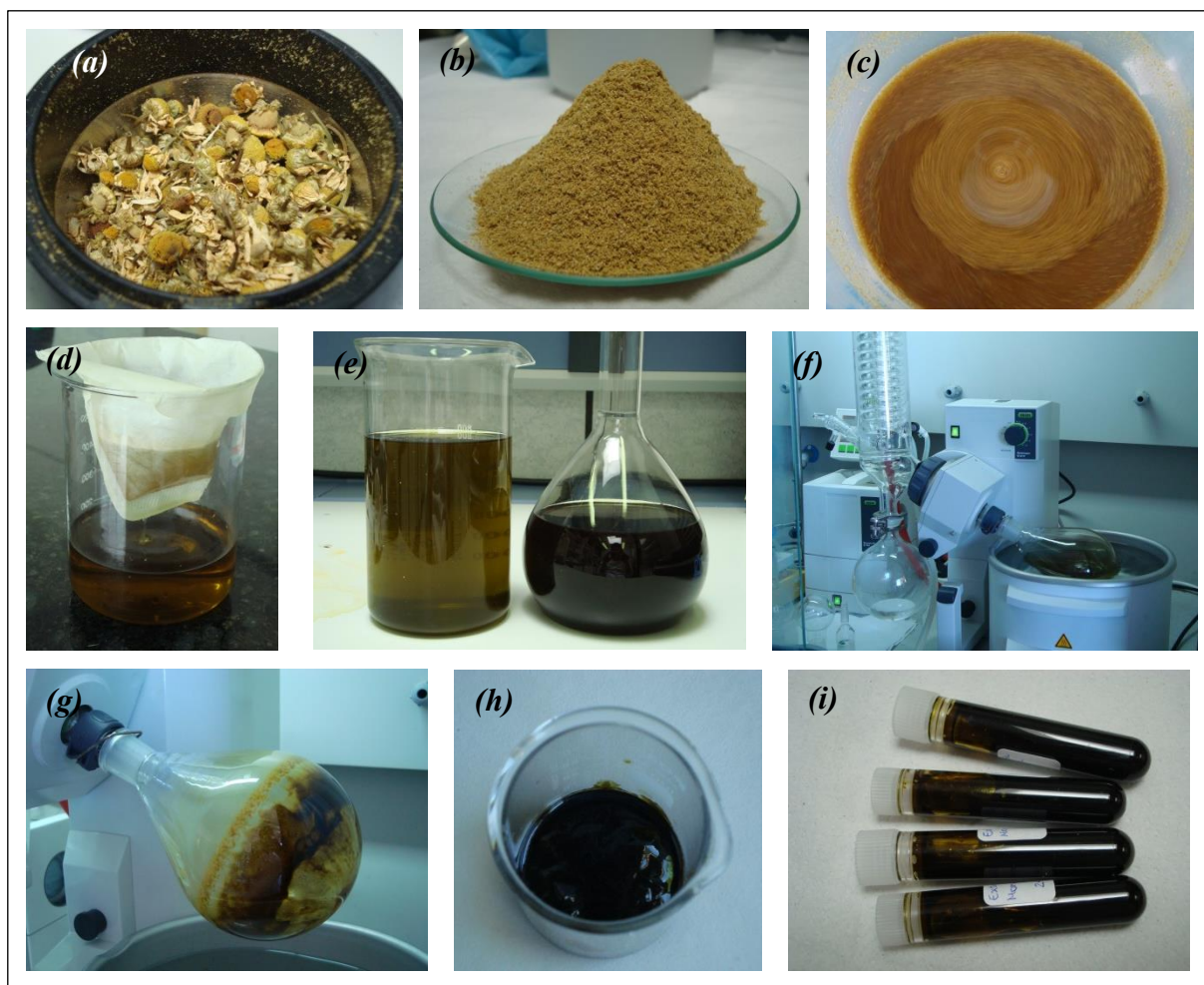


Figura 13 - Processo de obtenção do extrato de *Chamomilla*. (a) Flores de *Chamomilla* no processador; (b) Flores já maceradas; (c) Suspensão em etanol; (d) Filtragem; (e) Filtrados obtidos na primeira e segunda suspensão; (f) Evaporação do solvente em rotavapor; (g) e (h) Extrato após evaporação do solvente; (i) Armazenamento do extrato de *Chamomilla*.

- Preparação das membranas de gelatina:

A gelatina de origem bovina foi adquirida na forma de grão, produzida pela Rousselot. A dissolução ocorreu na proporção de 4% (p/v) em água destilada a 60°C, sob agitação constante por 45 minutos, com posterior adição de glicerina a 0,8% (p/v) e agitação magnética por 15 minutos (Figura 14). A solução foi vertida em suportes de poliestireno de forma a obter espessura de camada líquida de 3 mm (Casting Process) (Vercik *et al.*, 2009). Os suportes possuem 9,2 cm de comprimento por 6,35 cm de largura, sendo necessário uma alíquota de 17,5 ml

para que, após evaporação do solvente, a membrana apresente espessura de 0,1mm. A secagem ocorreu em estufa com circulação de ar a 30°C por 24 horas.

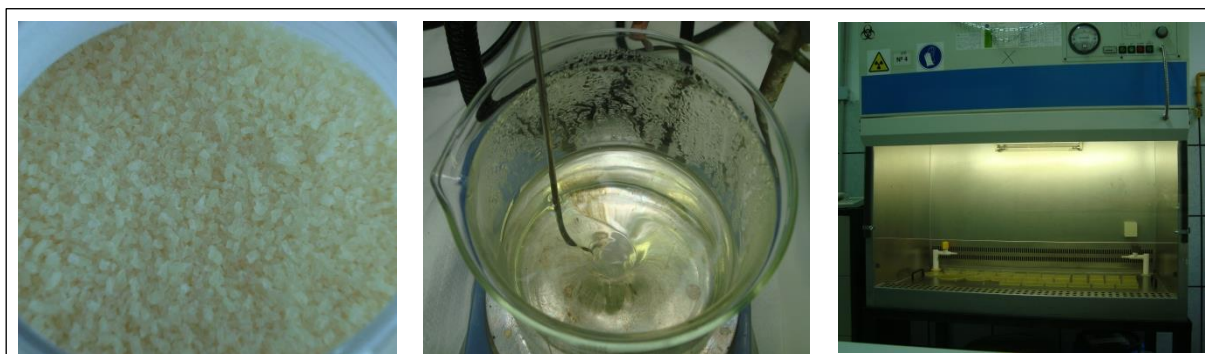


Figura 14 - Processo de obtenção das membranas de gelatina.

- Preparação das membranas de gelatina com adição dos princípios ativos:

As membranas com a incorporação de fármacos em sua composição foram confeccionadas de forma muito similar às já descritas. Após a etapa de diluição da gelatina sob agitação magnética, houve o acréscimo dos princípios ativos (Figura 15). A triancinolona acetona foi utilizada na concentração de 0,0048% (p/v) e o extrato de *Chamomilla* na concentração de 0,48% (p/v), tomando-se por base as doses terapêuticas já utilizadas comercialmente para tratamento da Estomatite Aftosa Recorrente.

Foram confeccionados inicialmente quatro tipos de amostras: um primeiro para controle, sem os fármacos; um com incorporação de triancinolona acetona; outro com incorporação de extrato de *Chamomila* e; um quarto tipo com a incorporação de ambos os fármacos. Na variável em que ambos os princípios ativos foram adicionados, foi acrescentado o primeiro sob agitação magnética constante por 15 minutos para então o segundo ser acrescentado à solução. Após mais 15 minutos de agitação magnética constante, adiciona-se a glicerina na proporção de 0,8% (p/v) e a solução permanece sob agitação por mais 15 minutos. A solução foi vertida em suportes de poliestireno de forma a obter espessura de camada líquida de 3 mm. A secagem ocorreu em estufa com circulação de ar a 30°C por 24 horas, repetindo o processo já descrito anteriormente.

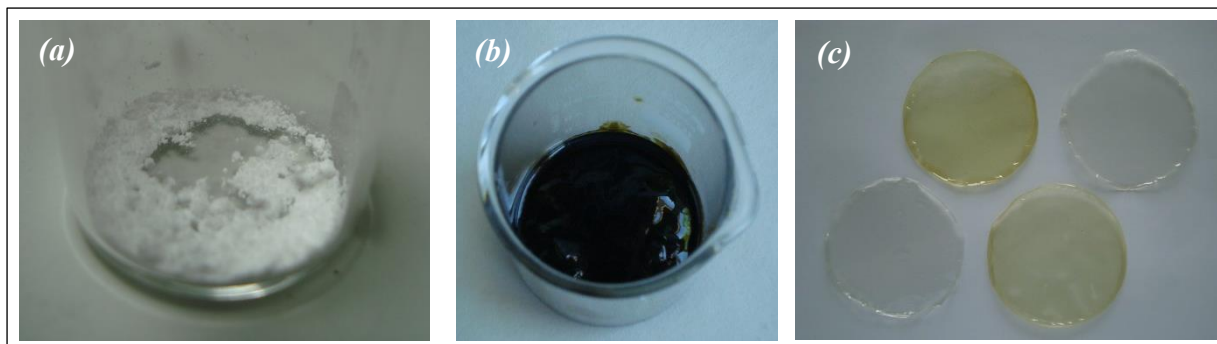


Figura 15 - Processo de preparação das membranas de gelatina com os fármacos Triancinolona Acetonida (a) e extrato de *Chamomilla* (b). A imagem (c) refere-se ao aspecto das membranas com os fármacos em sua composição.

Três métodos de reticulação foram avaliados neste estudo:

- Reticulação por glutaraldeído

Após a secagem em estufa, as amostras foram mergulhadas por 1 minuto em solução aquosa de glutaraldeído a 0,5% (v/v) e a 2,0% (v/v). Em seguida foram realizadas 5 lavagens consecutivas com água destilada e as membranas voltaram a ser secas em estufa com circulação de ar a 30°C por 24 horas (Figura 16). Ao final foram acondicionadas à temperatura ambiente em embalagens lacradas.

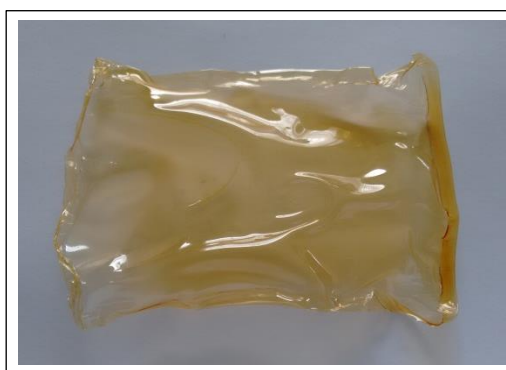


Figura 16 - Aspecto da membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído a 2,0% após secagem.

O glutaraldeído é o agente de reticulação química mais utilizado em se tratando de materiais colagenosos, em virtude de sua alta eficiência na estabilização destes materiais (Bigi *et al.*, 2001). Por esse motivo ele foi utilizado como padrão a ser seguido para posteriores comparações aos agentes reticulantes eleitos para serem, de fato, métodos válidos de reticulação para esta pesquisa.

- Reticulação por radiação Ultravioleta:

As amostras foram removidas dos suportes de poliestireno e expostas à radiação ultravioleta por 5 horas através da lâmpada TUV 15W G15T8 da marca Philips (Figura 17), comprimento de onda de 254 nm, radiação tipo UV-C, acoplada a um fluxo laminar e distando 60 cm das amostras (Matsuda *et al.*, 2002). As membranas foram acondicionadas à temperatura ambiente e protegidas de umidade, em embalagens lacradas.

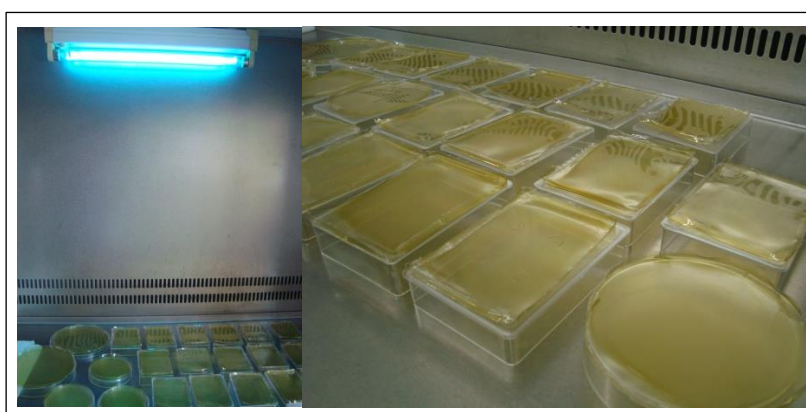


Figura 17- Amostras expostas à radiação ultravioleta.

- Reticulação por genipina:

Após a secagem em estufa, as amostras foram mergulhadas por tempo (20 horas, 6 horas, 3 horas, 10 minutos e 1 minuto) e em concentrações variáveis de solução a 70% etanol/água (v/v) e genipina (0,1%, 0,01% e 0,0005%) (Figura 18) (Metodologia adaptada de Sisson *et al.*, 2009).

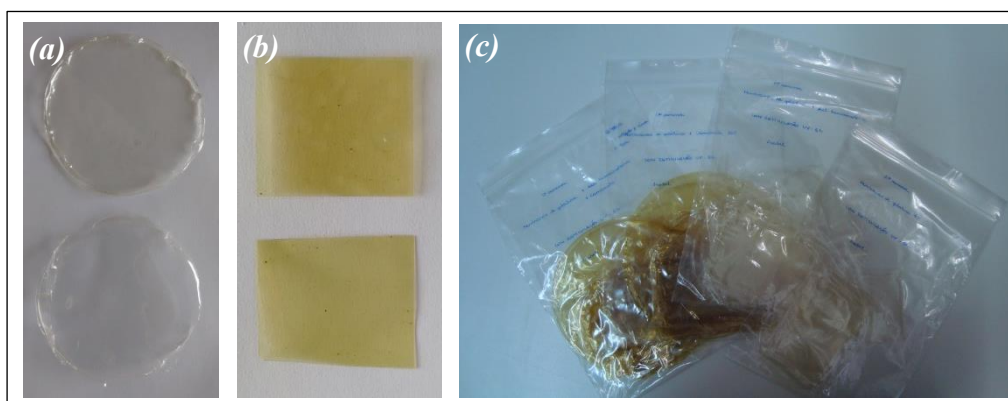


Figura 18 - Aspecto das amostras reticuladas por genipina. As imagens (a) e (b) mostram, em sua parte superior, as membranas antes da reticulação, enquanto na parte inferior as membranas após a reticulação. A imagem (c) refere-se ao seu acondicionamento.

Em seguida foram lavadas abundantemente com água destilada e secas em estufa com circulação de ar a 30°C por 24 horas. Ao final foram acondicionadas à temperatura ambiente em embalagens lacradas (Figura 18).

O esquema representativo do processo de desenvolvimento desta pesquisa pode ser ilustrado de maneira simplificada através do fluxograma abaixo (Figura 19):

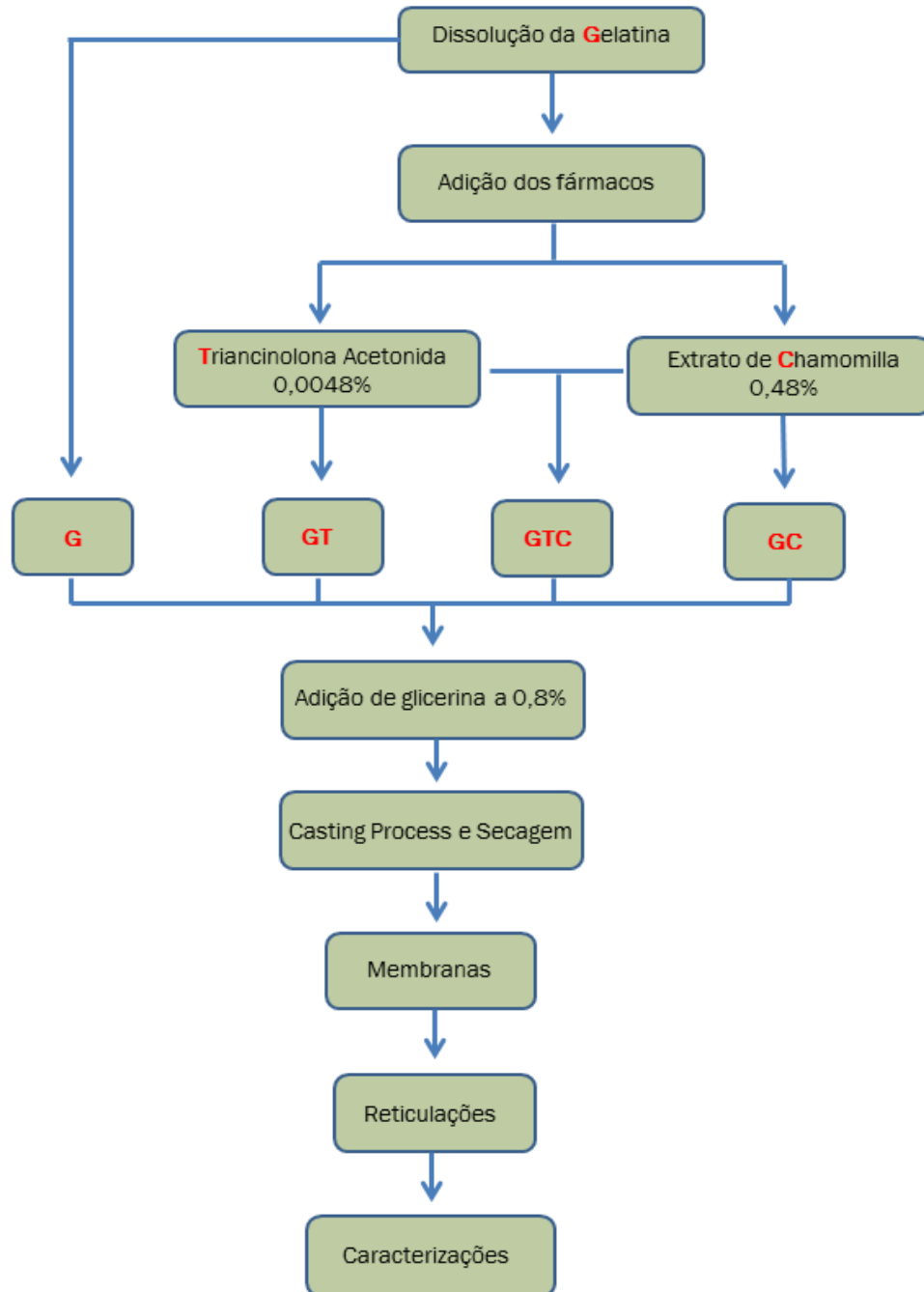


Figura 19: Fluxograma representativo dos passos desenvolvidos nesta pesquisa.

Desta forma, foram confeccionadas ao total 11 tipos de amostras, a serem especificadas da seguinte maneira:

Tabela 2 - Relação de amostras desenvolvidas e siglas.

Sigla	Significado
G	Membrana de gelatina sem reticulação
GGe	Membrana de gelatina reticulada por genipina
GUV	Membrana de gelatina reticulada por radiação ultravioleta
GA05	Membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído a 0,5%
GA20	Membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído a 2,0%
GTGe	Membrana de gelatina com triancinolona acetona reticulada por genipina
GCGe	Membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> reticulada por genipina
GTCGe	Membrana de gelatina com triancinolona acetona e extrato de <i>Chamomilla</i> reticulada por genipina
GTUV	Membrana de gelatina com triancinolona acetona reticulada por radiação ultravioleta
GCUV	Membrana de gelatina com extrato de <i>Chamomilla</i> reticulada por radiação ultravioleta
GTCUV	Membrana de gelatina com triancinolona acetona e extrato de <i>Chamomilla</i> reticulada por radiação ultravioleta

3.4 Análise das Características comportamentais dos biomateriais desenvolvidos nesta pesquisa

3.4.1 Estudo Morfológico

Para este estudo foram utilizadas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM), além da análise macroscópica das amostras. A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura permite observar e caracterizar diferentes tipos de materiais, a partir da emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível caracterizá-los do ponto de vista de sua morfologia e sua organização ultraestrutural. Para esta pesquisa foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura da Hitachi, modelo S-4700 (Figura 20), com canhão de emissão de campo frio, atuando em dois modos: resolução de 1,5 nm a 15kV e profundidade de foco de 12 mm ou resolução de 2,5nm a 1k e profundidade focal de 2,5mm. As imagens formadas podem ser a partir de elétrons secundários ou retroespalhados, com aumentos que variam de 30x a 500,000x (HITACHI, 2007). Para esta pesquisa utilizou-se análise por elétrons secundários e aumentos de 50x, 200x, 1000x, 2000x e 50000x.



Figura 20 - Microscópio Eletrônico de Varredura da Hitachi, modelo S-4700.

No Microscópio de Força Atômica (AFM), a ponta de prova fina interage com a superfície da amostra por Forças de Van der Waals, através de três modos de operação: contato, não-contato e dinâmico. Detalhes da estrutura pouco nítidos na imagem da topografia podem ser percebidos em detalhes no AFM. Além da morfologia da superfície, podem ser analisados conjuntamente a viscoelasticidade e

o coeficiente de atrito (Costa, 2010). Para a presente pesquisa foi utilizado o modo de operação de não-contato através do equipamento Standa 071905, acoplado ao Dulcinea Control Unit, da Nanotec Electronica (Figura 21), e o programa WSxM 5.0.

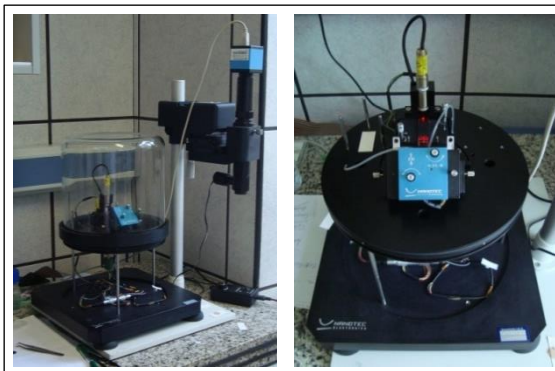


Figura 21 - Microscópio de Força Atômica Standa 071905 acoplado ao Dulcinea Control Unit.

3.4.2 Estudo composicional

A Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier é utilizada para caracterizar a presença de grupos químicos específicos no material, através de sua associação com as principais bandas de vibração (MANSUR et al., 2006). O equipamento utilizado foi o FTIR Spectrum 100 da Perkin Elmer, no modo Refletância Total Atenuada (ATR). O espectrofotômetro trabalha em um intervalo de números de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} e vem equipado com diferentes modos de medida: transmissão/absorção, reflexão difusa, reflexão total atenuada (ATR) entre 600 e 4000 cm^{-1} (ICV, 2014).

3.4.3 Estudo de Biodegradação e Intumescimento *in vitro*

Para os ensaios de biodegradação *in vitro* e grau de intumescimento, as amostras foram submetidas a um meio que mimetize o uso futuro pretendido, que é o meio bucal. Sendo assim, a Saliva Artificial (Tabela 3) foi produzida de acordo com a Farmacopeia Brasileira e os ensaios procedidos em triplicata. As membranas foram seccionadas em dimensões pré-estabelecidas de 10x20mm e as pesagens em balança analítica foram feitas antes da imersão em saliva artificial (Figura 22) e a

cada 10 minutos após o início do ensaio, até completar a primeira hora. Em seguida, as amostras foram pesadas de hora em hora até sua total degradação. Antes de cada pesagem as amostras foram ligeiramente secas em papel absorvente, evitando o excesso de líquido. O objetivo destes ensaios foi analisar o tempo necessário para que as membranas processadas sejam degradadas quando imersas em um meio específico e o quanto são capazes de absorver o líquido deste meio.

Tabela 3 - Composição da saliva artificial de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2012).

Componentes da Saliva Artificial	Quantidade
KCl	0,96g
NaCl	0,67g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,04g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,12g
KH ₂ PO ₄	0,27g
CH ₂ CO ₂ H	8g
Solução de sorbitol a 70% (p/p)	24g
Solução conservante de parabenos	20g
Solução de ácido cítrico (25% a 50%) qs	pH 6,0 - 7,0
Água purificada qsp	1000mL



Figura 22 - Amostras durante o ensaio de Biodegradação *in vitro* e grau de intumescimento, mergulhadas em saliva artificial.

3.4.4 Estudo da liberação controlada de fármaco

Para a análise da liberação da triancinolona acetona, foram utilizadas membranas de gelatina e gelatina-*Chamomilla* em associação ao fármaco nas dimensões 10x20 mm. O perfil de liberação foi obtido pela imersão dessas membranas em 15 mL de água deionizada (pH~6,6), à temperatura ambiente (25°C). As aquisições dos dados da quantidade de fármaco liberado foram realizadas em períodos de tempo pré-determinados de 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, retirando-se 1mL do meio de liberação (Figura 23) em cada período de tempo. O volume retirado foi substituído por solução nova, a fim de evitar restrições da taxa de liberação por limitações de difusão externas, e manteve-se agitação contínua em 100 rpm durante os ensaios de liberação. Os resultados foram analisados considerando a porcentagem do fármaco liberado em função do tempo e representam as médias obtidas por três repetições.

As alíquotas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em escala analítica da Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A, com uma coluna C18 de fase reversa (Kromasil, 150 x 4,6 mm; d = 5 µm; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solventes A (água ultrapura contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila, Mallinckrodt, contendo 0,036% de TFA), empregando-se um gradiente de 5 a 95% de B em 30 minutos com fluxo de 1,0 ml.min⁻¹, com detecção em 220 nm. Antes da leitura da liberação dos fármacos em HPLC foi realizada a curva de calibração (Figura 24), de modo a dar maior credibilidade ao ensaio.



Figura 23 - Sistema utilizado como meio de liberação in vitro para o estudo da liberação controlada de fármaco.

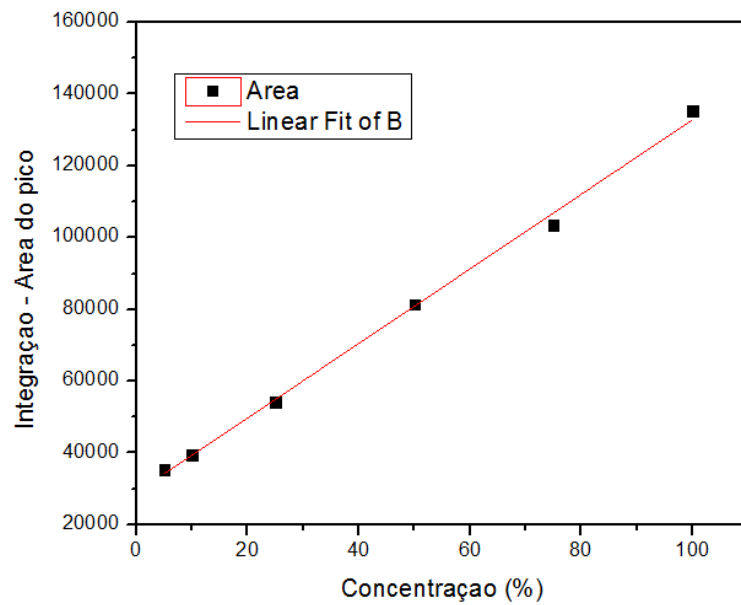


Figura 24 - Curva de Calibração para o ensaio em HPLC.

3.4.5 Estudo da Molhabilidade

A molhabilidade é a medida da afinidade de um líquido por um sólido, mensurada a partir do espalhamento de uma gota na superfície do material alvo da pesquisa (Figura 25). O líquido padrão para tal ensaio é a água, havendo a possibilidade de emprego de outro líquido de acordo com a necessidade do teste. A afinidade é identificada através do formato da gota quando em contato com a superfície, sendo o material classificado como hidrofílico quando o ângulo de contato é inferior a 90° e hidrofóbico quando excede 90° (Figura 26).

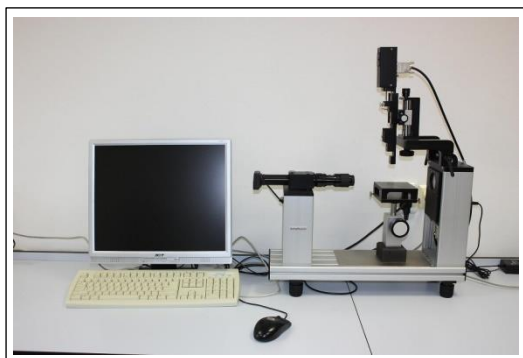


Figura 25 - Equipamento Dataphysics modelo OCA-20, utilizado para o ensaio de molhabilidade.

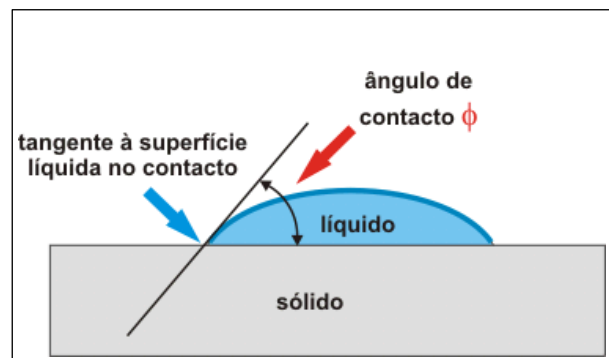


Figura 26 - Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido.

O grau de molhamento depende da energia de superfície relativa dos sólidos e dos líquidos e de sua atração intermolecular, influenciando diretamente na resposta biológica de um material implantado, podendo alterar adsorção de proteínas, coagulação sanguínea e, principalmente, afetar a adesão celular. Sólidos com alta energia e líquidos com baixa energia favorecem o bom molhamento; portanto, líquidos geralmente molham bem os sólidos com alta energia. Por outro lado, os líquidos formam gotas em sólidos com baixa energia. Analisando por outra perspectiva, para que um líquido molhe um sólido, eles necessitam de tensões superficiais similares, sendo elas baixas ou altas. O elevado ângulo de contato da água sobre estes sólidos pode ser diminuído com a adição de um agente umectante na água ou tratamentos superficiais nos sólidos, diminuindo a tensão superficial ou a energia de superfície (Saska, 2012; Craig *et al.*, 2002).

O ângulo de contato foi medido por um equipamento Dataphysics modelo OCA-20 equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água deionizada (tensão superficial: 72.30 mN/m), em que a gota foi dispensada por uma seringa de agulha 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 17 μL , numa velocidade de gotejamento de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre as superfícies das membranas. As imagens das gotas capturadas foram analisadas empregando-se o software SCA20. As medidas de ângulo de contato foram realizadas para todas as amostras em quatro repetições ($n=4$) e em ambos os lados, 30 segundos após o gotejamento ($T=30\text{s}$), e a média e erro padrão destes valores foram calculados (Tabela 4). Foi denominada de face lisa a que permaneceu em contato com o ar durante o desenvolvimento da membrana e face riscada a que manteve contato com o suporte de poliestireno durante esse mesmo processo, adquirindo suas marcas.

Tabela 4 - Ângulos de contato e condições de molhabilidade (Padrão de avaliação).

$\theta = 0$	molhabilidade completa
$0 < \theta < 90^\circ$	molhabilidade parcial
$\theta > 90^\circ$	não há molhabilidade

Fonte: SASKA (2012).



Figura 28 - Prova cilíndrica durante o ensaio de bioadesão.

Após esse tempo a prova foi removida com velocidade de 1 mm/s e dessa forma mediu-se a força de destacamento entre o disco de mucina e as membranas desenvolvidas nesta pesquisa. Utilizando igual metodologia, também foram testados os produtos comerciais Triancinolona Acetonida EMS[®] e Admuc AVERT[®] (Figura 29), para comparação de resultados.



Figura 29 - Apresentações comerciais testadas como método comparativo pelo ensaio de bioadesão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo Morfológico

Analisando primeiramente as amostras de acordo com seus aspectos macroscópicos, percebeu-se uma coloração discretamente mais amarelada nas amostras reticuladas por radiação ultravioleta (GUV) e genipina (GGe) quando comparadas à membrana de gelatina sem reticulação (G) (Figura 30). Essa mudança na coloração foi percebida de maneira muito mais intensa nas membranas reticuladas por glutaraldeído a 0,5% (GA05) e 2,0% (GA20), sendo essa última variável a de coloração mais escura (Figura 31). Além disso, foi percebida maior rigidez nas membranas GA05 e GA20 quando comparadas com as demais variáveis. A membrana GGe apresentou-se discretamente mais rígida que a variável G, enquanto que a GUV (Figura 32) comportou-se de maneira muito similar a G nesse aspecto, ou seja, foram as de maior flexibilidade.

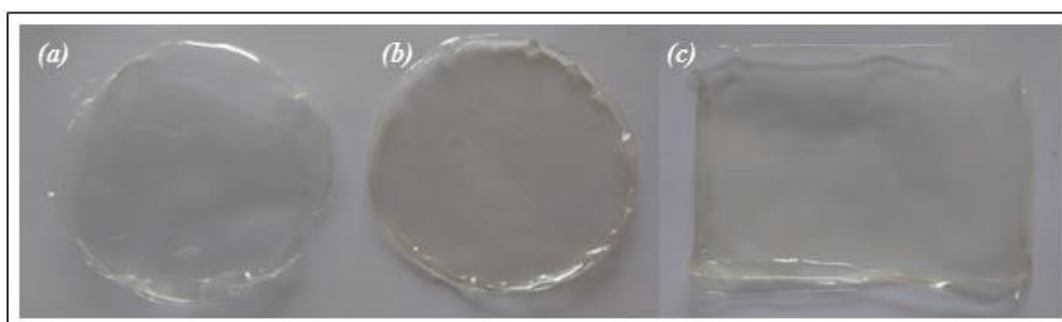


Figura 30 - Membranas de gelatina sem reticulação (G) (a); com reticulação por genipina (GGe) (b) e por radiação ultravioleta (GUV) (c).

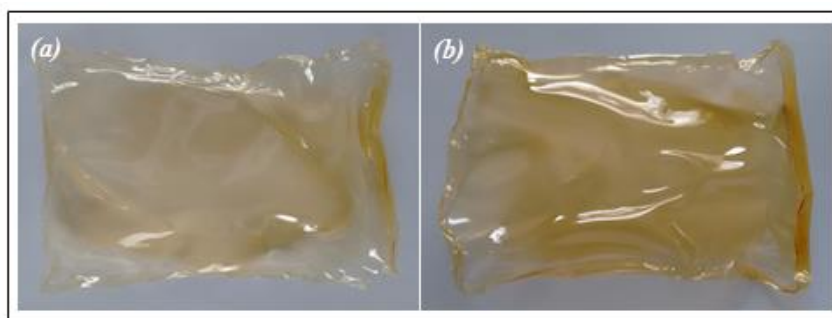


Figura 31 - Membranas de gelatina com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (GA05) (a) e a 2,0% (GA20) (b).

As membranas com extrato de *Chamomilla* apresentaram odor característico, enquanto as incorporadas com triancinolona acetonida não apresentam nenhum diferencial macroscópico específico do fármaco.



Figura 32 - Membrana de gelatina com ambos os fármacos, reticulada por radiação ultravioleta.

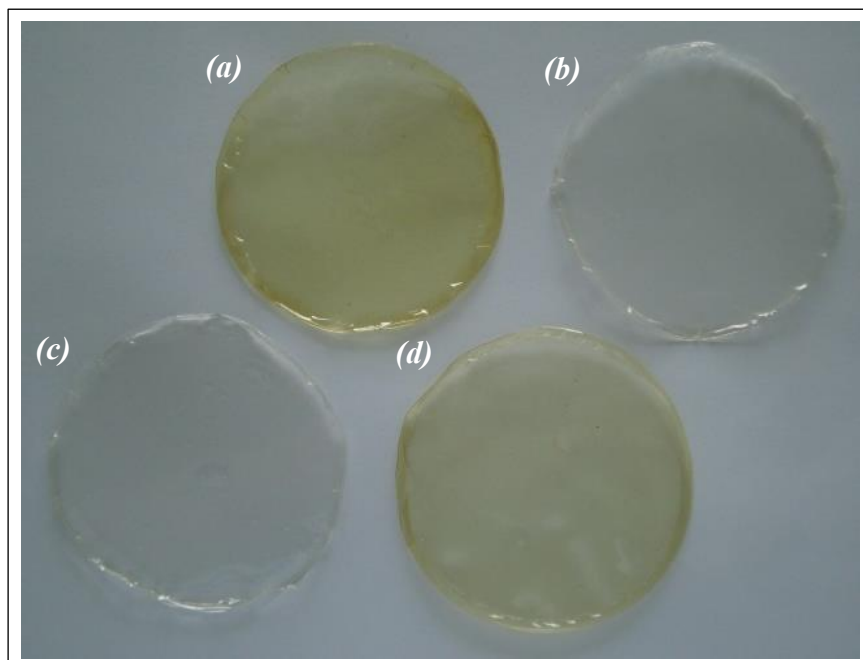


Figura 33 - Membranas de gelatina reticuladas por genipina, onde (a) é GCGe; (b) é GGe; (c) é GTGe e (d) é GTCGe.

Através da Figura 34 pode-se analisar o aspecto superficial das membranas de gelatina sem reticulação, com reticulação por UV, com reticulação por glutaraldeído em duas concentrações, 0,5% e 2,0% e com reticulação por genipina a 0,0005%, através de imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

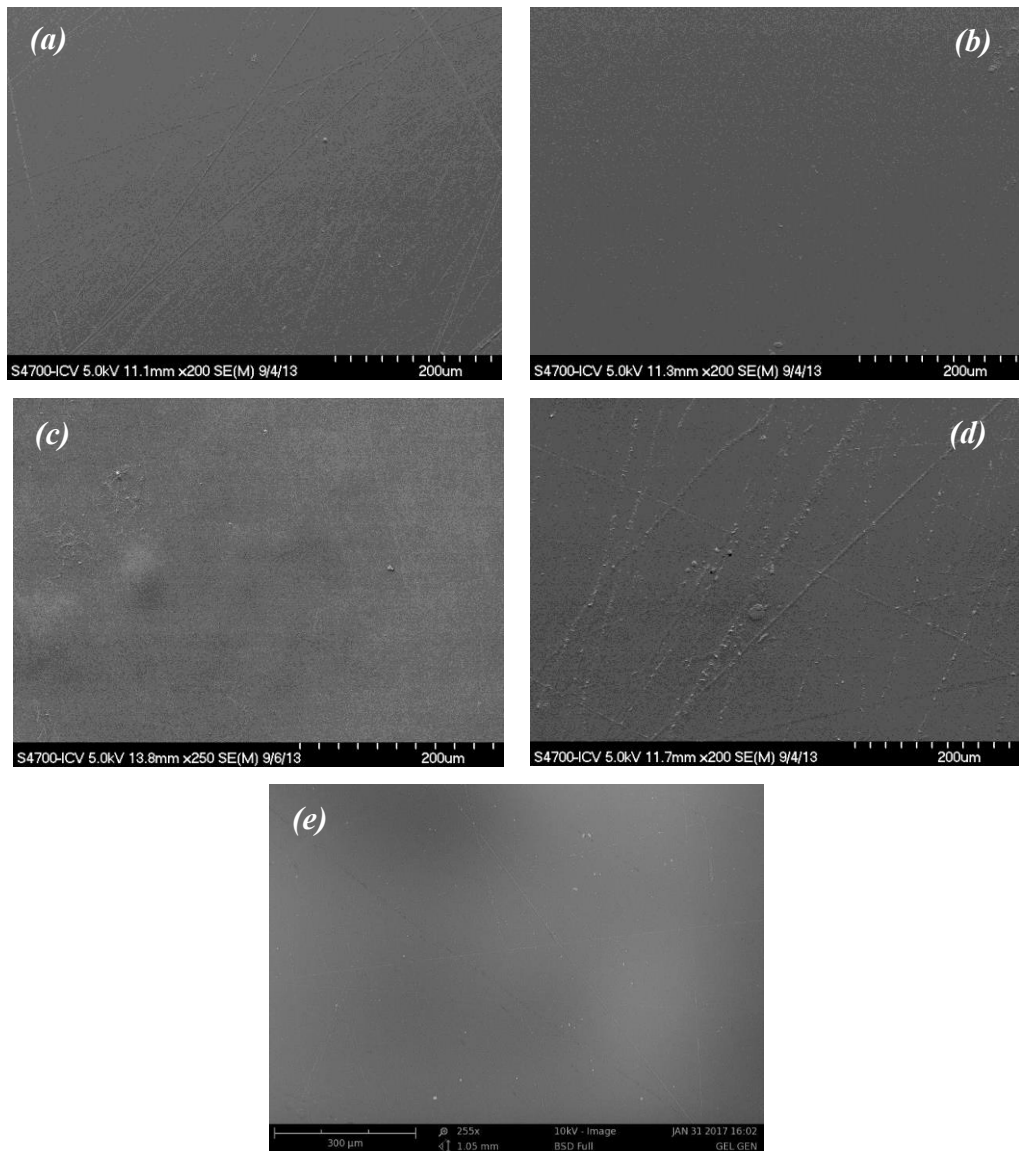


Figura 34 - Imagens de MEV da membrana de gelatina sem reticulação (a), com reticulação por UV (b), com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (c) e a 2,0% (d) e com reticulação por genipina a 0,0005% (e). Aumento de 200x.

Pode-se perceber que não houve alteração superficial notória entre as amostras. As membranas aparentam homogeneidade, com riscas presentes em algumas superfícies analisadas devido às marcas provenientes do suporte de poliestireno no qual a solução de gelatina foi vertida para secagem.

Foi utilizada a genipina na concentração de 0,0005% de acordo com os resultados obtidos pelo estudo da biodegradação e intumescimento *in vitro*, apresentado no item 4.3. A partir dessa concentração atingiu-se o tempo desejado de permanência da membrana em meio aquoso antes de sua total solubilização.

Através da análise da imagem do corte seccional das amostras (Figura 35) pode-se visualizar o efeito da reticulação sobre sua estrutura.

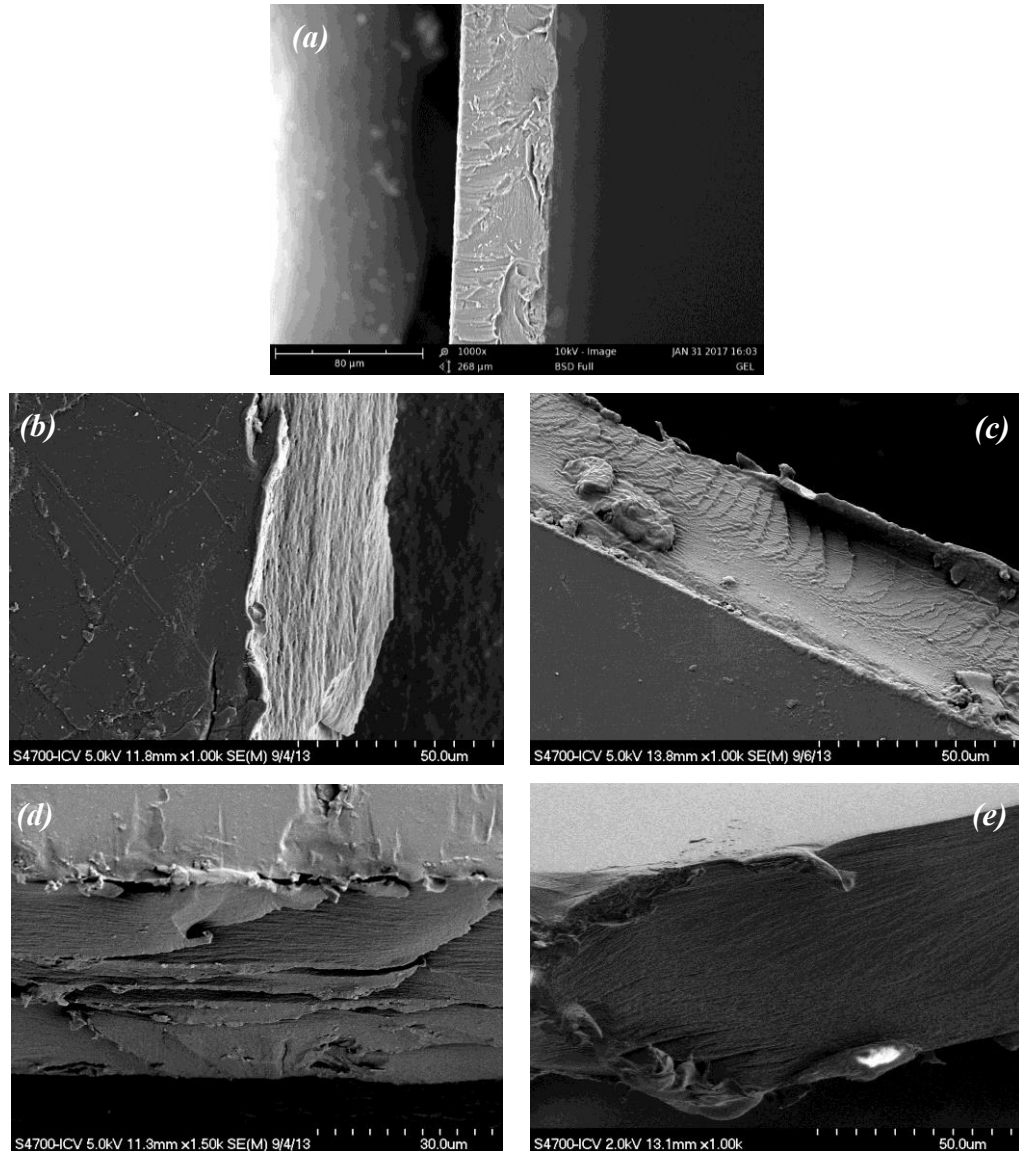


Figura 35 - Imagens de MEV do corte seccional das amostras de membranas de gelatina sem reticulação (a), com reticulação por UV (b), com reticulação por glutaraldeído a 0,5% (c) e a 2,0% (d) e com reticulação por genipina a 0,0005% (e). Aumento de 1000x.

Nas imagens 35b e 35e, relativas à reticulação por radiação ultravioleta e genipina a 0,0005%, respectivamente, pode-se perceber a natureza fibrosa e a orientação preferencial das membranas de gelatina, aspectos menos percebidos quando analisados na membrana de gelatina sem reticulação (35a). Na imagem relativa à reticulação por glutaraldeído a 0,5% há densificação da estrutura sem a presença de orientação preferencial. Percebe-se menor flexibilidade estrutural da

amostra quando comparada à anterior pela presença de descontinuidades na superfície obtida através do corte da amostra. O mesmo pode ser percebido em se tratando da amostra reticulada por glutaraldeído a 2,0%, embora também possa ser percebida a presença de fibras em parte da superfície seccionada.

Na primeira imagem da Figura 36, relativa à membrana de gelatina com adição do extrato de *Chamomilla* (a), percebe-se uma superfície homogênea com total incorporação do extrato. Há a presença de bolhas de ar que provavelmente originaram-se no processo de agitação magnética durante a confecção das amostras. A segunda imagem (b) refere-se à membrana de gelatina com adição da triancinolona acetona.

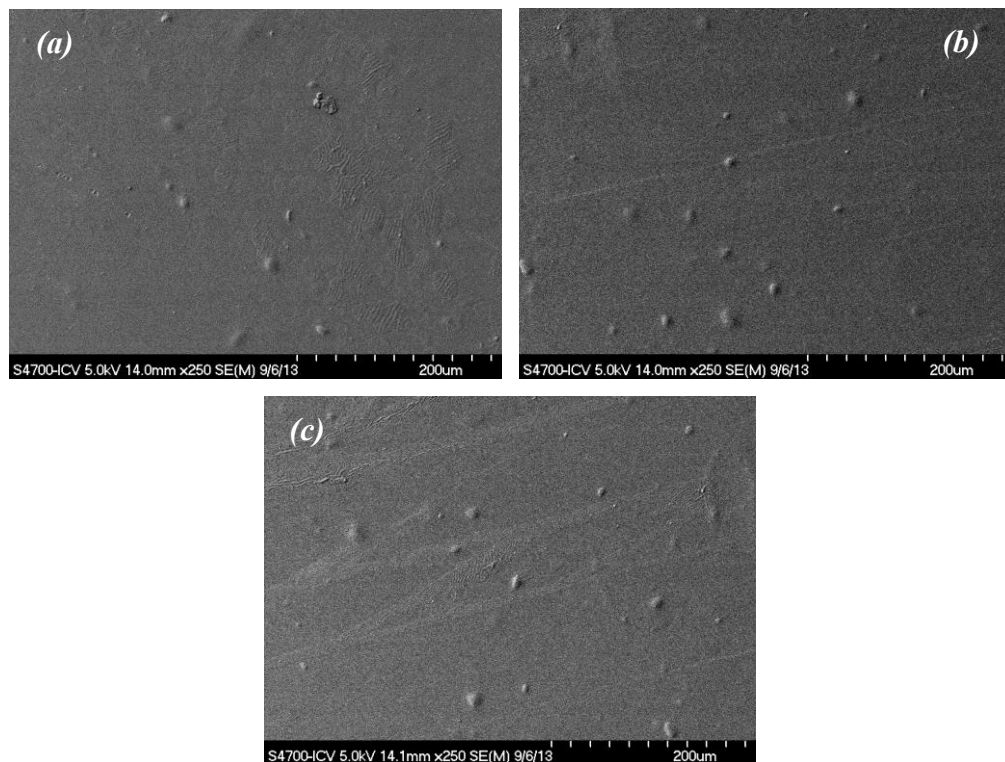


Figura 36 - Imagens de MEV da membrana da gelatina com incorporação do extrato de *Chamomilla* (a), com incorporação da triancinolona acetona (b) e com incorporação de ambos (c), reticuladas por UV. Aumento de 250x.

A amostra apresenta pequenos aglomerados do fármaco em seu interior, que estão distribuídos ao longo de toda a amostra, fato que comprova sua insolubilidade em água. A terceira imagem (c) refere-se à membrana de gelatina com a adição de ambos os fármacos. Da mesma forma que a membrana mencionada anteriormente, nesta também é possível identificar os pequenos

aglomerados da triancinolona acetona. As riscas observadas na superfície da amostra são devido ao suporte de poliestireno no qual a solução de gelatina foi vertida para secagem.

A Figura 37 apresenta imagens de características muito próximas às descritas anteriormente (Figura 36), distinguindo delas pelo agente reticulador utilizado, que neste caso foi a genipina a 0,0005%.

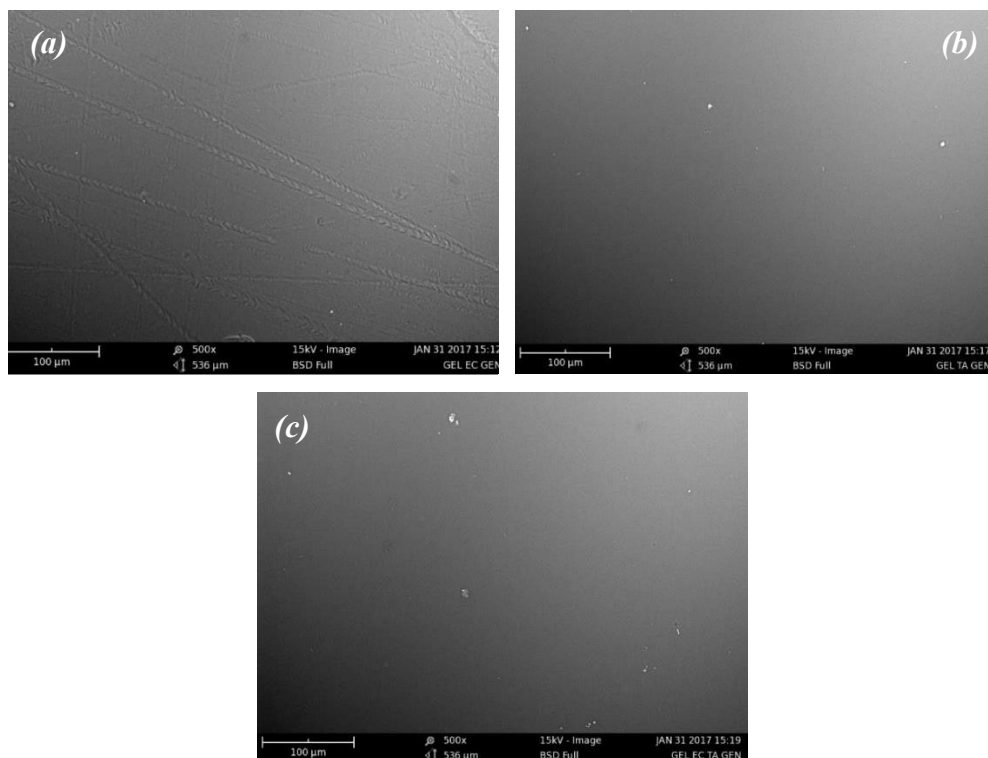


Figura 37 - Imagens de MEV da membrana da gelatina com incorporação do extrato de *Chamomilla* (a), com incorporação da triancinolona acetona (b) e com incorporação de ambos (c), reticuladas por genipina. Aumento de 500x.

Na primeira imagem (37a) percebe-se uma superfície homogênea com total incorporação do extrato, embora haja a presença de falhas em sua superfície, provenientes provavelmente do processo de obtenção das amostras. Na segunda (37b) e terceira (37c) imagens, relativas à membrana de gelatina com incorporação da triancinolona acetona e com incorporação de ambos os compostos, respectivamente, pode-se perceber discretos aglomerados do fármaco, distribuídos ao longo da superfície das membranas.

A Figura 38 retrata a triancinolona acetona pura e micronizada. O processo de micronização consiste em uma moagem ultra-fina de produtos através de moinhos com ar comprimido (air jet mills). A moagem acontece devido ao choque entre as partículas do próprio produto que, recebendo a energia do ar comprimido, ganha velocidade de até 500m/seg. Com o choque as partículas vão diminuindo de tamanho, até atingir a qualidade desejada.

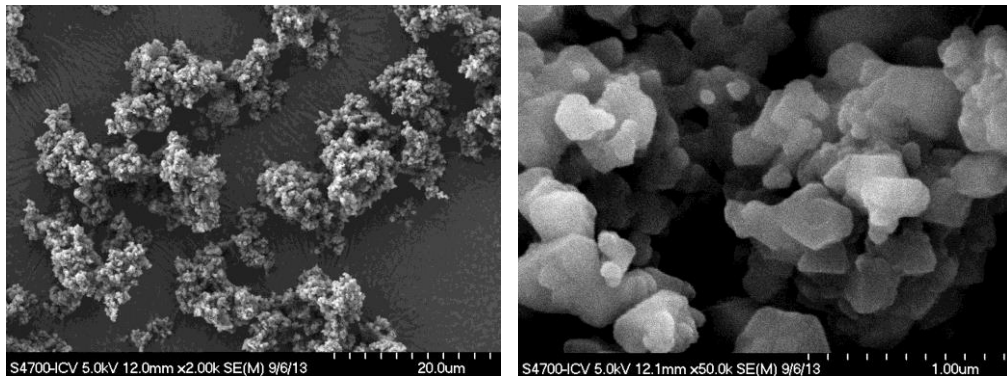


Figura 38 - Imagens de MEV da triancinolona acetona micronizada com aumentos de 2000x (à esquerda) e 50000x (à direita).

Na indústria farmacêutica usa-se a micronização de substâncias para obter produtos com área específica superior, de forma a acelerar a absorção do fármaco pelo organismo (Santos, 2011; Chau *et al.*, 2007). Percebe-se nas imagens acima que as partículas da triancinolona acetona apresentam-se de vários tamanhos, variando desde valores inferiores a 0,1µm até superiores a 0,5 µm.

A Microscopia de Força Atômica tem por objetivo revelar detalhes da morfologia superficial de um determinado material. É uma das ferramentas mais importantes para a imagiologia, mensuração e manipulação da matéria em nanoescala (Ramzan *et al.*, 2015).

Os picos e depressões observados em várias posições sobre a superfície das membranas são da ordem de 0 - 2,3 nm de altura (Figura 39), 4 - 13 nm (Figura 40), 0 - 3 nm (Figura 41) e 0 - 4 nm (Figura 42).

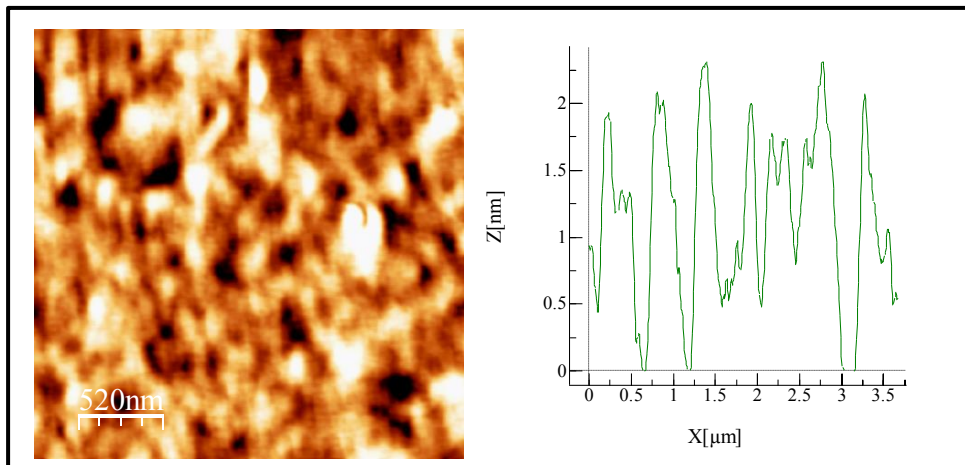


Figura 39 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina e perfil extraído do micrograma.

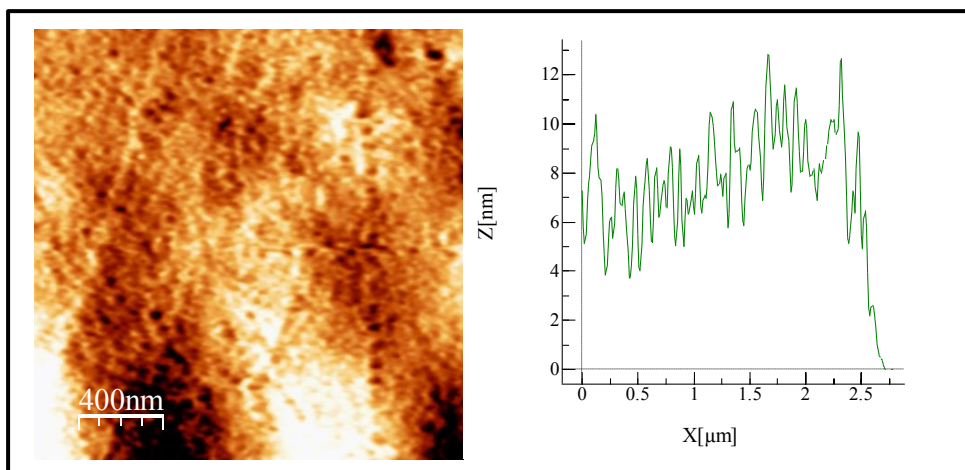


Figura 40 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com extrato de *Chamomilla* e perfil extraído do micrograma.

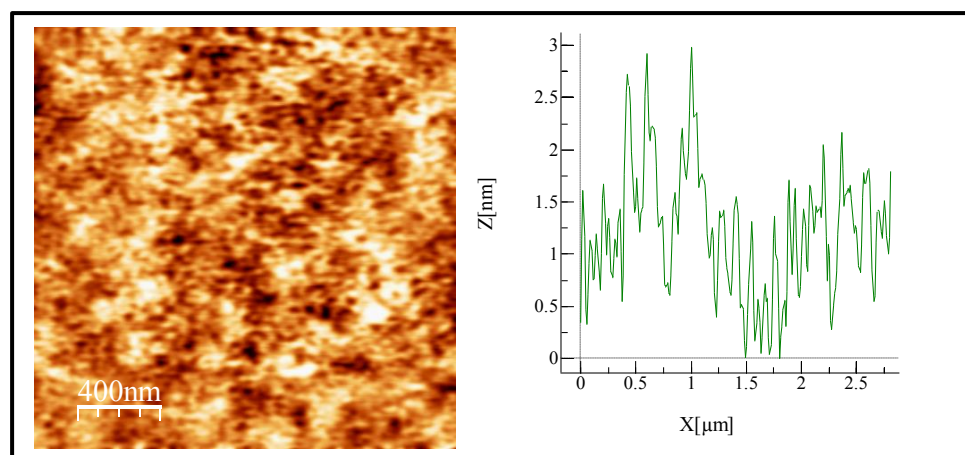


Figura 41 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com triancinolona acetona e perfil extraído do micrograma.

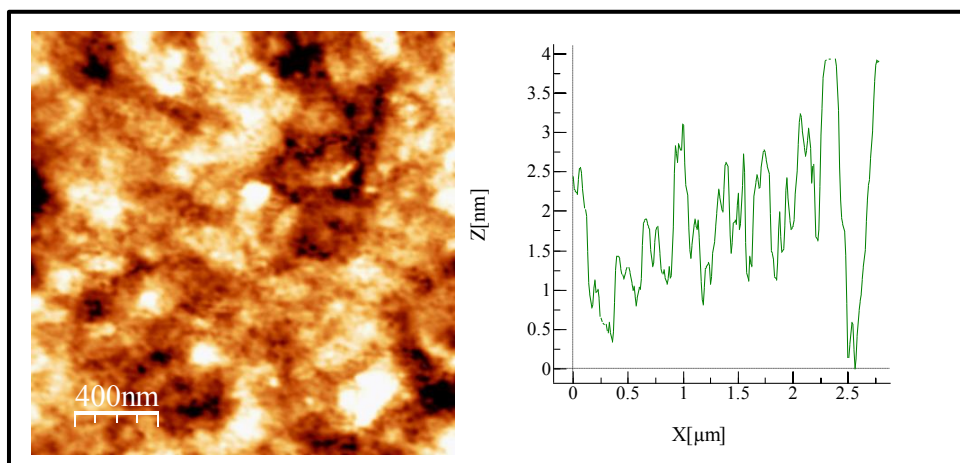


Figura 42 - Imagem bidimensional da membrana de gelatina com triancinolona acetona e extrato de *Chamomilla* e perfil extraído do micrograma.

A membrana de gelatina, por apresentar picos de maior distanciamento uns dos outros, comparativamente aos microgramas das demais variáveis, aparenta menos uniformidade superficial, com mais áreas de depressão. Comportamento diferente é observado no micrograma da membrana de gelatina com a incorporação do extrato de *Chamomilla*. Apesar de possuir picos e vales de valores mais significativos, eles se apresentam mais próximos entre si e aparentam maior homogeneidade superficial.

A membrana de gelatina com Triancinolona Acetonida em sua composição apresenta comportamento parecido ao último citado, porém em menor intensidade, havendo um distanciamento um pouco maior entre os vales e picos existentes.

De todas as variáveis com fármacos, a que aparenta menor homogeneidade superficial é a que possui os dois compostos incorporados na mesma membrana, embora essa característica seja de menor intensidade que a apresentada pela membrana de gelatina sem fármacos.

Observou-se certa semelhança nas diferenças verticais das amostras, exceto no micrograma da membrana de gelatina com extrato de *Chamomilla*. Os picos são dominantes nas superfícies de todas as amostras. Quanto mais próximos são os picos, maior a impressão de lisura superficial (Valera *et al.*, 2000). É por este aspecto que a membrana que aparenta superfície mais plana é a com incorporação do extrato de *Chamomilla* (Figura 40).

4.2 Estudo composicional

O espectro de Infravermelho da gelatina (Figura 43) apresenta as bandas de absorção típicas da vibração de estiramento da ligação -NH e -OH em 3293 cm^{-1} . A banda em 3071 cm^{-1} é característica da ligação -CH. As bandas em 2920 cm^{-1} (menor intensidade) e 2867 cm^{-1} (maior intensidade) são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo -CH₂ (assimétrico) e -CH₃ (simétrico), respectivamente. As bandas em 1633 , 1544 e 1447 cm^{-1} são características da amida I (-C=O), amida II (-NH) e amida III (-CN e -NH) similares ao espectro do colágeno (Ficai *et al.*, 2010). A região em 1334 cm^{-1} apresenta uma banda característica ao grupo COO- de aminoácidos da estrutura da gelatina. A banda de absorção na região de 1038 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento de das ligações glicosídicas (C-O-C) (Fook, 2012).

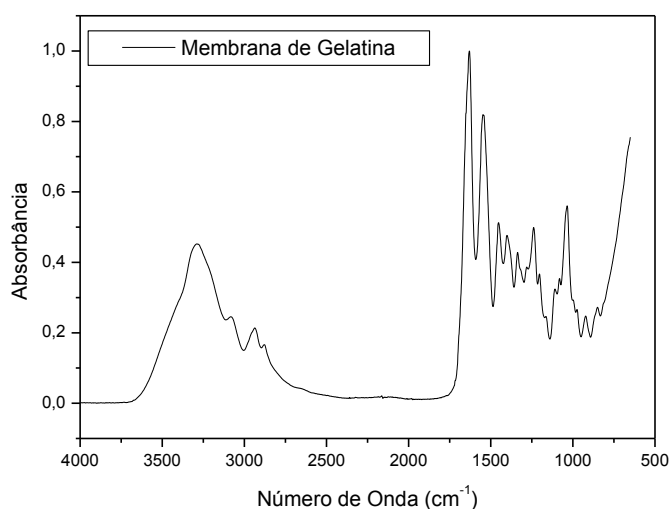


Figura 43 - Espectro vibracional da membrana de gelatina sem reticulação.

Analisando-se os espectros de infravermelho da gelatina sem reticulação e com reticulação através dos três agentes utilizados nesta pesquisa (Figura 44), pode-se observar uma diminuição da intensidade de absorção das bandas na região entre $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ (O-H; N-H), dos picos correspondentes à amida II (1546 cm^{-1}) da gelatina quando se utilizou a genipina como reticulante.

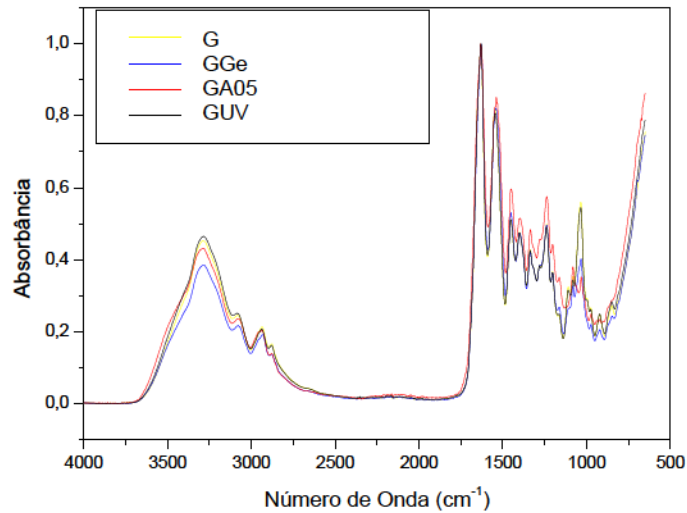


Figura 44 - Espectro vibracional das membranas obtidas com e sem reticulação, onde G = membrana de gelatina sem reticulação; GGe = membrana de gelatina reticulada por genipina; GA = membrana de gelatina reticulada por glutaraldeído a 0,5%; GUV = membrana de gelatina reticulada por radiação ultravioleta.

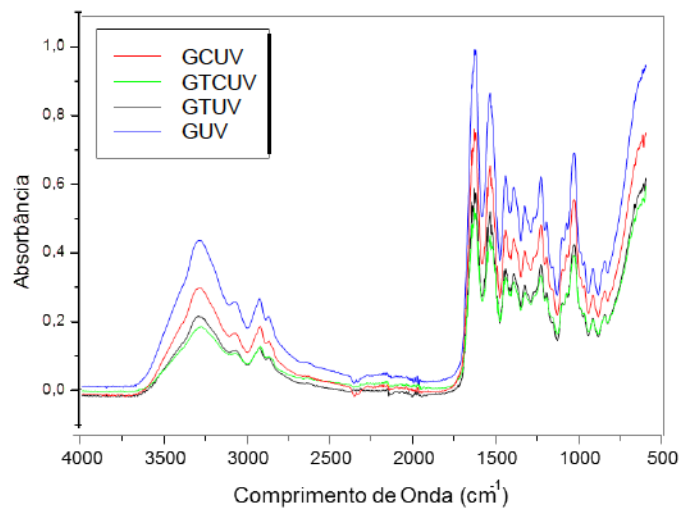


Figura 45 - Espectro vibracional das membranas de gelatina com e sem os fármacos, reticuladas por UV: Membrana de gelatina (GUV), membrana de gelatina com triancinolona acetona (GTUV), membrana de gelatina com extrato de *Chamomilla* (GCUV) e membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTCUV).

A Figura 45 exibe o espectro de infravermelho das membranas de gelatina acrescidas dos fármacos. O pico de menor intensidade é o da amostra GTCUV, enquanto o de maior intensidade é o GUV. Este fato pode estar relacionado à ligação dos fármacos à cadeia da gelatina através dos grupos ($-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$).

Esse fato apresenta repercussão no ensaio de bioadesão que será apresentado no item 4.6. Os grupos ($-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$) são responsáveis pela formação das ligações mucoadesivas entre a membrana e o disco de mucina, de modo que, quanto maior a quantidade de fármaco incorporada no sistema, menor é o valor da adesão.

Quando o agente reticulador é a genipina, pode-se intuir que a adição da *Chamomilla* e da triancinolona acetonida nas membranas reticuladas por esse agente químico não provocou alterações significativas no espectro das membranas, que se apresentaram com comportamento similar entre si (Figura 46). Este aspecto, já relatado nas membranas reticuladas por radiação ultravioleta, pode estar relacionado à pequena quantidade destes compostos nas membranas.

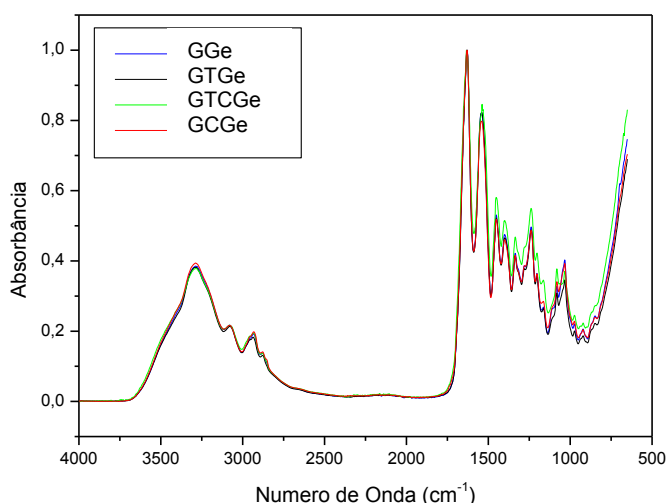


Figura 46 - Espectro vibracional das membranas de gelatina com e sem os fármacos, reticuladas por genipina: membrana de gelatina (GGe), membrana de gelatina com triancinolona acetonida (GTGe), membrana de gelatina com extrato de *Chamomilla* (GCGe) e membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTCGe).

A reticulação por glutaraldeído é caracterizada pela presença de ligações do tipo imina ($\text{C}=\text{N}$) formadas a partir da reação dos grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ da gelatina com os grupos $-\text{C}=\text{O}$ do glutaraldeído (Martinez *et al.*, 2007).

É provável que a banda na ligação imina ($\text{C}=\text{N}$), formada a partir da reticulação com glutaraldeído, sobreponha-se ao grupo $\text{C}=\text{O}$ da amida I, uma vez que ambos absorvem na mesma região do espectro infravermelho. Pode-se observar um aumento da intensidade de absorção das bandas na região entre 3000-

3700 cm^{-1} (O-H; N-H), dos picos correspondentes à amida II (1546 cm^{-1}) da gelatina quando o agente reticulante utilizado é o glutaraldeído. No espectro relativo à membrana reticulada por glutaraldeído a 2,0% (Figura 47) a intensidade do pico é ainda maior, o que nos permite compreender que houve maior eficiência na estabilização da gelatina.

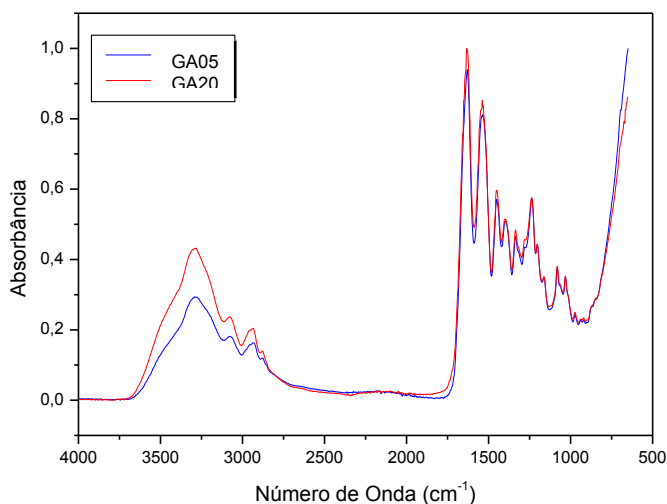


Figura 47 - Espectro vibracional das membranas de gelatina reticuladas por glutaraldeído: membrana de gelatina reticulada com glutaraldeído a 0,5% (GA05) e membrana de gelatina reticulada com glutaraldeído a 2,0% (GA20).

4.3 Estudo da Biodegradação e Intumescimento in vitro

As propriedades hidrofílicas das membranas obtidas foram estudadas por medidas de taxa de intumescimento em função do tempo. O intumescimento é descrito como o aumento no volume do polímero quando este está imerso em um determinado solvente, ou também pode ser determinado a partir da quantidade de massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial (Campos *et al.*, 2005; Neto, 2005; Ratner, 1996; Zhang, 2007).

A Figura 48 apresenta o gráfico da taxa de intumescimento da membrana de gelatina sem reticulação, onde foi possível observar que a membrana apresentou alta capacidade de absorção nos primeiros 5 minutos e após esse período ela se degradou, havendo perda total da massa após 15 minutos em saliva artificial. Esse

resultado confirma o alto grau de hidrofiliçidade da gelatina e que esta se dissolve em meio aquoso (Wolf, 2007).

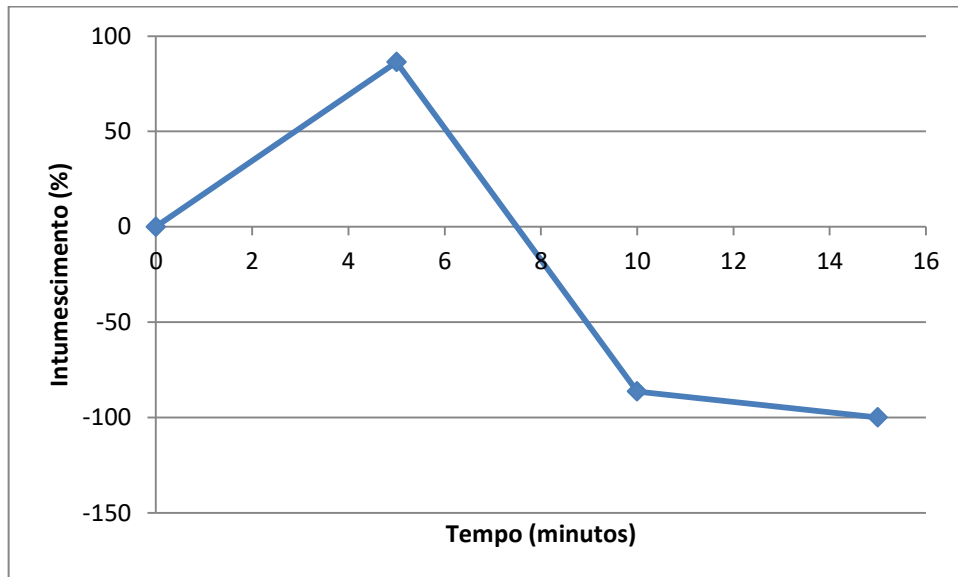


Figura 48 - Grau de Intumescimento para a membrana de gelatina sem reticulação.

Na tentativa de estender o tempo de biodegradação das membranas de gelatina, alguns agentes reticulantes foram utilizados. A radiação ultravioleta obteve pouco êxito, aumentando o tempo de perda da massa total em até 10 minutos (Figura 49). A membrana de gelatina sem fármacos e reticulada por UV foi a que apresentou maior capacidade de absorção. Em 5 minutos de imersão em saliva artificial ela absorveu 6 vezes o valor de seu peso. Foi também a variável que apresentou mais rápida biodegradação, perdendo toda sua massa após 20 minutos em solução. As demais variáveis com fármacos em sua composição permaneceram em saliva artificial por 25 minutos, absorvendo até 4,5 vezes seu peso, como pode ser verificado no gráfico relativo à membrana de gelatina com incorporação triancinolona acetona. A membrana de gelatina com os dois fármacos em sua composição foi a variável que menos intumescceu, aumentando apenas 27,48% de seu peso inicial.

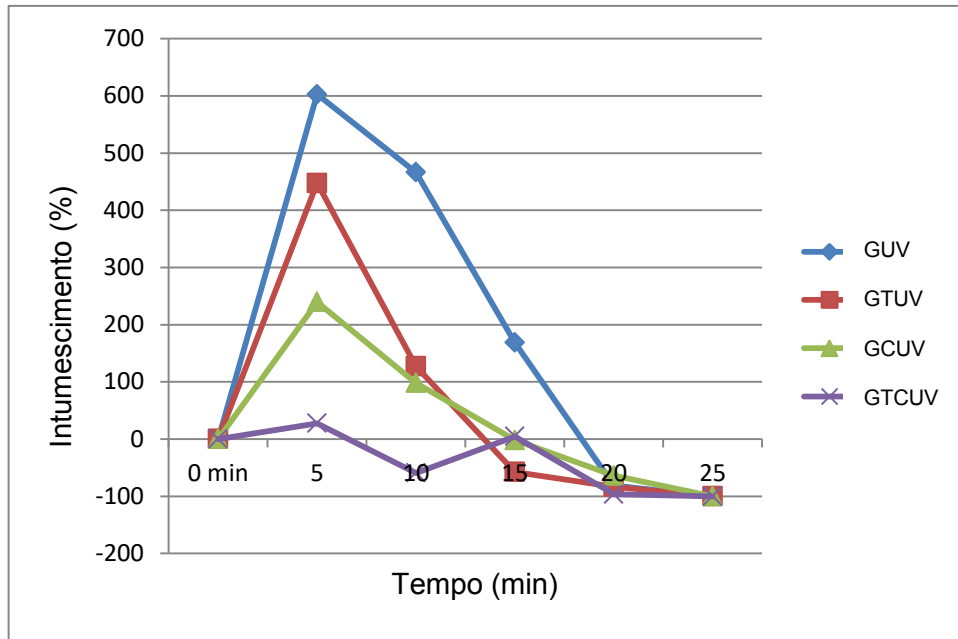


Figura 49 - Grau de Intumescimento das diferentes membranas de gelatina reticuladas com UV: membrana de gelatina (GUV), membrana de gelatina com triancinolona acetona (GTUV), membrana de gelatina com extrato de *Chamomilla* (GCUV) e membrana de gelatina com ambos os fármacos (GTCUV).

O segundo agente reticulante utilizado foi a genipina. Manteve-se a concentração da solução a 0,1% e variou-se o tempo de exposição em 20 horas, 6 horas, 3 horas, 10 minutos e 1 minuto. Observou-se um considerável aumento no tempo total de biodegradação, que passou a ser de 120 horas para as amostras com tempo de exposição de 20 horas à solução de genipina e de 24 horas para às amostras expostas somente durante 1 minuto à mesma solução (Figura 50).

O tempo de durabilidade das membranas reticuladas por UV foi de 5 minutos, como exposto na Figura 49, havendo biodegradação após esse período. Na reticulação por genipina, as amostras apresentaram estabilidade de até 24 horas, fato observado no gráfico relativo à membrana submetida à solução reticuladora por 3 horas (Figura 50).

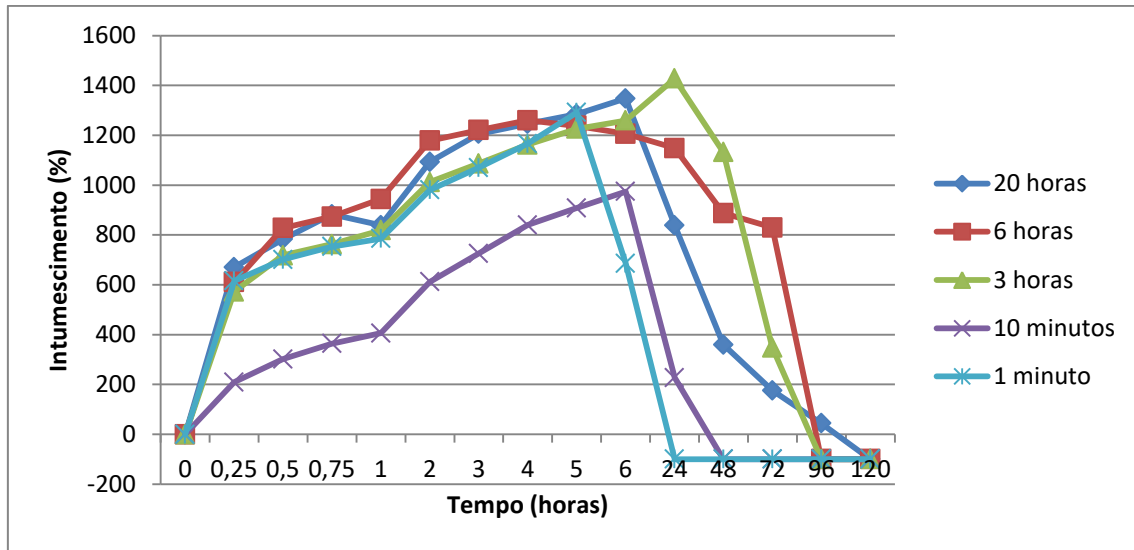


Figura 50 – Intumescimento das membranas de gelatina reticuladas por genipina com uma concentração de genipina a 0,1% e tempo de exposição ao agente reticulante de 20, 6, 3 horas, 10 e 1 minuto.

Embora a genipina tenha atingido o objetivo de sua utilização nesta pesquisa, o foco deste trabalho é a aplicação da membrana em mucosa oral por um tempo pré-determinado de no máximo 6 horas, que compreende o período entre as refeições. Após alimentar-se, o paciente realizará a higiene bucal e nova membrana será colocada no local da lesão.

Na tentativa de ajuste da biodegradação destas membranas para um período menor de tempo, novos experimentos foram realizados. O tempo de exposição das membranas à solução de genipina foi fixado em 1 minuto e variou-se a concentração da solução em 0,1%, 0,001% e 0,0005%, conforme Figura 51.

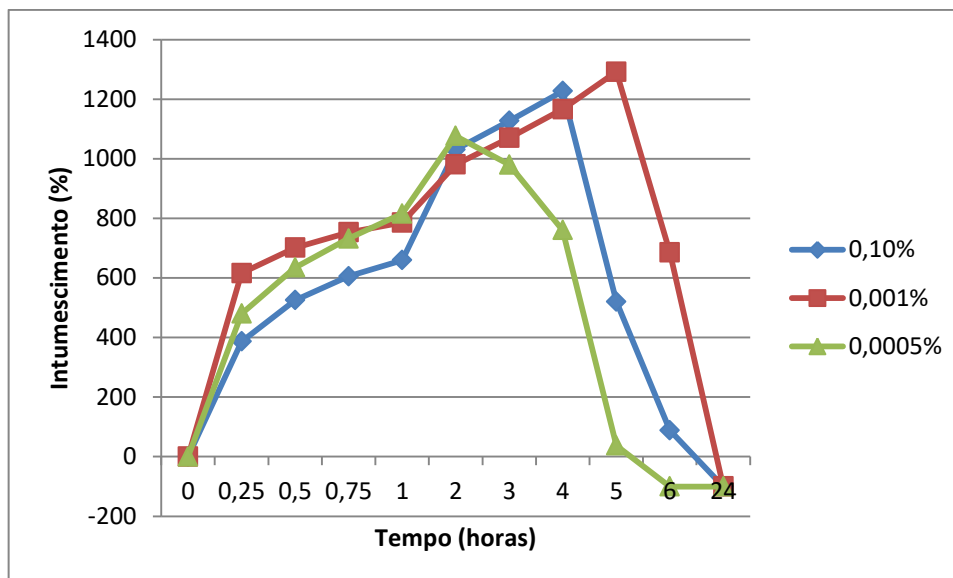


Figura 51 - Intumescimento das membranas de gelatina reticuladas por genipina em soluções de concentração a 0,1%, 0,001% e 0,0005% e tempo de exposição de 1 minuto.

Observa-se que a redução da concentração da solução de genipina de 0,1% para 0,01% não provocou alterações significativas no tempo de estabilidade das membranas e no tempo total para sua completa biodegradação. A membrana reticulada em solução com concentração de genipina a 0,0005% apresentou menor estabilidade, cerca de 2 horas, e a perda total de massa ocorreu após 6 horas do início do ensaio.

Diante disso, as membranas reticuladas por genipina apresentaram o grau de intumescimento e o perfil de biodegradação *in vitro* mais satisfatórios para o uso pretendido do que quando reticuladas por radiação Ultravioleta. Através da solução com concentração de genipina a 0,0005% e tempo de exposição de 1 minuto atingiu-se o período desejado de permanência da membrana em saliva artificial antes de sua completa biodegradação. Os ensaios seguintes tomaram por parâmetro a seleção de amostras deste ensaio.

4.4 Estudo da Liberação controlada do fármaco

Através da análise do ensaio de liberação controlada (Figura 52) pode-se mimetizar o comportamento do fármaco em questão quando em meio biológico, favorecendo ajustes funcionais para que sua atuação seja a adequada para a utilização que se pretende. Foram analisados dois tipos de membranas: gelatina

com incorporação de triancinolona acetona (GTGe) e gelatina com incorporação de triancinolona acetona e *Chamomilla* (GTCGe), ambas reticuladas por genipina a 0,0005%.

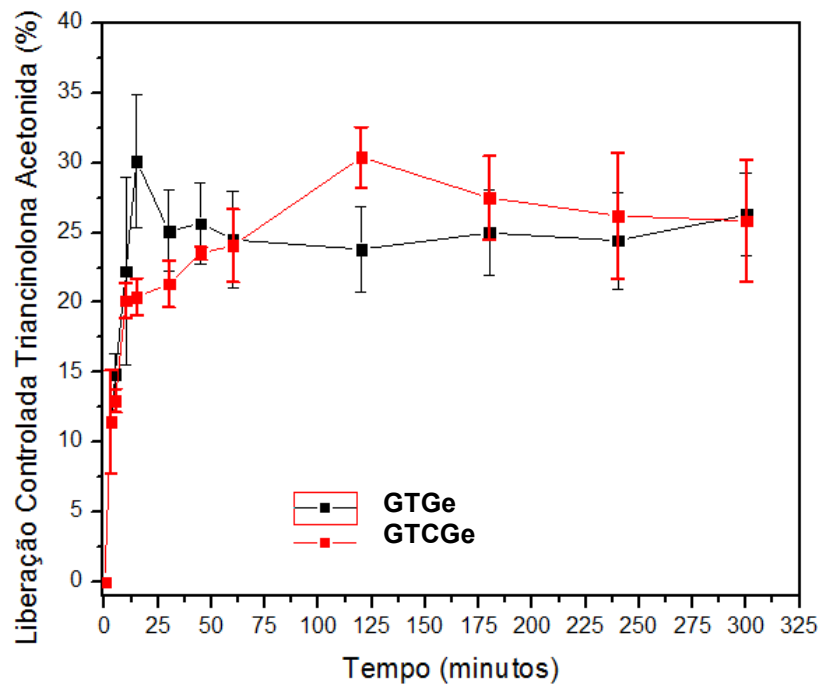


Figura 52 - Gráfico da liberação acumulada das membranas de gelatina com triancinolona acetona (GTGe) e gelatina com triancinolona acetona e extrato de *Chamomilla* (GTCGe), ambas reticuladas por genipina a 0,0005%.

Para ambas as membranas foi observado o efeito burst (Kleinübing, 2013; Lins, 2012; Lopes et al., 2005; Pereira et al., 2005; Silva et al., 2003), que consiste na liberação inicial mais acelerada do fármaco, devido a sua existência em certa quantidade na superfície das amostras. Essa liberação está associada à sua não-remoção por lavagem e pode ser percebida nos 15 minutos iniciais, apresentando comportamento mais intenso na membrana GTGe. Decorridos 30 minutos do início do ensaio, o perfil de liberação é modificado, passando a haver uma difusão mais lenta do fármaco em ambas as variáveis, fato que está associado ao intumescimento da membrana, afrouxamento da rede polimérica e liberação gradual do fármaco incorporado nela.

No gráfico representativo da membrana GTCGe pode-se perceber que o máximo de liberação ocorreu em 120 minutos, contrastando com a membrana

GTGe, que teve seu pico em 15 minutos. A presença da *Chamomilla* na composição GTCGe gerou influências além do auxílio terapêutico esperado, alterando o perfil de liberação e promovendo uma difusão mais lenta da triancinolona acetona, de maneira a proporcionar um tempo de máxima liberação teórica maior.

Pelos dados gerados durante os experimentos pode-se inferir que a liberação da triancinolona acetona ocorre pelo intumescimento da membrana (difusão com o meio aquoso) e posterior degradação.

Ao final das 5 horas de ensaio de liberação detectou-se quantidades similares de triancinolona acetona dissolvida em meio aquoso para ambas as composições: em torno de 26% da quantidade teórica incorporada, sendo o desvio padrão de 3%.

4.5 Estudo da Molhabilidade

A Figura 53 ilustra o ensaio de molhabilidade das diferentes composições de membrana de gelatina. Os valores dos ângulos de contato podem ser observados na Tabela 5, onde é considerada face lisa a que permaneceu em contato com o ar durante o processo de secagem das amostras e face riscada a que permaneceu em contato com o suporte de poliestireno durante o mesmo processo, adquirindo suas ranhuras.

Tabela 5 - Ângulo de contato obtido durante o ensaio de molhabilidade \pm desvio padrão.

Amostra/Superfície	Face Lisa	Face Riscada
GTGe	83.1° \pm 7.6	92.0° \pm 6.2
GCGe	73.6° \pm 4.1	69.8° \pm 0.8
GTCGe	68.5° \pm 4.4	70.3° \pm 1.7

A membrana de gelatina com incorporação de triancinolona acetona (GTGe) foi a variável com maiores valores de ângulo de contato, cuja face lisa apresentou 83.1° \pm 7.6 e face riscada 92.0° \pm 6.2, sendo considerada de molhabilidade parcial.

As membranas com incorporação do extrato de *Chamomilla* (GCGe) e com incorporação de ambos os compostos (GTCGe) apresentaram valores muito próximos entre si na face riscada ($69.8^\circ \pm 0.8$ e $70.3^\circ \pm 1.7$, respectivamente), porém referindo-se à face lisa, a membrana GTCGe possui maior espalhamento da gota ($68.5^\circ \pm 4.4$) que a membrana GCGe ($73.6^\circ \pm 4.1$).

Diante dos resultados, a membrana que possui comportamento mais hidrofílico é a GTCGe. Esse fato se justifica pela presença de banda em 1633 cm^{-1} característica do grupo carboxílico no espectro da gelatina. Esse grupo químico apresenta afinidade por água e seu pico mais elevado no espectro representa sua maior disponibilidade na membrana GTCGe. Porém todas as membranas apresentam-se adequadas ao uso pretendido, solubilizando após 6 horas em meio aquoso.

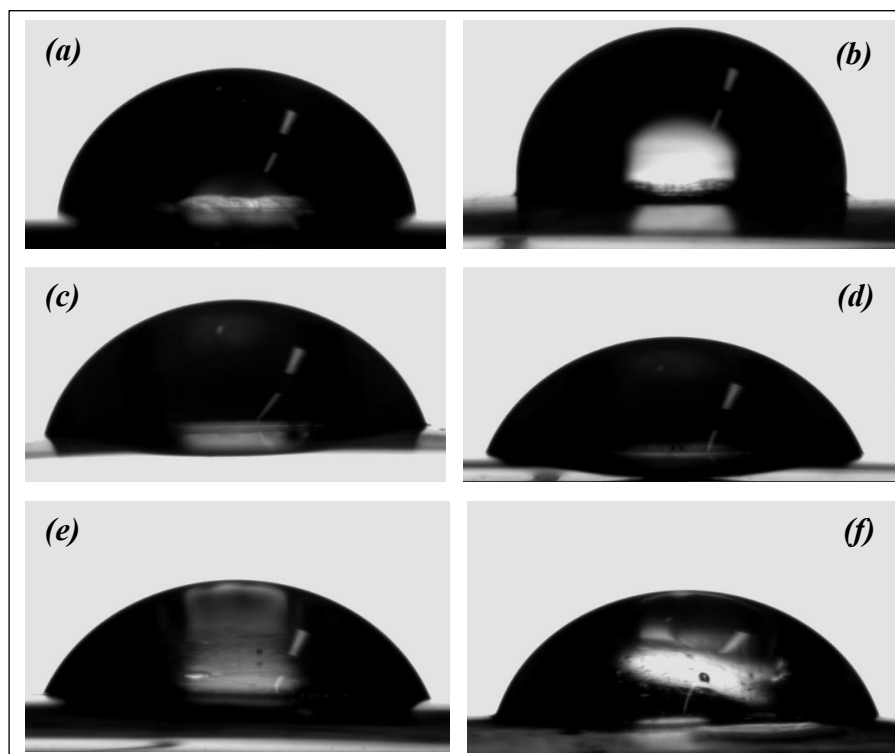


Figura 53 - Ângulo de contato entre uma gota de água e as diferentes membranas: (a) GTGe - face lisa; (b) GTGe - face riscada; (c) GCGe - face lisa; (d) GCGe - face riscada; (e) GTCGe - face lisa; (f) GTCGe - face riscada.

Segundo LIMA (2011) e FOOK (2005), o ângulo de contato entre a gota de um líquido e uma superfície sólida vai depender da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota espalhar-se sobre a superfície e as forças coesivas do líquido que

contraem a gota na forma de uma esfera com superfície de contato mínima, sendo um parâmetro útil para prever a interação de um biomaterial com o meio biológico.

4.6 Estudo da Bioadesão

As membranas desenvolvidas nesta pesquisa apresentam em sua estrutura química requisitos para que ocorra uma interação bioadesiva com a membrana modelo, como quantidade suficiente de grupos químicos capazes de formar ligações de hidrogênio ($-OH$, $-C=O$, $-NH_2$) com o substrato biológico. Desta forma, com o intuito de avaliar a capacidade mucoadesiva entre as membranas desenvolvidas durante esta pesquisa e a membrana modelo de mucina, a força de adesão foi avaliada. A tabela 6 apresenta os valores de força de adesão (N) para as membranas com incorporação de Triancinolona Acetonida, extrato de *Chamomilla* e com associação de ambos os fármacos em sua composição, sendo os ensaios feitos em quintuplicata.

Tabela 6. Valores de força de adesão para as membranas de gelatina com os fármacos em sua composição. Resultados expressos como a média \pm desvio padrão.

MATERIAL	FORÇA DE ADESÃO (N)
GTGe	0.750 ± 0.048
GCGe	0.603 ± 0.058
GTCGe	0.544 ± 0.031
Triancinolona Acetonida EMS [®]	0.178 ± 0.010
Admuc AVERT [®]	0.126 ± 0.007

A partir dos dados obtidos pelo ensaio de bioadesão, podemos perceber que, comparativamente, a membrana de gelatina com incorporação de triancinolona acetona é a que apresenta maior força de adesão, enquanto a membrana com Triancinolona Acetonida e extrato de *Chamomilla* na composição é a que apresenta os menores valores entre as membranas produzidas nesta pesquisa. A diminuição no valor da força de adesão deve-se, possivelmente, ao fato de os fármacos

ligarem-se aos grupamentos existentes na cadeia do biomaterial ($-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$) que são responsáveis pela formação das ligações mucoadesivas entre o sistema e o disco de mucina; sendo que, quanto maior a quantidade de fármaco incorporada no sistema, menor é o valor da adesão.

Foram analisadas também a Triancinolona Acetonida em orabase da EMS[®] e a pomada à base de extrato de *Chamomilla* da AVERT[®], comercialmente disponíveis. Os resultados mostram que as formulações já comercializadas possuem força de adesão muito abaixo quando comparadas às membranas produzidas nesta pesquisa, embora a apresentação comercial da triancinolona acetona em orabase tenha o apelo comercial de possuir satisfatória mucoadesão. Sendo assim, os resultados nos permitem inferir que os biomateriais desenvolvidos nesta pesquisa possuem mucoadesão muito mais apropriada para o uso pretendido, reforçando sua proposição para aplicação como sistemas mucoadesivos.

5 CONCLUSÕES

- ✓ As condições de processamento para obtenção das membranas de gelatina e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do extrato de *Chamomilla* foram eficazes no desenvolvimento das membranas desta pesquisa;
- ✓ Através do MEV pode-se analisar o aspecto de maior densificação estrutural e aparente menor flexibilidade nas amostras reticuladas por glutaraldeído, enquanto nas amostras reticuladas por UV e genipina pode-se perceber a natureza fibrosa e a orientação preferencial das membranas de gelatina. Quanto às amostras com incorporação de fármacos, nas membranas de gelatina com extrato de *Chamomilla* percebe-se uma superfície homogênea com total incorporação do extrato, enquanto nas membranas com Triancinolona Acetonida pode-se perceber pequenos aglomerados do fármaco, que estão distribuídos ao longo de toda a amostra, fato que confirma sua insolubilidade em meio aquoso;
- ✓ Os perfis de micrograma apresentaram-se similares quando comparadas através da técnica de AFM, exceto para o caso da membrana com incorporação do extrato de *Chamomilla*, que apresentou maior homogeneidade superficial;
- ✓ As membranas reticuladas por genipina apresentaram o grau de intumescimento e o perfil de biodegradação *in vitro* mais satisfatórios para o uso pretendido do que quando reticuladas por radiação ultravioleta. Através da solução com concentração de genipina a 0,0005% e tempo de exposição de 1 minuto atingiu-se o período desejado de permanência da membrana em saliva artificial antes de sua completa biodegradação;
- ✓ As membranas mostraram-se homogêneas em seu comportamento de liberação e com baixo desvio padrão, fato que ressalta a metodologia coerente utilizada para a pesquisa;
- ✓ A presença da *Chamomilla* na membrana de gelatina incorporada com triancinolona acetona auxiliou não só na terapêutica como na modificação do perfil de liberação do fármaco, promovendo uma liberação mais lenta;
- ✓ A incorporação do extrato de *Chamomilla* aumentou a hidrofiliabilidade das membranas;

- ✓ As membranas produzidas nesta pesquisa apresentaram maior mucoadesão quando comparadas às formas farmacêuticas disponíveis comercialmente com esses princípios ativos e para uso oral, sendo mais apropriada para o uso pretendido, reforçando sua proposição para aplicação como sistemas mucoadesivos;
- ✓ Dentre as variáveis produzidas, a membrana de gelatina com a incorporação de triancinolona acetona e extrato de *Chamomilla* mostrou ser a de comportamento mais promissor para a utilização como sistema de liberação controlada de fármacos.

SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS:

- ✓ Avaliar o comportamento das membranas através de ensaios *in vivo*;
- ✓ Analisar a efetividade da reticulação pelo Método da Ninidrina;
- ✓ Investigar o comportamento do extrato de *Chamomilla* através de ensaios microbiológicos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHET, D. C.; HE, X. W. Determination of the denaturation level in gelatin films. *Polymer*, v. 36, n. 4, p. 787-791, 1995.

ABRAMSON, S.; ALEXANDER, H.; BEST, S.; BOKROS, J. C.; BRUNSKI, J. B.; COLAS, A.; et al. *Classes of Materials Used in Medicine*. IN: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.68-233, 2004.

AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 38, n.2, p.105-114, 1997.

AHN, J. S.; CHOI, H. K.; CHUN, M. K.; RYU, J. M.; JUNG, J. H.; KIM, Y. U.; CHO, C. S. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials*, v. 23, p. 1411–1416, 2002.

ALMEIDA FILHO, E. Avaliação do Tratamento Térmico em Recobrimentos Cerâmicos Bioativos pelo Método Biomimético sobre Titânio c.p. modificados pelo Laser Nd:YAG. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

AZIM, H. A. E.; NAFEE, N.; RAMADAN, A.; KHALAFALLAH. Liposomal buccal mucoadhesive film for improved delivery and permeation of water-soluble vitamins. *International Journal of Pharmaceutics*. V.488, n.1-2, p.78-85, 2015.

BARRETO, A. L. S. Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Tiradentes: Aracaju. 2008.

BASU, B.; NATH, S. *Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility*. In: BASU, B.; KATTI, D. S.; KUMAR, A. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009, p.3-18.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. *Formulário Médico Farmacêutico*. 3ed., São Paulo: Pharmabooks, 2006.

BAUMANN, L. Botanical ingredients in cosmeceuticals. *Journal of Drugs in Dermatology*, v.6, n.11, p.1084-8, 2007.

BEDI, M.K.; SHENEFELT, P.D. Herbal Therapy in Dermatology. Archives of Dermatology, v.138, n.2, p.232-42, 2002.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials. V.22, p.763-768, 2001.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterials. V.23, p.4827-32, 2002.

BIOMATERIALES DE NATURALEZA INORGÁNICA: Metales, Aleaciones Y Cerámicas. 2012.

BHAT, R.; KARIM, A.A. Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin. Food Chemistry, v.113, p.1160-64, 2009.

BONFERONI, M.C.; CHETONI, P.; GIUNCHEDI, P.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BURGALASSI, S.; CAMELLA, C. Carrageenan-gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V.57, n.3, 2015.

BUGARIN JÚNIOR, J. G.; GARRAFA, V. Bioética e Biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. Revista Saúde Pública, 2007. n. 41, v.2, p. 223-8.

CAMPOS, S.D. *et al.* "Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade". *Cerâmica*, v. 51, p. 274-279, 2005.

CAO, W.; HENCH, L. Bioactivematerials. *Ceramics International*, v. 22, n. 6, p. 493-507, 1996.

CAMELLA, C. M.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Properties of Chemically Modified Gelatin Films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n.1, p-45-53, 2006.

CASETTARI, L.; ILLUM, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*. V.190, p.189-200, 2014.

CHAU, C.; WANG, Y.; WEN, Y. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1402-1408, 2007.

CHOUDHURY, N. A.; SAMPATH, S.; SHUKLA, A. K. Gelatin Hydrogel Electrolytes and Their Application to Electrochemical Supercapacitors. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 155, 2007.

COSTA, R.P. Caracterização de materiais por Scanning Probe Microscope. São Bernardo do Campo: Faculdade de Engenharia Industrial, 2010.

COSTA, G. B. F.; CASTRO, J. F. L. Etiologia e tratamento da estomatite aftosa recorrente – revisão de literatura. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*. V. 46, n.1, 2013.

CRESCENZI, V.; FRANCESCANGELI, A.; TAGLIENTI, A. New gelatina-based hidrogels via Enzymatic Networking. *Biomacromolecules*, v.3, n.6, p. 1384-91, 2002.

CUI, L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydrate Polymers*. V.99, p.31-38, 2014.

DONATO, E. M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. V.31, n.2, p.125-30, 2010.

DUARTE, M. R.; LIMA, M. P. Análise Farmacopéica de amostras de Chamomilla - *Matricaria recutita* L., ASTERACEAE. *Visão Acadêmica*, v.4, n.2, p.89-92, 2003.

FATTAH, C. M. R. S.; ARANEGA, A. M.; LEAL, C. R.; MARTINHO, J.; COSTA, A. R. Controle da dor pós-operatória em cirurgia bucal: revisão de literatura. *Revista Odontológica de Araçatuba*. V.26, n.2, p.56-62, 2005.

FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; VOICU, G.; GHITULICA, C.; VASILE, B. S.; FICAI, D.; TRANDAFIR, V. Self assembled collagen/ hydroxyapatite composite materials. *Chem. Eng. J.*, v.160, p. 794–800, 2010.

FOOK, Ana Carolina Brasil Marcelino. Produção e Caracterização de Arcabouços Compósitos HA/Biopolímero para Engenharia de Tecidos. 2012. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2 ed. Brasília: Anvisa, 2012. 224p.

FRAIHA, P. M.; BITTENCOURT, P. G.; CELESTINO, L. R. Estomatite Aftosa Recorrente – Revisão Bibliográfica. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. V.68, n.4, 571-8, 2002.

GORSKY, M.; EPSTEIN, J.; RABENSTEIN, S.; ELISHOOV, H.; YAROM, N. Topical minocycline and tetracycline rinses in treatment of recurrent aphthous stomatitis: a randomized cross-over study. Online Journal of Dermatology. V.13, N.1, 2007.

GUELCHER, S. A.; HOLLINGER, J. O. An Introduction to Biomaterials. New York: Taylor & Francis Group, 2006, p. 1-13.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. Terapêutica Medicamentosa de Algumas Doenças Estomatológicas. IN: MARCUCCI, G. Fundamentos de Odontologia – Estomatologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 213-233. 2005.

HANAWA, T. Titanium and its oxide film a substrate for formation of apatite. In: DAVIES, J. E. The bone-biomaterial interface. Toronto: University of Toronto Press, 1991. cap. 2, p. 49-61.

HITACHI. Hitachi Model S-4700 Field Emission Scanning Electron Microscope Instruction Manual, 2007.

ICV (Instituto de Cerámica y Vidrio), disponível em:<www.icv.csic.es>. Acesso em: 12 de setembro de 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARD. ISO 10993: biological evaluation of medical devices. Disponível em: <<http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage>>. Acesso em: 28 maio 2015.

JAIN, D.; CARVALHO, E.; BANERJEE, R. Biodegradable hybrid polymeric membranes for ocular drug delivery. Acta Biomaterialia. V.6, n.4, p.1370-1379, 2010.

JAIPAL, A.; PANDEY, M. M.; CHARDE, S. Y.; RAUT, P. P.; PRASANTH, K. V.; PRASAD, R. G. Effect of HPMC and mannitol on drug release and bioadhesion behavior of buccal discs of buspirone hydrochloride: in vitro and in vivo pharmacokinetic studies. Saudi Pharmaceutical Journal. 2014.

JRIDI, M.; HAJJI, S.; AYED, H. B.; LASSOUED, I.; MBAREK, A.; KAMMOUN, M.; SOUISSI, N.; NASRI, M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 67, p.373-379, 2014.

KAWAMURA N, KIM Y, ASUKAI N. Suppression of cellular immunity in men with a past history of posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 2001; 158:484-6.

KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Hydroxyapatite and gelatin composites foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *Wiley Periodicals*, 2004, p.136-145.

KLEINÜBING, S. A. Liberação controlada da oxitetraciclina encapsulada em matriz de alginato/quitosana recoberta com Acril-EZE® MP em leite fluidizado [Dissertação de Mestrado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012.

LAI, P.; DAEAR, W.; LÖBENBERG, R.; PRENNER, E. J. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatin, chitosan, poly (D,L-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014.

LAMY, R.; NETTO, C. F.; PECEGO, M. G.; PECEGO, J. G. C.; PEREIRA, B. B.; MORAES JÚNIOR, H.V.; DANTAS, A. M. Reticulação do colágeno corneano com radiação ultravioleta e riboflavina para tratamento de ceratocone: resultados preliminares de um estudo brasileiro. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. V.67, n.5, p.231-5, 2008.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221 : 1-22, 2001.

LESERMAN J, PETITTO JM, GOLDEN RN, GAYNES BN, GU H, PERKINS DO, ET AL. Impact of stressful life events, depression, social support, coping, and cortisol on progression to AIDS. *Am J Psychiatry* 2000;157:1221-8.

LIMA, A. A. S.; GRÉGIO, A. M. T.; TANAKA, O.; MACHADO, M. A. N.; FRANÇA, B. H. S. Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. *Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial*, v.10, n.5, 2005.

LINS, L. C. V. Micropartículas compostas de PHB/Cetoprofeno recobertas com quitosana reticulad: obtenção e estudo da liberação controlada de fármaco.

[Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. 2012.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n.2, p.143 - 154, 2005.

LUCINDA-SILVA, R. M.; SALGADO, H. R. N.; EVANGELISTA, R. C. Alginate-chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, v.81, p.260-268, 2010.

LUDWING, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V.57, n.11, p.1595-1639, 2005.

MAHMOUD, A. A.; EL-FEKY, G. S.; KAMEL, R.; AWAD, G. E. A. Chitosan / Sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. V.413, n.1-2, p.229-236, 2011.

MANSUR, H.S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N.; MANSUR, A. A. P. FTIR Spectroscopy Characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering*. V. 28, p. 539-548, 2008.

MANTLE, D.GOK, M.A.; LENNARD, T.W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders; *Adverse Drug React. Toxicol. Rev*, v.20, n.2, p.89-103, 2001.

MARQUES, R. H.; GRAVENA, R. A.; SILVA, J. D. T.; HADA, F. H.; SILVA, V. K.; MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. M. B. Inclusão da Chamomilla no desempenho, comportamento, e estresse em codornas durante a fase de recria. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p. 415-420, 2010.

MARTINEZ, L., AGNELY, F., LECLERC, B., SIEPMANN, J., COTTE, M., GEIGER, S., COUARRAZE, G. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67:339, 2007.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. V. 38, n.1, 2002.

MATSUDA, S.; IWATA, H.; SE, N.; IKADA, Y. Bioadhesion of gelatina films crosslinked with glutaraldehyde. John Wiley & Sons, Inc. 1998.

MATSUDA, S.; SE, N.; IWATA, H.; IKADA, Y. Evaluation of the antiadhesion potential of UV cross-kinked gelatina films in a rat abdominal model. Elsevier: Biomaterials, v.23, p.2901-08, 2002.

MENG, W.; DONG, Y.; LIU, J.; WANG, Z.; ZHONG, X.; CHEN, R. et al. A clinical evaluation of amlexanox oral adhesive pellicles in the treatment of recurrent aphthous stomatitis and comparison with amlexanox oral tablets: a randomized, placebo controlled, blinded, multicenter clinical trial. *Trials*. V.10, n.30, 2009.

MENG, Y.; SUN, S.; LI, J.; NAN, K.; LAN, B.; JIN, Y.; CHEN, H. Sustained release of triamcinolone acetonide from an episcleral plaque of multilayered poly-ε-caprolactone matrix. *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 126–133, 2014.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. V.37, p.790-802, 2004.

MISCH C.E. Prótese sobre Implantes. São Paulo: Editora Santos, 2006.

MIZIARA, I. D.; ARAÚJO FILHO, B. C.; WEBER, R. AIDS and recurrent aphthous stomatitis. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. V.71, n.4, p.517-520, 2005.

MOGILNER, I. G., RUDERMAN, G., GRIGERA, J. R. Collagen stability, hydration and native state. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 21, p. 209-213, 2002.

MUMTAZ, A. M.; CH'NG, H. S. Design of a dissolution apparatus suitable for in situ release study of triamcinolone acetonide from bioadhesive buccal tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 12, p.129-139, 1995.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de Qualidade de Produtos à base de Plantas Mediciniais comercializados na cidade do Recife –PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e Chamomilla (*Matricaria recutita* L.). *Rev. Bras. Pl. Med.* v. 7, n.3, p.56-64, 2005.

NAZAR, H.; FATOUROS, D. G.; VAN DER MERWE, S. M.; BOUROPOULOS, N.; AVGOUROPOULOS, G.; TSIBOUKLIS, J.; ROLDO, M. Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chrolide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V.77, n.2, p.225-232, 2011.

NETO, C. G. T. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. *Carbohydrate Research*, v. 340, p.2630-2636, 2005.

NEVILLE, B.W.; ALLEN, C.M.; DAMM, D.D.; BOUQUOT, J.E. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2 ed, 2004. 820p.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Elsevier. 3 ed, 2009. 992p.

NIU, G.; CHOI, J. S.; WANG, Z.; SKARDAL., A.; GIEGENGACK, M.; SOKER, S. Heparin-modified gelatin scaffolds for human corneal endothelial cell transplantation. *Biomaterials*. v. 35, n. 13, p.4005–4014, 2014.

OTONI, C.G.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; CHIOU, B.S.; BILBAO-SAINZ, C.; BECHTEL, P.J.; MCHUGH, T.H. Ultraviolet-B irradiation induced cross-linking improves physical properties of Cold-and-Warm-Water fish gelatin gels and films. *Journal of Food Science*, v.77, n.9, 2012.

PAL, U. S.; SINGH, N.; MALKUNJE, L. R.; SINGH, R. K.; DHASMANA, S.; YADAV, A. K.; CHAND, S. Retrospective study of absorbable gelatin sponge soaked in triamcinolone acetonide as interpositioning material in temporomandibular joint ankylosis in 350 patients. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, v. 3, p. 20 - 24, 2013.

PATHER, S. I.; RATHBONE, M. J.; SENEL, S. Oral Transmucosal Drug Delivery. IN: RATHBONE, M. J.; HADGRAFT, J.; ROBERTS, M. S.; LANE, M. E. *Modified-Release Drug Delivery Technology*. 2 ed. CRC Press, 2008.

PELLANDA, C.; OTTIKER, E.; STRUB, C.; FIGUEIREDO, V.; RUFLI, T.; IMANIDIS, G.; SURBER, G. Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: effect of dose and application frequency. *Arch Dermatol Res*. v.298, p.221-230, 2006.

PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCCI, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*. V.25, p. 1372-1381, 2011.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, R. R. Micropartículas secas contendo fármaco modelo lipofílico preparadas a partir da suspensão aquosa: estudo de formulação. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n.2, p.198 - 205, 2006.

PEREIRA, K. M. A.; ROCHA, D. A. P.; GALVÃO, H. C.; FREITAS, R. A. Ulceração aftosa recorrente: revisão dos conceitos atuais. *Revista de Odontologia da UNESP*. v.35, p. 61-67, 2006.

PHILLIPS, L.G.; WHITEHEAD, D.M.; KINSELLA, J. *Structure-Function Properties of Food Proteins*, Academic Press, Chap. 10, pp. 206-232, 1994.

PINTO, M.R. Utilização de Materiais de origem vegetal em produtos farmacêuticos e cosméticos de aplicação cutânea. [Dissertação de Mestrado]. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. 2013.

POK, S.; MYERS, J. D.; MADIHALLY, S. V.; JACOT, J. G. A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. V.9, p. 5630-5642, 2013.

PUCCI, L.; PÉRTILE, L. B.; SILVA, P. R. C.; PEREIRA, R. B. *Biocerâmica: Características e Aplicações*. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia de Materiais, 2002.

QUEIROZ, M. B. R. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 2008.

RAJA, I. S.; FATHIMA, N. N. A gelatin based antioxidant enriched biomaterial by grafting and saturation: Towards sustained drug delivery from antioxidant matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V.128, p.537-543, 2015.

RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G. Produção de capítulos florais da *Chamomilla* em função de populações de plantas e da incorporação ao solo de cama-de-aviário. *Horticultura Brasileira*. v. 22, n.3, p. 566-572, 2004.

RAMZAN, M.; AHMED, E.; NIAZ, N. A.; RANA, A. M.; BHATTI, A. S.; KHALID, N. R.; NADEEM, M. Y. AFM applications to study the morphology of HfO₂ multilayer thin films. *Superlattices and Microstructures*. V.82, p.399-45, 2015.

RATNER, B. D. A history of Biomaterials. IN: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.10-19, 2004.

RATNER, B. D. Characterization of biomaterial surfaces. **Cardiovasc. Pathol.**, v.2, p.87s-100s, 1993.

RAY, S.S., BOUSMINA M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21 st century materials world. *Progress in Materials Science*. v. 50, p. 962-1079, 2005.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essencial Oil and Extract of Fennel (*Foeniculum vulgare L.*) and chamomile (*Matricaria chamomilla L.*). *Industrial Crops and Products*. San Diego: Elsevier Academic Press, v.44, p. 437-45, 2013.

RODRIGUES, G.V.; MARCHETTO, O. Análises Térmicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Mecânica, 2002.

ROGERS, R. S. Recurrent Aphthous Stomatitis: Clinical Characteristics and Evidence for an Immunopathogenesis. *The Journal of Investigative Dermatology*. V.69, N.6, P.499-509, 1977.

ROSALEN, P.L.; GROPPPO, F.C. Farmacologia. IN: ANDRADE, E.D.; GROPPPO, F.C.;VOLPATO, M.C.; ROSALEN, P.L.; RANALI, J. Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

ROSE, J. B.; PACELLI, S.; HAJ, A. J. E.; DUA, H. S.; HOPKINSON, A. WHITE, L. J.; ROSE, F. R. A. J. Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials*, v. 7, n.4, p. 3106-3135, 2014.

RUSSO, E. M. A.; YOUSSEF, M. N.; VIEIRA, G. F.; TURBINO, M. L.; ODA, M.; CARVALHO, R. C. R. Materiais para Restaurações Diretas. IN: RUSSO, E. M. A.; YOUSSEF, M. N.; VIEIRA, G. F.; TURBINO, M. L.; ODA, M.; CARVALHO, R. C. R. Dentística – Restaurações Diretas. São Paulo: Santos, 2010.

SAADAT, E.; SHAKOR, N.; GHOLAMI, N.; DORKOOSH, F. A. Hyaluronic acid based micelle for articular delivery of triamcinolone, preparation, in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 489, p. 218–225, 2015.

SAGIRI, S. S.; SINGH, V. K.; KULANTHAIVEL, S.; BANERJEE, E.; BASAK, P.; BATTACHRYA, M. K.; PAL, K. Stearate organogel-gelatin hydrogel based bigels: Physicochemical, thermal, mechanical characterizations and in vitro drug delivery applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. V.43, p.1-17, 2015.

SANTONI, N.; MATOS, M.; MÜLLER-KARGER, C.; NICOLA, H.; SABINO, M.; MÜLLER, A. Caracterización de hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. V.9, n.3, 2008.

SANTOS, D. T. Extração, micronização e estabilização de pigmentos funcionais: construção de uma unidade multipropósito para desenvolvimento de processos com fluidos pressurizados. [Tese de Doutorado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 2011.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, 2003.

SILVER, F.; DOILLON, C. Biocompatibility, interactions and implantable materials. New York: VCR., 1989.

SISSON, K.; ZHANG, C.; FARACH-CARSON, M. C.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Evaluation of crosslinking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. *Biomacromolecules*.v.10, n.7, 2009.

SOARES, G. A. S., Biomateriais: classificação, seleção e avaliação, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A.; MORAES, I. C. F.; BITTANTE, A. M. Q. B.; MONTERREY-QUINTERO, E. S. Phase transitions in biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.31, n.2, p.372-9, 2011.

SUNG, H. W.; HUANG, D. M.; CHANG, W. H.; HUANG, R. N.; HSU, J. C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research*. V.46, p.520-30, 1999.

SPECK, K.; FRANKER, A. Anodic Polarization Behavior of NiTi and Ti-6Al-4V in simulated physiological solutions. *J Dent Res*, v.59, p-1590, 1980.

VALERA, M. C.; ANBINDER, A. L.; LEONARDO, M. R.; PARIZOTO, N. A.; KLEINKE, M. U. Cimentos endodônticos: análise morfológica imediata e após seis meses utilizando microscopia de força atômica. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v.14, n.3, p.199-204, 2000.

VALLET, R. M. Introduction to the world of biomaterials. *Anales de Quimica International Edition*, v. 93, p. S16-S14, 1997.

VARGAS, N.R.C.; COELHO, F.S.;MEDIETA, M.C.; SOUZA, A.D.Z.; HAEFFNER, R.; HECK, R.M.; CEOLIN, T.; LOPES, C.V. Plantas medicinais utilizadas para cicatrização de feridas pelos produtores rurais de agricultura de base ecológica do sul do Rio Grande do Sul. Pelotas: XVIII CIC/ XI ENPOS. 2009.

VERCIK, L.C.O.; VERCIK, A.; BRESSIANI, J.C. Development of Gelatin/HA membranes. *Key Engineering Materials*, v.396-398, p.421-4, 2009.

YAO, C. H.; LIU, B. S.; CHANG, C. J.; HSU, S. H.; CHEN, Y, S. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics*. V. 83, p.204-8, 2004.

YUDKIN JS, KUMARI M, HUMPHRIES SE, MOHAMED-ALI V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148:209-14.

XU, J.; STRANDMAN, S.; ZHU, J. X. X.; BARRALET, J.; CERRUTI, M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials*. V.37, p.395-404, 2015.

XU, X.; SHEN, Y.; WANG, W.; SUN, C.; LI, C.; XIONG, Y.; TU, J. Preparation and in vitro characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V.88, n.3, p.998-1004, 2014.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v.30, p.5897-5909, 2009.

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra de pós de colágeno. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, 2007.

WONG, S.S.; WONG, L.J.C., Chemical Cross-linking and the Stabilization of Proteins and Enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 14, no. 11, pp. 866-874, 1992.

ZHANG, Y. et al Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid. Polym. Sci.*, v.285, p.855-863, 2007.

ZIEGLER, C. R.; FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. *Advances in food and nutrition research*, v. 34, p. 203-298, 1990. Responses of thermal properties obtained from the first scan by differential scanning calorimetry.

