

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Fernando Batain

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE FIBROÍNA DE
SEDA E MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA VEÍCULAÇÃO DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS**

**Sorocaba/SP
2018**

Fernando Batain

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE FIBROÍNA DE
SEDA E MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA VEÍCULAÇÃO DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba,
como exigência parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes

**Sorocaba/SP
2018**

Ficha Catalográfica

B332d Batain, Fernando
Desenvolvimento e caracterização de filmes de fibroína de seda e
membrana de celulose bacteriana para veiculação de extratos de
plantas medicinais / Fernando Batain. – 2018.
93 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2018.

1. Matéria médica vegetal – Uso terapêutico. 2. Plantas
medicinais. 3. Fitoterapia. 4. Biomateriais. I. Lopes, Luciane Cruz,
orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Fernando Batain

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE FIBROÍNA DE
SEDA E MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA VEÍCULAÇÃO DE
EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS**

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 07 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Pres. Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes
Universidade de Sorocaba

1º Exam. Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud
Universidade de Sorocaba

2º Exam. Profa. Dra. Amanda Gomes Marcelino Perez
Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me fortalecer e estar sempre ao meu lado me guiando e me dando força e determinação necessárias durante esta jornada e por me levantar diante das dificuldades e obstáculos e, as minhas queridas irmãs por estarem ao meu lado e acreditar no meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Sorocaba (UNISO) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por me oportunizar um aperfeiçoamento de excelência e por possibilitar o meu ingresso no programa de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

As empresas, BioTae Extratos Vegetais e Grupo Phytobios, pela doação dos extratos vegetais padronizados.

A todos aqueles que sempre confiaram em mim, a minha família e aos meus verdadeiros amigos.

A minha mãe (*in memoriam*), que onde quer que esteja, nunca deixou de me amar, nem mesmo sequer de confiar em mim. Mãe, meu amor eterno. As minhas queridas irmãs Célia e Ana pelo amor incondicional. Pois, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes pelo apoio e pelas preciosas oportunidades de crescimento profissional.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas da UNISO, em especial ao Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud, por compartilhar parte dos seus conhecimentos comigo durante este trajeto, que estarão para sempre em minha memória.

Agradeço imensamente a parceria dos professores Dr. Norberto Aranha e Dra. Angela F. Jozala, pela solidariedade perante minhas dificuldades no decorrer desta pesquisa; ao professor Dr. Daniel Komatsu, pelas sugestões e análises significativas neste trabalho.

A solicitude dos técnicos de laboratório, em especial a Profa. Ma. Valéria Orsi e Denicezar A. Baldo, e a atenção de todos os demais funcionários.

Aos amigos e amigas do programa de Pós-Graduação, pela paciência e companheirismo. Em especial, Marcia Rebelo, Thaís Alves e Carolina Santos, por me aconselharem e acreditarem em meu trabalho.

As amigas Sueli, Juliana, Liliam e Lauren, pelo carinho e amizade.

Aos amigos Venâncio e Edson, pelo apoio.

E aos queridos amigos que me acompanharam e sempre estiveram ao meu lado, em especial, Gisele Gabriel e Ricardo Segantin, por todo incentivo e companheirismo.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, divido a alegria desta experiência, meus sinceros e profundos agradecimentos.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas. ”

(Luís Fernando Verissimo)

RESUMO

ANTECEDENTES: *Aloe vera* (L.) Burm.f, *Matricaria recutita* L. e *Calendula officinalis* L. são plantas medicinais amplamente estudadas e com resultados promissores. Contudo, a falta de controle dos extratos vegetais afasta este recurso terapêutico da prática médica cotidiana. **OBJETIVO:** Projetar, desenvolver e caracterizar filmes de membrana de celulose bacteriana (mCB) e de filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda (FH-FS) contendo extratos vegetais padronizados de *A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita*. **MÉTODOS:** Para veiculação dos extratos vegetais foram preparadas membranas de celulose por biossíntese bacteriana e FH-FS. Os FH-FS foram preparados utilizando Polietilenoglicol 400 (PEG 400) previamente dissolvido em água (3%). Os extratos vegetais diluídos em água e incorporados em mCB e FH-FS foram avaliados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), propriedades mecânicas (tração e compressão), mucoadesão e perfil de liberação. A caracterização físico-química das mCB e dos FH-FS incorporados com extratos vegetais foram realizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). **RESULTADOS:** Os extratos vegetais de *A. vera* e *M. recutita* apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. O extrato de *C. officinalis* apresentou atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os extratos vegetais de *A. vera* e *C. officinalis* quando incorporados na mCB inibiram o crescimento para os mesmos microrganismos, exceto *E. coli*. As concentrações dos extratos utilizadas no FH-FS não foram suficientes para inibir o crescimento microbiano. A análise dos resultados de FTIR mostram que as propriedades físico-química dos extratos não foram alteradas na presença de mCB e FH-FS. Os eventos endotérmicos e exotérmicos observados nos FH-FS e mCB com extrato vegetal sugere uma leve redução da estabilidade físico-química quando comparados sem adição de extratos vegetais. A análise das propriedades fisiomecânicas e mucoadesão são alteradas na presença dos extratos vegetais. O perfil de liberação dos extratos é influenciado pelo veículo mCB ou FH-FS. A concentração final de PEG 400 nas formulações de FH-FS foi de 0,26%. **CONCLUSÃO:** A análise dos resultados obtidos neste estudo sugere que os FH podem ser utilizados como carreadores de extratos vegetais para fins medicinais de uso tópico.

Palavras-chave: Aloe. Calêndula. Matricaria. PEG. Fibroína. Celulose.

ABSTRACT

BACKGROUND: *Aloe vera* (L.) Burm.f, *Matricaria recutita* L. and *Calendula officinalis* L. are medicinal plants widely studied and with promising results. However, lack of control of plant extracts moves away this therapeutic resource from daily medical practice. **OBJECTIVE:** To design, develop and characterize BCM and SF films containing standardized plant extracts of *A. vera*, *C. officinalis* and *M. recutita*. **METHODS:** To diffusion of vegetables extracts were prepare cellulose membranes by bacterial biosynthesis and HF-SF. The HF-SF were prepared using Polyethylene glycol 400 (PEG 400) previously dissolved in water (3%). The vegetable extracts diluted in water and incorporated into BCM and HF-SF were evaluated to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), mechanical properties (traction and compression), mucoadhesion and release profile. The physicochemical characterization of BCM and HF-SF incorporated with the vegetable extracts was made by differential scanning calorimetry (DSC) and by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **RESULTS:** The vegetable extracts of *A. vera* and *M. recutita* showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The extract of *C. officinalis* presented activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The vegetable extracts of *A. vera* and *C. officinalis* when incorporated into BCM inhibited growth for the same microorganisms except *E. coli*. The concentrations of the extracts used in HF-SF were not sufficient to inhibit microbial growth. Analysis of the FTIR results showed that the physical-chemical properties of the extracts were not altered in the presence of BCM and HF-SF. The endothermic and exothermic events observed in HF-SF and BCM with vegetable extract suggests a light reduction of stability of physicochemical activity when compared without addition of vegetable extracts. The analysis of the physiomechanics properties and mucoadhesion are changed in the presence of vegetable extracts. The release profile of extracts is influenced by BCM or FH-FS. The final concentration of PEG 400 in formulations of HF-FS was 0.26%. **CONCLUSION:** The analysis of the results obtained in this study suggests that the HF can be used as carrier agents of vegetable extracts for medicinal purposes of use topic

Keywords: Aloe. Calendula. Matricaria. PEG. Fibroin. Cellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma	22
Figura 2	Plantação de <i>Aloe vera</i>	24
Figura 3	Flor <i>Calendula officinalis</i>	27
Figura 4	Inflorescência <i>Matricaria recutita</i>	28
Figura 5	Estrutura química fibroína de seda	32
Figura 6	Casulo bicho-da-seda	34
Figura 7	Membrana de celulose bacteriana	35
Figura 8	Estrutura química celulose bacteriana	35
Figura 9	Esquema do processo de extração da dispersão de FS	41
Figura 10	Esquema de diluição seriada dos microrganismos	43
Figura 11	Fluxograma da CIM dos extratos vegetais	44
Figura 12	Ilustração da incorporação dos extratos vegetais em FH-FS	45
Figura 13	Ilustração da incorporação dos extratos vegetais na mCB	46
Figura 14	Concentração da dispersão de FS em %	51
Figura 15	Teste de desafio da CIM	53
Figura 16	Capacidade de incorporação dos extratos vegetais em massa percentual das mCB avaliadas (n=6)	54
Figura 17	mCB obtida e incorporada com extratos vegetais	55
Figura 18	FH-FS obtido e incorporado com extratos vegetais	55
Figura 19	Difusão em ágar da mCB incorporada com extratos vegetais	57
Figura 20	Difusão da FH-FS incorporada com extratos vegetais	58
Figura 21	FTIR das amostras de FH-FS sem adição dos extratos vegetais	59
Figura 22	FTIR das amostras de FH-FS+extrato vegetal de <i>A.vera</i> +PEG400	61
Figura 23	FTIR das amostras de FH-FS+extrato vegetal de <i>C.officinalis</i> +PEG400	62
Figura 24	FTIR das amostras de FH-FS+extrato de <i>M.recutita</i> +PEG 400	63
Figura 25	FTIR da mCB + extrato de <i>Aloe vera</i>	64
Figura 26	FTIR da mCB + extrato de <i>M. recutita</i>	66
Figura 27	FTIR da mCB + extrato de <i>C. officinalis</i>	67
Figura 28	Termogramas das amostras de FH-FS	68
Figura 29	Termogramas das amostras de mCB	69
Figura 30	Média dos FH-FS obtidos em gramas (g)	70
Figura 31	Texturômetro	71
Figura 32	Foto ilustrativa do ensaio de tração mecânica	71
Figura 33	Média das propriedades fisiomecânicas dos FH-FS	72
Figura 34	Média mCB pura e com adição de extratos vegetais	74
Figura 35	Média mucoadesão FH-FS e mCB	75
Figura 36	Curva Analítica dos extratos vegetais	76
Figura 37	Média perfil de liberação dos extratos vegetais de AV e CO	77
Figura 38	Média perfil de liberação do extrato vegetal de MR	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituição química da <i>Aloe vera</i>	24
Tabela 2	Atividades farmacológicas atribuídas a compostos presentes na <i>Aloe vera</i>	25
Tabela 3	Constituição química da <i>Calendula officinalis</i>	26
Tabela 4	Aplicações da celulose bacteriana	34
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL das soluções de <i>A. vera</i> , <i>M. recutita</i> e <i>C. officinalis</i> contra os microrganismos <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	52
Tabela 6	Atividade antimicrobiana das membranas contendo extrato vegetal padronizado de <i>A. vera</i> , <i>C. officinalis</i> e <i>M. recutita</i> por meio do método da difusão em ágar	57
Tabela 7	Média das propriedades fisiomecânicas de FH-FS em triplicata	71
Tabela 8	Propriedades fisiomecânicas mCB	74
Tabela 9	Valores da equação da reta e coeficiente de regressão da curva analítica dos extratos vegetais analisados	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobiano
<i>A. vera</i>	<i>Aloe vera</i>
AV	<i>Aloe vera</i>
CCDD	Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
C=O	Grupo carbonila
<i>C. officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i>
CO	<i>Calendula officinalis</i>
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
FH	Filmes hidrogelatinosos
FS	Fibroína de Seda
FH-FS	Filmes Hidrogelatinosos de Fibroína de Seda
FTIR	Espectroscopia de infravermelho
<i>G. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
HI	Halo de Inibição
IC	Intervalo de Confiança
mCB	membrana de Celulose de Bacteriana
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>M. recutita</i>	<i>Matricaria recutita</i>
MR	<i>Matricaria recutita</i>
<i>mf</i>	Massa final
<i>mi</i>	Massa inicial
<i>n</i>	Número médio
NH ₂	Grupamentos amida primária
NT	Não teve halo de inibição
OH	Hidroxila
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEG 400	Polietilenoglicol 400

pH	potencial Hidrogeniônico
R	Resistente
Renisus	Relação Nacional de plantas de interesse ao Sistema Único de Saúde
RR	Razão de Risco
S	Sensível
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sódio dodecyl sulfato
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	<i>Trypticase soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UV/VIS	Ultravioleta e Visível
vas	Deformação Axial Assimétrica
vs	Deformação Axial Simétrica

LISTA DE UNIDADES E MEDIDAS

°C	Grau Celsius
μL	Microlitros
cm	Centímetros
Da	Dalton
g	Grama
h	Horas
Kg	Quilograma
L	Litros
mg	Miligrama
min.	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
m/v	Massa / volume
nm	Nanômetros
UFC	Unidade de Formação de Colônias
rpm	Rotação por minuto
v/v	Volume / volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
α	Alfa
β	Beta
Ω	Fase Ômega
H ₂ O	Fórmula química da água

SUMÁRIO

1	QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	DELINEAMENTO	21
4	ETAPAS DA PESQUISA	22
5	REFERENCIAL TEÓRICO	23
5.1	Plantas Medicinais	23
5.1.1	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	23
5.1.2	<i>Calendula officinalis</i> L.	25
5.1.3	<i>Matricaria recutita</i> L.	27
5.2	Polímeros empregados na preparação de filmes hidrogelatinosos	29
5.2.1	Biomateriais	29
5.2.2	Fibroína de Seda	31
5.2.3	Celulose Bacteriana	34
5.3	Polietilenoglicol (PEG)	36
6	AValiação Físico-Química	37
6.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	37
6.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	37
6.3	Propriedades mecânicas	38
6.4	Atividade antimicrobiana	38
6.5	Mecanismos para liberação de fármacos	39
6.5.1	Difusão	39
6.5.2	Erosão	39
7	MATERIAIS E MÉTODOS	40
7.1	Material	40
7.2	Métodos	40
7.2.1	Extração da Fibroína de Seda	40
7.2.2	Determinação do pH e da concentração de fibroína expressa em % (m/v)	42
7.3	Obtenção de membrana de Celulose Bacteriana	42
7.4	Ensaio microbiológicos	43
7.5	Incorporação e difusão em ágar dos extratos vegetais padronizados em FH-FS e mCB	45
7.6	Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)	47
7.7	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	48

7.8	Avaliação macroscópica.....	48
7.8.1	Propriedades fisiomecânicas.....	48
7.8.2	Propriedades mucoadesivas	49
7.8.3	Espectrofotometria em número de onda na região do UV e construção da curva analítica para os extratos vegetais	49
7.8.4	Perfil de liberação dos extratos vegetais incorporados em FH-FS e mCB.....	50
7.9	Análises estatísticas	50
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
8.1	Determinação do pH e concentração da dispersão de fibroína (m/v) expressa em %	51
8.2	Determinação da CIM dos extratos vegetais padronizados	52
8.3	Teste de desafio da concentração inibitória mínima (CIM).....	53
8.4	Incorporação de extratos vegetais em membranas de Celulose Bacteriana (mCB) e Fibroína de Seda (FS).....	54
8.5	Atividade antimicrobiana através da difusão de extratos vegetais padronizados incorporados em mCB e FH-FS	55
8.6	Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	59
8.7	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	67
8.8	Avaliação macroscópica.....	70
8.9	Propriedades fisiomecânicas	70
8.10	Propriedades mucoadesivas	74
8.11	Espectrofotometria em número de onda na região UV e construção da curva analítica para os extratos vegetais.....	76
8.12	Perfil de liberação dos extratos vegetais incorporados em FH-FS.....	77
9	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – ALOE VERA	91
	ANEXO B – CALENDULA OFFICINALIS	92
	ANEXO C – MATRICARIA RECUTITA.....	93

1 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Aloe vera (L.) Burm.f., *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. pertencem a lista de produtos tradicionais fitoterápicos com registro simplificado nas Instruções Normativas 05/2008 e 02/2014 da Agência Nacional Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008; 2014), estes fitoterápicos são indicados para tratamento de queimaduras de primeiro e segundo grau devido suas atividades cicatrizante e anti-inflamatória de uso tópico.

Estas plantas medicinais pertencem a Relação Nacional de Plantas de interesse para o Sistema Único de Saúde (Renisus) e estão inseridas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com prioridade nas políticas de avanço e inovação tecnológica no Brasil.

Revisão sistemática realizada por Dat et al. (2012) incluindo 347 pacientes, analisou a utilização de produtos contendo *Aloe vera*, na forma de gel, na cicatrização de feridas agudas (por exemplo, lacerações, incisões cirúrgicas e queimaduras) e feridas crônicas (por exemplo, feridas infectadas, arterial e úlceras venosas). Dos sete trabalhos incluídos nesta revisão, cinco ensaios clínicos avaliaram o efeito da *Aloe vera* em feridas agudas por queimaduras, pacientes com hemorroidectomia e biópsia de pele. O uso da mucilagem de *Aloe vera* não foi melhor que a sulfadiazina de prata 1% para a cicatrização de queimadura (razão de risco (RR) 1,41, 95% de intervalo de confiança (IC) 0,70-2,85). Em pessoas com feridas crônicas, um estudo não encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na cicatrização de úlceras de pressão com *Aloe vera* (RR 0,10, IC 95% -1,59 a 1,79). Estudos incluídos na revisão sistemática indicam que os resultados dos ensaios devem ser vistos de forma crítica (DAT et al., 2012).

Estudo clínico envolvendo 30 pacientes com queimaduras de segundo grau, mostra que o emprego da *Aloe vera* a 15% na forma de gel leva metade do tempo para cicatrização de queimaduras de segundo grau quando comparado à sulfadiazina de prata 1% (MOGHBEL; GHALAMBOR; ALLIPANAH, 2007). Estudos utilizando formas farmacêuticas inovadoras e extrato vegetal padronizado podem mostrar resultados mais eficazes, com melhor índice de confiabilidade e facilidade para transposição de escala.

Calendula officinalis foi testada, também em ensaio, utilizando óleo de calendula 4%, vitamina A 1% e vaselina líquida prevenindo e/ou retardando o desenvolvimento de queimadura por radiação ionizante (SCHNEIDER; DANSKI; VAYEGO, 2015).

A aplicação tópica durante 14 dias, de *M. recutita* em ratos submetidos à lesão na língua induzida por bisturi apresentou cicatrização mais rápida que o tratamento com corticosteroide tópico (MARTINS et al., 2009). O uso da *M. recutita* preparada a partir das inflorescências

maceradas em azeite foi testada em modelo animal de queimadura no dorso por escaldamento em água fervente resultando em maior cicatrização comparado ao controle negativo (JARRAHI, 2008).

Apesar das indicações terapêuticas, dos resultados positivos em estudos pré-clínico e clínico e do reconhecimento do governo brasileiro destas plantas medicinais como insumos estratégicos para fabricação de medicamentos nenhum produto derivado destes extratos é encontrado na prática clínica. Este fato pode ser decorrente da ausência de forma farmacêutica devidamente padronizada de produtos farmacêuticos com tecnologia diferenciada que estimule a fabricação industrial e a prescrição clínica.

A incorporação destes extratos vegetais em filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda (FH-FS) ou em membrana de celulose bacteriana (mCB) são promissores pois além de agregar tecnologia inovadora sugerem potencializar a ação medicinal destas espécies vegetais e seu uso na regeneração de tecido cutâneo ulcerado.

Estudos dos efeitos de extratos vegetais padronizados obtidos a partir de *A. vera*, *M. recutita* e *C. officinalis* incorporados em FH-FS e mCB até o momento não foram feitos, pelo qual, a obtenção e avaliação destes produtos constitui uma alternativa a ser investigada.

Os polímeros de origem natural e biotecnológico são promissores para aplicações na área biomédica e, sobretudo para a medicina regenerativa (LIU et al., 2010). Entre os polímeros mais promissores destacam-se a fibroína de seda (FS) e a membrana de celulose bacteriana (mCB) (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014; DONINI et al., 2010). Tais produtos, denominados de biopolímeros, vem sendo pesquisados para aperfeiçoar e acelerar o processo de regeneração de tecidos danificados por queimaduras, doenças ou traumatismos.

A fibroína de seda (FS) é uma proteína obtida a partir do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) que apresenta potenciais aplicabilidades como filmes na área médica devido à resistência a microrganismos, permeabilidade a oxigênio e vapor de água, reduzida reação inflamatória, podendo ser produzida nas formas de filmes, esponjas e géis (GE et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2010; KUNDU, 2014).

Outro tipo de biopolímero que ganha espaço como produto farmacêutico, é a membrana de celulose bacteriana (mCB) obtida por biossíntese. A celulose é o mais abundante biopolímero encontrado na natureza, componente da parede celular de plantas e bactérias (RECOUVREUX, 2004) possui alta resistência à tração mecânica e a possibilidade de incorporação de outros componentes para obtenção de compósitos. Tendo em vista suas inúmeras aplicações e seu caráter sustentável é oportuna a comparação entre a celulose bacteriana e vegetal. Obtendo-se através da celulose bacteriana um produto com elevada aplicabilidade industrial, versátil, econômica e ecologicamente correta quando comparada com a celulose vegetal (DONINI et al., 2010).

Não menos importante que os sistemas de liberação é a forma de veiculação dos compostos ativos. Neste estudo a proposta é veicular os sistemas de liberação em hidrogéis com propriedades bio (muco) adesivos que possam ser aplicados em lesões abertas por perdas de tecidos ou em cavidades ulceradas. Formulações com estas propriedades são capazes de prolongar a permanência dos sistemas de liberação no local de aplicação, seja por interações físicas ou químicas com o tecido, seja por facilitar a aplicação do produto na forma líquida para uma transição sol-gel controlada pela temperatura corpórea.

Os polímeros biocompatíveis e bioadesivos são candidatos potenciais para veiculação, liberação modificada de fármacos, terapia celular e engenharia de tecidos (MATANOVIĆ; KRISTL; GRABNAR, 2014).

Com o aumento da expectativa de vida e da sobrevida de pacientes com doenças crônicas, uma maior demanda para a ampliação de novas estratégias de reparo de tecidos orgânicos danificados ou de novos tratamentos tem sido necessária.

Considerando a importância de tais espécies vegetais no cenário nacional, o desenvolvimento promissor de formas farmacêuticas que possam melhorar a eficácia dos extratos incorporados em biopolímeros e a falta de estudo mais pertinentes, este projeto se propõe a iniciar a evolução de produtos contendo extrato vegetal padronizado das espécies selecionadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Projetar, desenvolver e caracterizar filmes hidrogelatinosos a base de fibroína de seda e membrana de celulose bacteriana incorporados com extratos vegetais padronizados de *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L.

2.2 Específicos

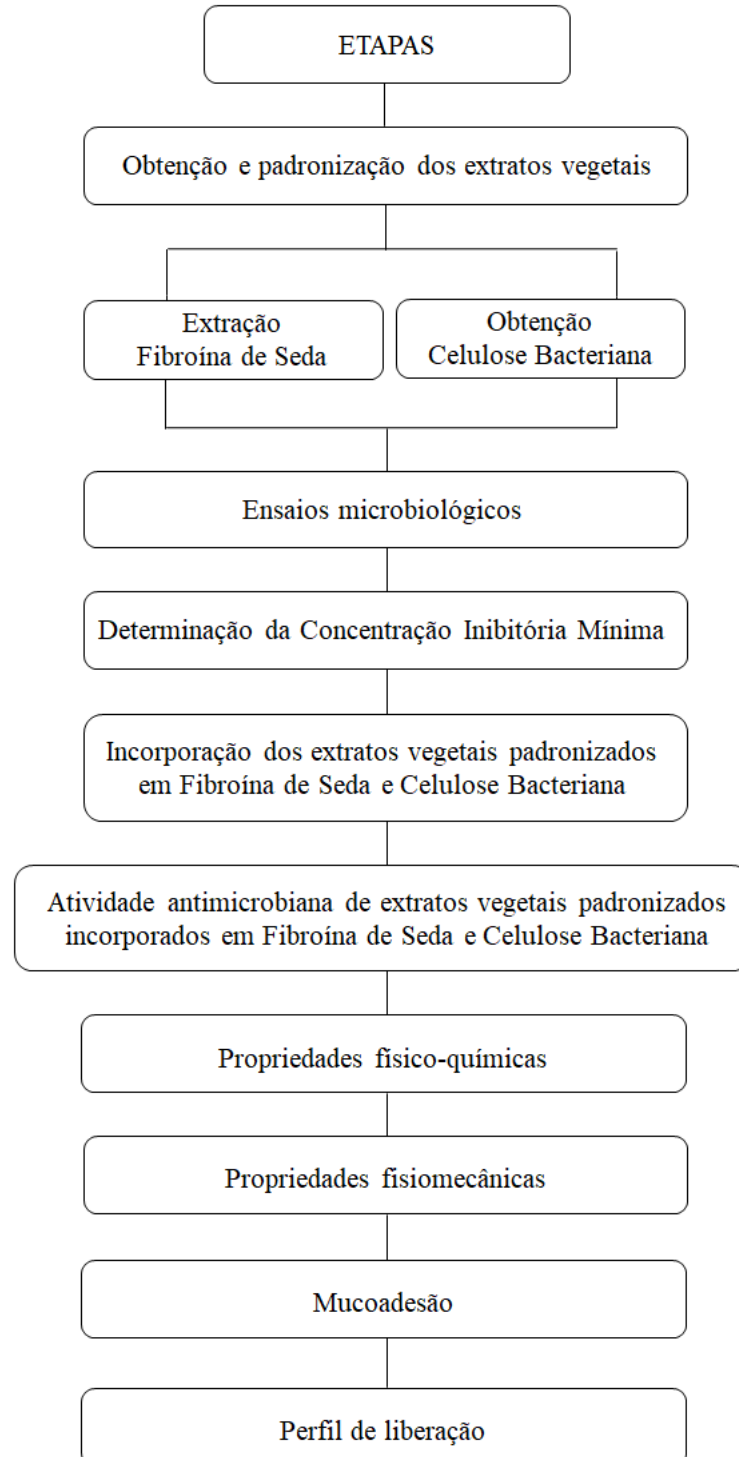
- Determinar a atividade antimicrobiana usando técnica de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais padronizados isolados e incorporados em filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda (FH-FS) e membrana de celulose bacteriana (mCB).
- Determinar as propriedades fisiomecânicas e mucoadesivas “*in vitro*” de FH-FS ou mCB.
- Delinear o perfil de liberação dos extratos vegetais veiculados nos FH-FS e mCB.

3 DELINEAMENTO

Este estudo tem caráter experimental para desenvolvimento de filmes hidrogelatinosos a base de fibroína de seda (FH-FS) e de membrana de celulose bacteriana (mCB) para incorporação de extratos vegetais de *A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita*. Os filmes foram caracterizados pelas suas propriedades fisiomecânicas, mucoadesão, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e perfil de liberação.

4 ETAPAS DA PESQUISA

Figura 1 – Fluxograma



Fonte: Elaboração própria.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Plantas Medicinais

Plantas medicinais são espécies vegetais utilizadas com propriedades terapêuticas e têm grande importância na área da saúde. A disponibilização de plantas medicinais e fitoterápicos pelo SUS (Sistema Único de Saúde) tem promovido o uso da fitoterapia pela população (LORENZI; MATOS, 2008).

A Renisus (Relação Nacional de plantas de interesse ao Sistema Único de Saúde) subsidia o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos, bem como, apresenta espécies vegetais medicinais de interesse para o SUS que são usadas pela população para diferentes finalidades terapêuticas.

As espécies descritas na Renisus e usada no presente estudo foram selecionadas por suas propriedades terapêuticas fartamente discutida na literatura: *Aloe vera*, *Calendula officinalis* e *Matricaria recutita*.

5.1.1 *Aloe vera* (L.) Burm.f.

A *Aloe vera* (L.) Burm.f. é popularmente conhecida no Brasil como babosa, originária da África, utilizada por suas propriedades terapêuticas e medicinais. O extrato do parênquima de reserva desta planta, denominado gel de *A. vera*, apresenta uma gama de compostos que possuem atividades farmacológicas de relevância medicinal (GODINHO, 2014) tais como anti-inflamatória, bactericida, protetora da pele e cicatrizante (SANTOS, 2017).

Estudos *in vivo* do gel de *A. vera* (Figura 2) concluíram que sua cicatrização é promovida por estimulação direta de macrófagos e fibroblastos e, seus efeitos terapêuticos incluem prevenção da isquemia dérmica progressiva causada por queimaduras; ulcerações causadas pelo frio; queimadura elétrica e por radiação (BRASIL, 2016).

Ao longo dos anos diversas atividades biológicas foram atribuídas a *A. vera*, e isso possivelmente se deve a combinação dos variados ativos existentes em sua composição, os quais são demonstrados na Tabela 1. Por isto, são necessários estudos para que seja definida dose e forma segura para o seu uso; diante da importância de preservar suas características químicas relevantes para a padronização do uso da *A. vera* (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014).

Figura 2 – Plantação de *Aloe vera*

Fonte: <http://portals7.gomembers.com/iasc/JoinIASC.aspx>

Tabela 1 - Constituição química da *Aloe vera*

Classe	Compostos
Carboidratos	Manano puro, manano acetilado, glucomanano acetilado, glucogalactomannano, galactano, galactogalacturano, arabinogalactano, galactoglucoarabinomanano, celulose
Enzimas	Fosfatase alcalina, amilase, carboxipeptidase, catalase, ciclooxygenase, lipase, oxidase, fosfoenolpiruvato carboxilase, superóxido dismutase
Compostos inorgânicos	Cálcio, cloro, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, fósforo, sódio, zinco
Lipídeos e outros compostos orgânicos	Ácido araquidônico, ácido γ -linolênico, esteróides (campesterol, colesterol, β -sitosterol), triglicerídeos, triterpenoides, ligninas, sorbato de potássio, ácido salicílico, ácido úrico
Aminoácidos não essenciais e essenciais	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina
Proteínas	Substância de lectina
Sacarídeos	Manose, glicose, L- Rhamnose, aldopentose
Vitaminas	B1, B2, B6, C, β - caroteno, colina, ácido fólico, α - tocoferol

Fonte: Adaptado de Hamman, 2008.

O uso tópico da *A. vera* fornece mais oxigênio, ampliando a vascularização e a quantidade de colágeno para que a cicatrização ocorra, além de desinflamar o tecido e multiplicar as células epiteliais (DE PAULA RAMOS; PIMENTEL, 2013).

As principais propriedades farmacológicas da *A. vera* são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades farmacológicas atribuídas a compostos presentes na *Aloe vera*

Compostos	Atividade farmacológica
Glicoproteína	Cicatrização de feridas, proliferação celular, antialérgico
Barbalóina	Purgativa
Aloe-emodina; Emodina	Purgativa; promoção da proliferação celular; antitumoral; antimicrobiano; antiprotozoários; antioxidante.
Aloesina	Promoção da proliferação celular; inibição da síntese de melatonina
Acemannan	Imunomodulação; antimicrobiana, antitumoral
β -sitosterol	Anti-inflamatório; promotor da angiogênese
Dietilexilftalato	Anticancerígeno
Manose-6-fosfato	Cicatrização; anti-inflamatório
Polissacarídeos	Anticâncer; imunomodulador

Fonte: Adaptado de Choi; Chung, 2003.

O gel de *A. vera* é composto por aproximadamente 99,5% de água. Porém, outras substâncias já foram identificadas como uma combinação de polissacarídeos e derivados acetilados de polissacarídeos, glicoproteínas, antraquinonas, flavonóides, taninos, esteroide, aminoácidos, enzimas, saponinas, proteínas, vitaminas e minerais como ferro, potássio, manganês e sódio (PARENTE et al., 2013).

A planta medicinal *A. vera* tem sido utilizada tanto para uso interno quanto externo. Sua utilização também tem sido como material de base na fabricação de cremes, loções, sabonetes, xampus, produtos de limpeza facial entre outros (HAMMAN, 2008), pois o gel da *A. vera* é muito conhecido pela sua ação hidratante (CHANG et al., 2006). Na indústria farmacêutica, sua utilização tem sido para produtos de uso tópico como pomadas e preparações em gel. O gel pode ser empregado para tornar biodisponíveis medicamentos que são mal absorvidos através da administração via oral (HAMMAN, 2008). Outra utilidade da *A. vera* se dá como recurso para área alimentícia, em particular para preparação de bebidas saudáveis que contém o gel de aloe, porém sem causar efeito laxante, ela também pode ser encontrada numa variedade de produtos como sumos, comprimidos e assim por diante (DA SILVA et al., 2013; GARCIA-SEGOVIA et al., 2010; HAMMAN, 2008; HE et al., 2005).

5.1.2 *Calendula officinalis* L.

A espécie *Calendula officinalis* L., planta herbácea pertencente à família *Asteraceae*, possui flores amarelas ou douradas. Nas flores de calêndula foi encontrado óleo volátil, carotenoides, flavonóides. Algumas de suas atividades farmacológicas incluem ação anti-

inflamatória, antioxidante, imunoestimulante, cicatrização de feridas, antibacteriana e antifúngica (KHALID; DA SILVA, 2012).

Por suas atividades farmacológicas, o fitoterápico é indicado em casos de inflamação da pele, queimaduras suaves, escaras e no tratamento de feridas de difícil cicatrização (TESKE; TRENTINI, 2001). Grande parte dos estudos clínicos envolvem o uso tópico de fórmulas farmacêuticas a base de *C. officinalis*, os quais recomendam seu uso por duas ou três vezes ao dia, até melhora dos sintomas (BARNES et al., 2007).

A parte de interesse farmacológico do material vegetal são os ligulados e as flores compostas (WHO, 2002).

A constituição química da *C. officinalis*, apresentada na Tabela 3, também demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* principalmente para bactérias gram-positivas como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus* (PARENTE et al., 2009).

Tabela 3 - Constituição química da *Calendula officinalis*

Calendina	Saponinas
Ácidos graxos	Fenólicos
Esteroides	Carotenoides
Mucilagens	Ácido salicílico
Taninos	Flavonóides

Fonte: Adaptado de Parente et al., 2002.

Os flavonóides, parte da composição química da *C. officinalis*, são um dos constituintes mais pesquisados, devido sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante (KURKIN; SHAROVA, 2007; MENÉNDEZ et al., 2007). Todos os flavonóides compartilham o processo de biossíntese, o que, sob a ótica química, quer dizer que são compostos estruturados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono. Sendo, subdivididos, basicamente, como flavonol, flavona, catequina, antocianidina e isoflavonoide (GUARDIA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2007).

Os flavonóides são considerados marcadores das flores de *Calendula officinalis* L., e em sua maioria são representados pelos compostos rutina e quercetina (RODRIGUES; GONÇALVES; SILVA, 2004; PAIM, et al., 2010).

A rutina é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que possui propriedades terapêuticas como a promoção de efeitos benéficos em doenças, como a peroxidação lipídica descontrolada, eliminar radicais livres como antioxidante, entre outras atividades farmacológicas descritas, como seu efeito sobre o sistema imunológico e células inflamatórias (PEDRIALI, 2005; ROLIM, et al., 2005; VELASCO et al., 2008). Essa abundância de

propriedades farmacológicas da rutina justifica a vasta utilização em produtos fitocosméticos, cosméticos e fitoterápicos (PEDRIALI, 2005).

Figura 3– Flor *Calendula officinalis*



Fonte: <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/calendula-officinalis/>

A calendula pode ser encontrada durante o ano todo, o que torna sua obtenção mais fácil. Sua forma de uso engloba os mais diferentes veículos, sendo a tintura um dos mais utilizados (GAZOLA; FREITAS; BATISTA EVANGELISTA-COIMBRA, 2014).

5.1.3 *Matricaria recutita* L.

A *Matricaria recutita* L. é uma planta herbácea pertencente à família *Asteraceae*. Uma erva rasteira, pouco resistente e muito ramificada que cresce de vinte a cinquenta centímetros de altura. Sua reprodução acontece por meio de sementes, desenvolvendo-se melhor em clima temperado. Além disso, ela apresenta características antiespasmódica, calmante, cicatrizante, emoliente, refrescante, antisséptica, antialérgica e anti-inflamatória (SILVA et al., 2012a).

Suas propriedades farmacológicas deve-se à presença de óleos essenciais, flavonóides, cumarinas, colinas, aminoácidos, ácidos graxos, sais minerais, terpenos, mucilagens e ácidos orgânicos armazenados em tricomas glandulares peltados partilhados nos capítulos florais (AMARAL et al., 2008; FRANKE; SCHILCHER, 2005).

Sua flor possui altos índices de flavonóides, principalmente a apigenina, cuja ação farmacológica e qualidade de seu extrato água-álcool variam dependendo da sua concentração (MENESES-REYES et al., 2008). Sendo, o óleo essencial e os flavonóides os de maior importância para fins medicinais (FRANKE; SCHILCHER, 2005).

Industrialmente a infusão dos capítulos florais ou o próprio óleo essencial são usados em preparações farmacêuticas de uso tópico, como pomadas e cremes indicados para cicatrização da pele; fármacos que auxiliem no alívio da inflamação das mucosas orais, antiviróticos para tratamento do herpes e especialmente para extração da essência, que possui utilidade como aromatizante na composição de sabonetes, perfumes, xampus e loções, tal como para conferir melhor odor e sabor a uma diversificada série de alimentos (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 4 – Inflorescência *Matricaria recutita*



Fonte: <http://thescienceofacne.com/chamomile/>

Os constituintes químicos presentes na *M. recutita* são classificados conforme sua fração lipofílica e hidrofílica, os quais são responsáveis pela atividade terapêutica da planta. Óleo essencial e cumarinas pertencem a fração lipofílica. Já os flavonóides, mucilagem, ácidos orgânicos, aminoácidos e colina pertencem a fração hidrofílica (TESKE; TRENTINI, 2001; FRANKE; SCHILCHER, 2005).

O alfa-bisabolol e o camazuleno são os componentes principais do óleo essencial de camomila, sendo a matricina um composto instável, formado pela decomposição do camazuleno (FRANKE; SCHILCHER, 2005).

Os constituintes químicos dos flavonóides, hidrossolúveis da planta, sendo responsáveis por mais de 8% do seu peso seco, são a apigenina, luteolina e quercetina. Sendo, a apigenina a primeira flavona isolada da *M. recutita*. Os flavonóides possuem atividade anti-inflamatória, carminativa e antiespasmódica (TESKE; TRENTINI, 2001; FRANKE; SCHILCHER, 2005; ROSS, 2008).

Através das flores da camomila são obtidos extratos aquoso e alcoólico, sendo utilizados por suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antiespasmódica. Sua propriedade anti-inflamatória vem sendo testada *in vitro*, em animais e seres humanos (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

5.2 Polímeros empregados na preparação de filmes hidrogelatinosos

5.2.1 Biomateriais

Polímeros de origem natural são promissores para aplicações na área biomédica e, sobretudo para a medicina regenerativa. Tais produtos, denominados de biopolímeros, vem sendo pesquisados para aperfeiçoar e acelerar o processo de regeneração de tecidos danificados por doenças e traumatismos (LIU et al., 2010). Polímeros termorresponsíveis com propriedades biocompatível e bioadesiva são candidatos potenciais para veiculação e liberação modificada de fármacos, bem como para aplicação na terapia celular e engenharia de tecidos (MATANOVIĆ; KRISTL; GRABNAR, 2014).

Composto por moléculas orgânicas versáteis e, com propriedades para uso em instrumentos cirúrgicos, dispositivos implantáveis, revestimentos do dispositivo, cateteres, enxertos vasculares, biomateriais injetáveis e, agentes terapêuticos, os polímeros são a mais ampla classificação de biomateriais. Baixo custo, facilidade de fabricação e versatilidade são algumas das vantagens da utilização dos polímeros (BINYAMIN; SHAFI; MERY, 2006).

Redes poliméricas tridimensionais que absorvem enorme quantidade de água sem se diluir são conhecidas como hidrogéis. A rede polimérica mantém sua integridade mesmo durante o estado intumescido por pontos de reticulação. Porém, na falta destes pontos, as cadeias poliméricas hidrofílicas lineares diluem-se em água, devido sua similaridade termodinâmica das cadeias de polímero e água. Contudo, a existência de pontos de reticulação na rede faz com que a hidratação seja contrabalanceada pela força de retração da rede levando a um limite na absorção de água pelo hidrogel (MOLINA; RIVAROLA; BARBERO, 2012).

Uma das características mais importantes dos hidrogéis é a evidente quantidade de água que eles possuem em sua superfície e estrutura interna, o que faz com que se pareçam muito com tecidos vivos. A presença dessa grande quantidade de água na superfície diminui a energia interfacial livre num ambiente fisiológico e, logo, melhora as suas propriedades biológicas, tornando-os mais biocompatíveis (PATEL; MEQUANINT, 2011). Tais características e

semelhança nas propriedades físicas e mecânicas levam os filmes hidrogelatinosos (FH) a diversas aplicações em áreas farmacêuticas e biomédicas (TIBBITT; ANSETH, 2009).

Seguros para o uso humano, os FH são formas farmacêuticas sólidas, sendo, em geral, membranas poliméricas com 1 mm de espessura e área de 6 cm². Os FH devem ser estáveis à umidade, flexíveis e apresentar resistência adequada à tração (ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012).

Biomateriais são materiais projetados para reconstituir partes ou funções do corpo humano, desempenhando funções em contato com tecidos vivos. Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética (MARK; CALVERT, 1994).

Os biomateriais poliméricos foram desenvolvidos para serem utilizados, não apenas, como substitutos de tecidos lesados, mas também para o entendimento destes com o organismo receptor (SANTOS JUNIOR, 2001).

A aplicação dos biomateriais, durante anos, tem sido para substituição da lente intraocular e obturações dentárias, porém os avanços em biologia celular e molecular, química, ciência dos materiais e engenharia têm proporcionado oportunidades mais amplas para uso clínico (KEANE; BADYLAK, 2014).

Os biomateriais podem ser usados como válvulas artificiais no coração, implantes de substituição nos ombros, joelhos, cotovelos, orelhas e dentes e ainda, como simulador cardíaco e para a reconstrução do trato urinário (GEETHA et al., 2009).

Antes de selecionar o biomaterial a ser aplicado, deve-se considerar suas similaridades físicas, químicas e biológicas com o tecido a ser substituído (BINYAMIN; SHAFI; MERY, 2006), pois a biocompatibilidade é um dos requisitos básicos para realizar a reparação de tecidos (WANG, 2016) já que, sua biocompatibilidade refere-se à capacidade do material em estimular uma resposta adequada no tecido hospedeiro em uma situação específica (WILLIAMS, 2008).

Por seu comportamento biocompatível e biodegradável, os biomateriais poliméricos de origem natural vem se destacando em relação aos sintéticos. Além disso, os materiais de base natural constantemente dispõem de estruturas altamente organizadas e que podem conter uma substância extracelular chamada ligante, indispensável para se ligarem com receptores celulares (SWETHA et al., 2010).

A classificação dos polímeros pode ser elencada como:

- Materiais de base natural – polissacarídeos (amido, alginato, quitina / quitosana, ácido hialurônico) ou proteínas (soja, colágeno, fibrina, seda) (ARMENTANO et al., 2010).

- Sintéticos – obtidos pela polimerização de monômeros de base biológica, como o ácido polilático, succinato de polibutileno, polietileno e polihidroxialcanoatos - microbianamente fermentado (SALERNO; PASCUAL, 2015).

A seda é um material qualificado para uso em produtos farmacêuticos, biomédicos, cosméticos e têxteis. Seus dois componentes principais são: a fibroína - uma proteína fibrosa e insolúvel em água -; e a sericina - uma proteína globular que é solúvel em água. Ambas dispõem de propriedades que as tornam importantes polímeros naturais com uma variedade de aplicações, incluindo biomateriais (CAPAR; AYGUN; GECIT, 2008).

Os biomateriais passaram por três gerações, sendo a primeira em 1950, onde o seu conceito era de materiais bioinertes, ou seja, com mínima interação e reação. Em 1980 inicia-se a segunda geração, com base no conceito de bioatividade, reabsorção e reação controlada por meio fisiológico. Nos anos 2000, surge a terceira geração que é baseada no conceito de biointerativos, com regeneração tecidual funcional, reabsorção, estímulos específicos, proliferação, diferenciação e organização (HENCH; POLAK, 2002).

5.2.2 Fibroína de Seda

A fibroína é uma proteína que está presente nos fios da seda. Atualmente, diversos pesquisadores têm investigado ela como um meio promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua resistência mecânica, biocompatibilidade e mínima ação inflamatória. Baseado nessas características, outras aplicações foram propostas, como proteção de feridas, substrato para cultura celular, imobilização enzimática e operador de liberação moderada de drogas (NOGUEIRA; BEPPU, 2005).

A fibra têxtil mais usada é a secretada pelos insetos pertencentes à família *Bombycidae* da mariposa *Bombyx mori*. Diferente de outras espécies, o *Bombyx mori* não sobrevive sozinho no ambiente. Por isso, sua criação deve ser realizada em ambiente fechado. Durante sua vida, o *Bombyx mori* passa por quatro estágios, são eles: ovo, larva, crisália e mariposa (PADAMWAR et al., 2005).

Nascida do ovo, a larva pesa menos de 0,5 mg. Sua alimentação, a base de folhas de amoreira, auxiliam para seu crescimento que, após esse período inicia a construção do casulo. Para a formação do casulo a larva secreta dois componentes principais: a fibroína e a sericina (HOLANDA; MATA; LIMA, 2004).

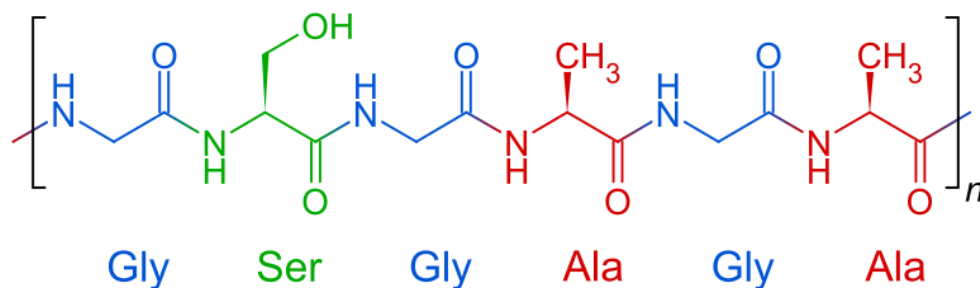
O casulo produzido pelo inseto, do qual o fio da seda é extraído, exibe alto teor de proteínas que são produzidas por um par de glândulas chamadas sericígenas (DOS SANTOS; VIDIGAL; MERLINI, 2011).

Para que a fibroína seja utilizada na área biotecnológica para reparação e regeneração tecidual, primeiro, deve-se obter uma dispersão de fibroína, com posterior apresentação em filme, membrana ou gel, conforme aplicação. Para separação da fibroína da sericina, utiliza-se um processo chamado degomagem. Neste processo, para manter as fibras estáveis, os casulos do bicho-da-seda são imersos em soluções alcalinas ou em água fervente (ALTMAN et al., 2003).

Na estrutura da fibroína, coexistem dois domínios, são eles: 1) amorfo ou seda I; 2) cristalino ou seda II. O segundo, é composto por uma série de repetições de alanina e glicina, conectados pelos aminoácidos serina ou tirosina. A porção cristalina da fibroína contém uma estrutura secundária em folha- β , o que confere à proteína características como resistência a tração por exemplo (ALTMAN et al., 2003).

Solúvel em água, a seda I apresenta conformação estrutural do tipo α -hélice podendo ser convertida em seda II por influência de calor. A forma hidrofóbica e termodinamicamente estável da fibroína é a seda II, reconhecida por apresentar a conformação folha- β . Este tipo de estrutura apresenta conformação assimétrica, com o predomínio de cadeias laterais de hidrogênio decorrentes dos grupamentos glicina e, outro lado ocupado com cadeias laterais de grupos metil, provenientes das alaninas, que ocupam esta região e concedem um domínio hidrofóbico. Fortes ligações de hidrogênio e forças de van der Waals geram uma estrutura termodinamicamente estável na conformação folha- β da fibroína (VEPARI; KAPLAN, 2007).

Figura 5 – Estrutura química fibroína de seda



Fonte: <http://www.wikiwand.com/gl/Fibro%C3%ADna>

Em sua composição, a fibroína de seda (FS) possui enorme quantidade de proteínas com grupos amino ($-NH_2$) e que podem ser investigados como sítios ativos para ligar nanopartículas metálicas e/ou para possibilitar a redução de íons metálicos aos seus respectivos metais, além de estabilizar partículas produzidas. Tais propriedades proporcionam o uso deste biopolímero na síntese de nanopartículas metálicas e aquisição de compósitos fibroína/metál (SASHINA et al., 2009).

Compreender o processo de gelificação da dispersão de FS é importante para a promoção de materiais a base desta proteína. Os solventes tradicionalmente empregados para diluição da FS possuem larga quantidade de sais (CHEN et al., 2001). E, são os sais que preservam a estabilidade da solução impossibilitando a precipitação da proteína. Porém, para aquisição de filmes, membranas ou hidrogéis de FS, parte desses sais devem ser removidos. O procedimento mais usado para isto é a diálise da solução de fibroína empregando uma membrana semipermeável que possibilita a difusão dos íons por osmose. No entanto, conforme as condições da diálise como o tipo e a concentração da fibroína, o solvente e o pH da solução, a gelificação ocorrerá de forma mais ou menos favorecida (ZHOU et al., 2006; KIM et al., 2004).

O tempo e a temperatura de diálise são parâmetros de grande importância pois, eles determinarão as propriedades dos materiais derivados de FS tais como filmes, membranas ou hidrogéis. Soluções dialisadas de FS podem ser vertidas em placas de petri para formação de membranas. A formação dessa membrana pode percorrer caminhos diferentes como, por exemplo, o solvente é evaporado e há a formação de um filme na superfície da placa, ou a solução de fibroína está instável e ao ser vertida na placa de petri a mesma gelifica. O gel vertido na placa sofre perda de água com o tempo e vem a se tornar um filme de fibroína. Contudo, observações experimentais revelaram que filmes decorrentes da secagem do gel de FS são surpreendentemente voláteis e não perduram nem mesmo ao manuseio, ao passo que os filmes adquiridos pela secagem da dispersão de FS são resistentes. Com tal característica, é recomendado a precaução em cessar o processo de diálise antes que a dispersão de fibroína torne-se instável (NOGUEIRA et al., 2011).

A produção de seda no Brasil é focada na área têxtil, o que gera, anualmente, uma quantidade grande de resíduos durante o processamento das fibras de seda. Por isto, a possibilidade de produzir materiais derivados de seda a partir de fibras de seda residual é uma opção ambientalmente amigável e economicamente interessante ao uso tradicional de casulos de bichos-da-seda, com o propósito de obter produtos de valor agregado com aplicações biotecnológicas (BEXIGA et al., 2017).

Figura 6 – Casulo bicho-da-seda

Fonte: <https://pixabay.com/pt/casulo-bicho-da-seda-seda-fatiado-196533/>

5.2.3 Celulose Bacteriana

Apesar de possuir uma estrutura química semelhante à da celulose a base de plantas, a celulose bacteriana (Figura 7) se diferencia por sua obtenção que é realizada por meio da bactéria *Acetobacter xylinum* (*Glucanoacetobacter xylinus*), um microrganismo gram-negativo (KLEMM et al., 2005; BARUD et al., 2011). Suas propriedades físico-químicas são a cristalinidade, alta resistência à tração, alta capacidade de absorção de água, resistência à degradação, baixa solubilidade, boa permeabilidade e biocompatibilidade (HELENIUS et al., 2006). Considerando essas propriedades, a celulose de origem bacteriana, produzida na superfície de caldos de cultivo, por seu potencial para o uso, não apenas na medicina, mas na engenharia de tecidos e na cosmética, nos últimos anos tem causado grande interesse na área de pesquisa, os quais são apresentados na Tabela 4 (ANTONIO et al., 2012).

Tabela 4 – Aplicações da celulose bacteriana

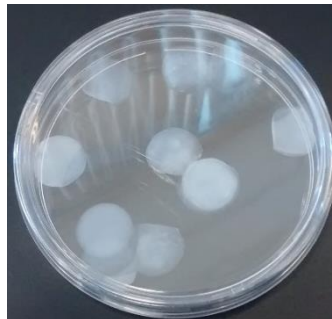
ÁREA	APLICAÇÃO
Cosméticos	Estabilizador de emulsões como cremes tônicos, condicionadores, polidores de unhas.
Indústria têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos de camping.
Mineração e refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, materiais para absorção de toxinas.
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos.
Purificação de esgotos	Purificação de esgotos urbanos, ultra filtração de água.
Comunicações	Diafragmas para microfones e fones estéreos.
Indústria de alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”).
Indústria de papel	Substituição artificial de madeira, papéis especiais.
Medicina	Pele artificial temporária para queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários.
Laboratórios	Imobilização de proteínas de células, técnicas cromatográficas, meio para cultura de tecidos.
Eletrônica	Materiais opto-eletrônicos (telas de cristal líquido, suporte para OLED).
Energia	Membranas célula combustível (paládio).

Fonte: Adaptado de Donini et al., 2010.

Sua estrutura porosa permite que antibióticos ou outros ativos farmacêuticos sejam transferidos para a ferida, além de servir como uma barreira física para agentes externos que poderiam causar infecções (FU; ZHANG; YANG, 2013).

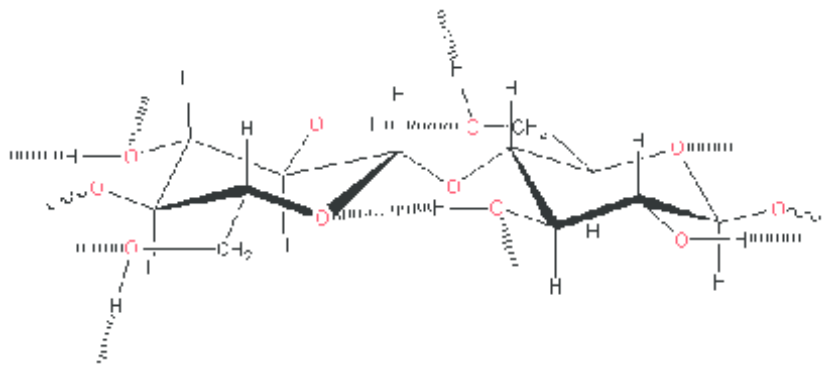
Os curativos com celulose bacteriana possuem fácil remoção, evitando novos traumas na lesão (FU; ZHANG; YANG, 2013). A utilização deste curativo como método de cobertura para o tratamento de lesões cutâneas representa grande avanço na área de biomateriais (PORTELLA et al., 2016).

Figura 7 – Membrana de celulose bacteriana



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Estrutura química celulose bacteriana



Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estrutura-linear-da-celulose-As-linhas-pontilhadas-esquemam-as-ligacoes-de-261064359>

5.3 Polietilenoglicol (PEG)

Polímeros biodegradáveis, bioadesivos, biomiméticos e hidrogéis responsivos têm sido amplamente incluídos em formulações farmacêuticas (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010), pois tem-se apresentado como uma importante estratégia na procura pela otimização da liberação de fármacos. Dentre os diversos polímeros, o PEG possui capacidade de formação de estruturas mais porosas, tornando-se útil na melhoria da velocidade de liberação do fármaco, além de mostrar ainda a capacidade de adsorção a compostos orgânicos que apontam a melhoria das funções biológicas. O PEG é um homopolímero sintético linear obtido a partir do etilenoglicol que apresenta como fórmula molecular $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, onde n é o número médio de grupos de óxido de etileno presentes na molécula, nomeado grau de polimerização (CÔRTES et al., 2013), solúvel em água e bastante usado em aplicações médicas, biomédicas, ambientais e de engenharia (BUZZI; YUAN; ROUTLEY, 2017).

Diferenças significativas no comportamento mecânico entre fibroína de seda pura e fibroína de seda/PEG 400 foram identificados por Wang et al. (2003). Os filmes de fibroína de seda isentos de PEG 400 apresentaram baixa resistência, por isso não eram adequados para medições usando texturômetro. Porém, após introdução do PEG na fibroína de seda, a interação dos grupamentos -OH mudaram a estrutura da rede polimérica melhorando as propriedades mecânicas dos filmes (WANG et al., 2003).

Com base no estudo de Wang et al. (2003) o motivo da associação de PEG 400 nos filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda (FH-FS) é atribuída as propriedades ao aumento do módulo de Young (dados não mostrados)

6 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

6.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para identificação de substâncias orgânicas ou minerais, utiliza-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), uma técnica que permite, através dos grupos funcionais presentes nas moléculas, a quantificação do composto analisado (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015).

O espectrômetro FTIR mostra o resultado das bandas de absorção, gerando indícios da presença de diferentes grupos funcionais na estrutura molecular, correspondente à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração das ligações interatômicas e intramolecular (ALCANTARA JR, 2002). A vibração abrangente em volta das ligações covalentes que interligam os átomos e seus grupos de compostos orgânicos é produzida através da radiação no infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015).

As localizações das bandas no espectro, são representadas em número de ondas através da unidade centímetro inverso ($4.000-400\text{ cm}^{-1}$). As duas vibrações indispensáveis são: 1) vibração de estiramento - os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre eles aumenta ou diminui; 2) vibração angular - as posições dos átomos alteram em relação ao seu eixo de ligação original (NICOLAOU; GOODACRE, 2008).

6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para avaliação direta da energia térmica absorvida, a qual ocorre em uma faixa pré-determinada de aumento ou diminuição da temperatura, utiliza-se a ferramenta termodinâmica DSC. Esta técnica possibilita supervisionar alterações na fase de transição de substâncias puras ou mistas (BRASIL, 2010).

Em circunstâncias experimentais mais fáceis, a energia é proporcionada em conjunto para o cadinho de referência (branco) e para o cadinho contendo a amostra a ser analisada. A desigualdade entre a energia requisitada para a amostra em relação à requisitada para o branco é a quantidade de calor absorvido ou liberado pelas moléculas da amostra. Transições de fase, desidratações, reduções e reações de decomposição geram efeitos endotérmicos, ao passo que cristalizações, oxidações e eventos de carbonização geram efeitos exotérmicos (BERNAL et al., 2002).

A respeito de um método termodinâmico, a tecnologia DSC pode prenunciar a estabilidade das substâncias ou das suas miscigenações em diferenciadas condições experimentais como pH, força iônica e osmolalidade (MAGHAMI et al., 2010; BRASIL, 2010).

6.3 Propriedades mecânicas

Para a elaboração de um biomaterial tópico é essencial que sua formulação apresente resistência mecânica e dureza, adequada para manter a estrutura e a integridade dos poros durante o processo de biodegradação e reparação tecidual (REBELO, 2015). Além de propriedades como fácil remoção do produto, dispersão eficiente e propriedade mucoadesiva. Os parâmetros mecânicos são descritos como dureza ou força indispensável para alcançar uma determinada deformidade; adesividade ou trabalho indispensável para vencer as forças de tração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda; compressibilidade ou trabalho indispensável para descaracterizar o produto durante a primeira compressão da sonda; coesividade ou efeito da tensão de cisalhamento sobre as propriedades estruturais da formulação (XU et al., 2014; GRELA; MARCINIAK; PLUTA, 2014; HURLER et al., 2012).

6.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de derivados vegetais pode ser analisada pela determinação da concentração mínima necessária para impedir o crescimento bacteriano, de maneira que quanto menor for a CIM (concentração inibitória mínima) maior será a potência. Um aspecto significativo na determinação da CIM de extratos vegetais é a apreensão em associação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais apropriados aos compostos naturais ou suas combinações. Inúmeros meios possibilitam examinar a atividade antibacteriana e antifúngica dos derivados vegetais. Os mais conhecidos englobam método de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

6.5 Mecanismos para liberação de fármacos

A liberação de fármacos através de hidrogéis pode acontecer por difusão e/ou erosão. No caso de fármacos muito solúveis, a liberação se dá pela difusão do fármaco através da camada gelificada, ao passo que para fármacos pouco solúveis a liberação é controlada pelo processo de erosão (ALVES, 2016).

6.5.1 Difusão

O movimento aleatório da molécula do fármaco de região mais concentrada para a menos concentrada é o processo de difusão. Este processo depende do volume livre de polímero e da mobilidade das cadeias poliméricas. A mobilidade das cadeias é influenciada pela extensão de insaturações, grau de ligação cruzada, cristalinidade e natureza dos substituintes. A difusão advém preferivelmente entre as regiões onde as cadeias poliméricas encontram-se mais desordenadas. Demais elementos que auxiliam a difusão é a relaxação das cadeias poliméricas, taxa de intumescimento e a solubilidade do fármaco (SIEPMANN; GOPFERICH, 2001; AÏNAOUI; VERGNAUD, 2000).

6.5.2 Erosão

Em sistemas no qual a liberação é controlada por erosão o fármaco está incorporado em polímeros hidrossolúveis ou pouco solúveis. A liberação do fármaco por erosão abrange dois processos contínuos subordinados do tempo, a difusão do meio de dissolução para o interior da matriz com consequente dilatação e relaxação das cadeias poliméricas e consequente formação de uma camada gelatinosa. Neste contexto, o fenômeno de erosão do retículo polimérico pode acontecer em modo mais ou menos conjunto até a completa desagregação das cadeias poliméricas. O modo como realiza-se a erosão do polímero está ligado ao perfil de liberação do fármaco. Em sistemas reticulados, a taxa de erosão depende da hidrofilicidade, solubilidade do polímero e erosão química ou enzimática (FAISANT; SIEPMANN; BENOIT, 2002; AÏNAOUI; VERGNAUD, 2000).

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Material

Os extratos vegetais de *M. recutita* (Grupo Centro Flora - Lote: 271115.2850) e *C. officinalis* (Bio Tae Extratos Vegetais - Lote: 025085) foram padronizados conforme Instrução Normativa 05/2008 e 02/2014 (BRASIL 2008; 2014). O extrato de *A. vera* (Grupo Centro Flora - Lote: 240616.01818) foi padronizado segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Os extratos vegetais utilizados neste estudo apresentaram marcadores de 1% de apigenin 7-O-glucoside para *M. recutita* (Anexo A), 0,084% de flavonóides totais expressos em hiperosídeos para *C. officinalis* (Anexo B) e 3,25% de polissacarídeos totais para *A. vera* (Anexo C). Os extratos foram utilizados conforme recebidos das empresas. Os laudos de cada extrato estão anexados.

Os reagentes utilizados tais como etanol absoluto, carbonato de sódio (Na_2CO_3), meios de cultura, cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e água ultrapura foram de grau farmacêutico ou PA (padrão analítico). A membrana de celulose utilizada para o processo de dialise foi o modelo D-9652 - Sigma Aldrich.

7.2 Métodos

7.2.1 Extração da Fibroína de Seda

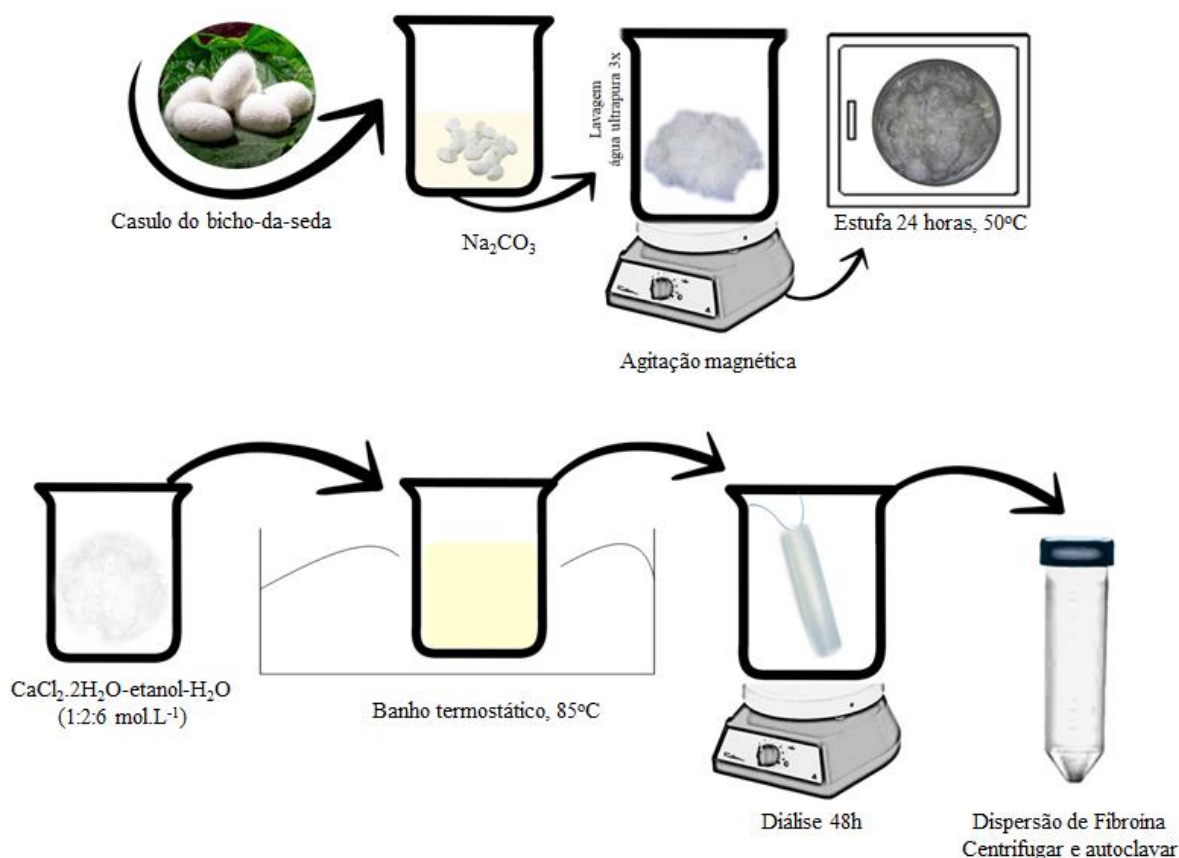
Os casulos de bicho-da-seda, espécie *Bombyx mori*, foram obtidos através de doação da empresa Fiação de Seda BRATAC S.A (Londrina / PR, Brasil).

Para extração da fibroína de seda (FS) foi utilizado o procedimento descrito por Rockwood et al. (2011) com algumas modificações no processo.

Inicialmente 10 g de casulos do bicho-da-seda cortado em pequenos fragmentos foi adicionado à uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,212% e aquecida em banho maria (85 °C, durante 35 min). A fibroína foi removida do banho e enxaguada em água corrente e imersa em 1 litro de água ultrapura (18,2 Ω .cm a 25 °C) e mantida sob agitação constante durante 30min. Após este procedimento ter sido repetido por três vezes, o excesso de água é removido da fibroína por compressão manual. A fibroína foi colocada em estufa com circulação de ar durante 24 horas e mantida a 50 °C. Depois de seca, a cada 10 g de fibroína, foi dissolvida em

100 mL do sistema ternário composto de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -etanol- H_2O ($1:2:6 \text{ mol.L}^{-1}$). A suspensão coloidal formada foi mantida a 85°C em banho termostático até total homogeneização. Para diálise 12 mL da suspensão coloidal de fibroína foi transferida para uma membrana de celulose (modelo D-9652 / corte de peso molecular típico = 14,000 Da- Sigma Aldrich). As extremidades da membrana de celulose foram amarradas para formar o saco de diálise. O saco de diálise foi imerso em 1 litro de água ultrapura. A troca do meio de imersão foi feita inicialmente com 24 e 48 horas. A dispersão de fibroína foi removida do saco de diálise e centrifugada a 7.500 rpm durante 1 hora para precipitação de possíveis sujidades da dispersão obtida, onde a mesma foi submetida a esterilização em autoclave (121°C , 15 min) e armazenada sob refrigeração ($2-8^\circ\text{C}$). Uma representação esquemática do processo de extração da fibroína é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do processo de extração da dispersão de FS



Fonte: Elaboração própria.

7.2.2 Determinação do pH e da concentração de fibroína expressa em % (m/v)

O pH da dispersão de fibroína foi medido por peagômetro (Tecnal modelo TEC-5) antes e após esterilização em autoclave (121 °C, 15 min). A determinação da concentração de fibroína foi realizada por gravimetria conforme descrito por Preda et al. (2013). Resumidamente, uma amostra da dispersão de fibroína armazenada foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente desidratado por aquecimento (60 °C, durante 24 horas). A massa do cadinho vazio foi anteriormente pesada e registrada (m1). A massa de 1 mL da dispersão de fibroína previamente obtida foi transferida para o cadinho e pesada (m2). A amostra foi colocada em estufa com circulação forçada de ar na temperatura de 60 °C durante 24 horas para a secagem da fibroína. A amostra seca foi devidamente pesada (m3). O experimento foi realizado em duplicata e serviu para determinar a relação massa /volume (m/v) expressa em % da fibroína na dispersão.

7.3 Obtenção de membrana de Celulose Bacteriana

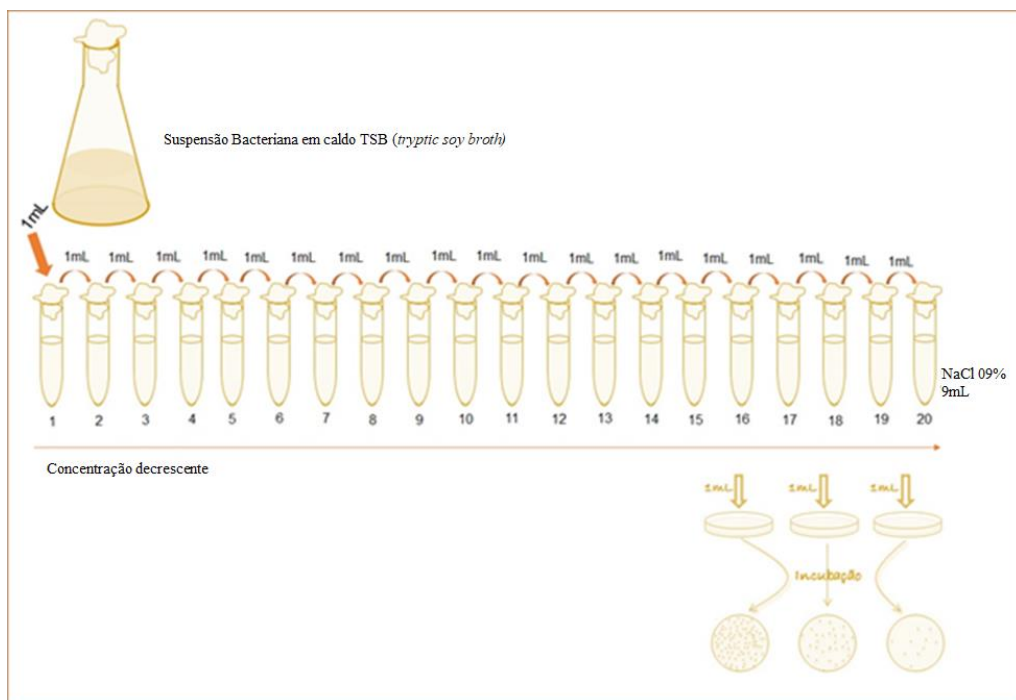
As membranas de celulose bacteriana (mCB) foram produzidas pelo cultivo de *G. xylinus*, em meio Hestrin & Schramm (20 g/L glicose, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Fosfato de sódio anidro, 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado). O cultivo foi realizado em placas com poços de 3 cm² de diâmetro. O volume inoculado foi de 1 mL por poço, contendo aproximadamente 10⁶ UFC / mL para obtenção de membranas com aproximadamente 2 mm de espessura. As placas foram mantidas a 30 °C em cultura estática durante 4 dias. As membranas formadas foram lavadas em solução de 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), durante 24 horas, enxaguadas com água destilada para retirada do SDS, imersas em solução de 1M NaOH e mantida a 60 °C sob agitação constante por 1,5 horas. Após este período as membranas foram lavadas em água purificada até atingir pH neutro e posteriormente acondicionadas em solução fisiológica e autoclavadas a 121 °C durante 15 min. As membranas foram armazenadas a 4 °C (JOZALA et al., 2015).

7.4 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram executados para determinação da CIM, teste de desafio e teste de difusão em ágar. Para execução destes ensaios foi realizada a desinfecção da capela de fluxo laminar (Marca: Trox e Serie: 1590) com álcool etílico 70%, seguida de esterilização com radiação ultravioleta por 15 min. Os materiais utilizados foram previamente esterilizados em autoclave. As micropipetas foram assepticamente tratadas com álcool etílico 70% e esterilizadas sob radiação ultravioleta.

Os microrganismos utilizados para determinação da CIM foram cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9721) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10390). Neste ensaio para determinação da CIM o inóculo foi padronizado para uma concentração final de 10^6 UFC/mL e o procedimento técnico foi realizado em placas de 96 poços como descrito no Manual de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (CAVALIERI, 2005). Os microrganismos foram incubados em 125 mL de caldo *tryptic soy broth* – TSB e mantidos em estufa apropriada a 37 °C durante 24 h. A suspensão de cada microrganismo foi previamente diluída em solução salina estéril para obter uma concentração final de 10^6 UFC/mL (Figura 10).

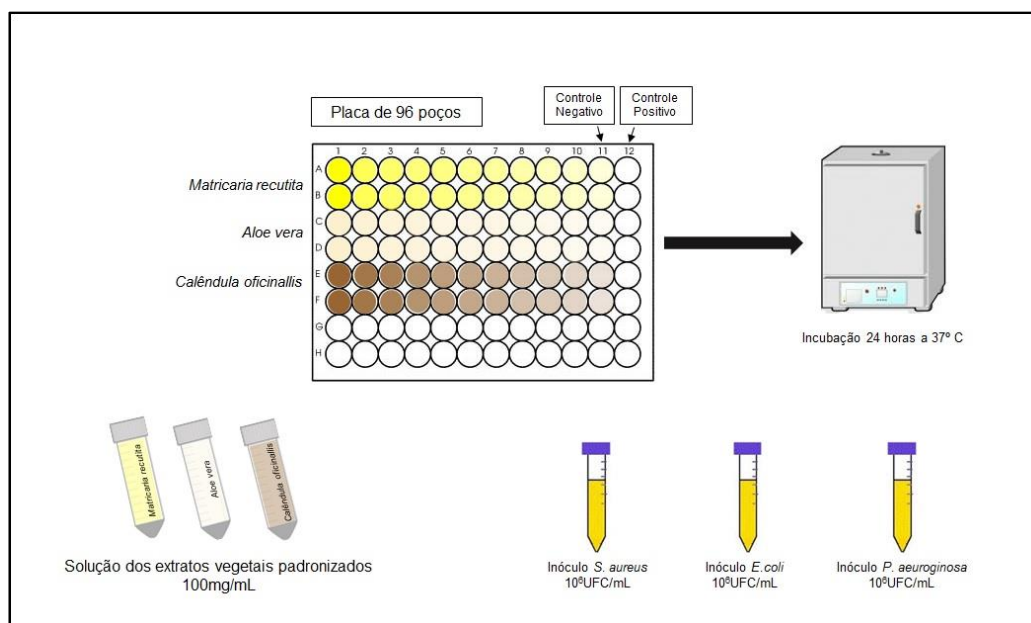
Figura 10 - Esquema de diluição seriada dos microrganismos: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*



Fonte: Elaboração própria.

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição seriada em placa estéril de 96 poços. No primeiro poço da série foi adicionado 200 μL de cada solução dos extratos vegetais em uma concentração de 100 mg/mL. Nos poços de 2 a 12 foram distribuídos 100 μL do meio de cultura. A microdiluição sucessiva foi realizada transferindo 100 μL do poço da série 1 para o poço da série 2, esta frequência foi repetida sucessivamente até o poço 11. Nos poços da série 2 a 10 e no poço 12 foram adicionados 10 μL do inoculo (10^6 UFC/mL) de cada microrganismo. A placa foi fechada e colocada em estufa a 37 °C durante 24 h. O poço 11 foi utilizado como controle negativo e o poço 12 como controle positivo. A esquematização da CIM é demonstrada na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma da CIM dos extratos vegetais



Nota: Controle Negativo: (Meio de Cultura + 100 μL do poço 10) | Controle Positivo: (Meio de Cultura +10 μL do inoculo) |

Fonte: Elaboração própria.

Para realizar o teste de desafio foram pipetados 5 μL dos meios contidos em cada poço da placa utilizada para determinação da CIM e foram transferidos para placa de petri contendo *trypticase soy agar* (TSA). As placas foram colocadas em estufa microprocessada para cultura (modelo 502 marca Fanem) a 37 °C durante 24 h. O teste de desafio foi realizado em duplicata.

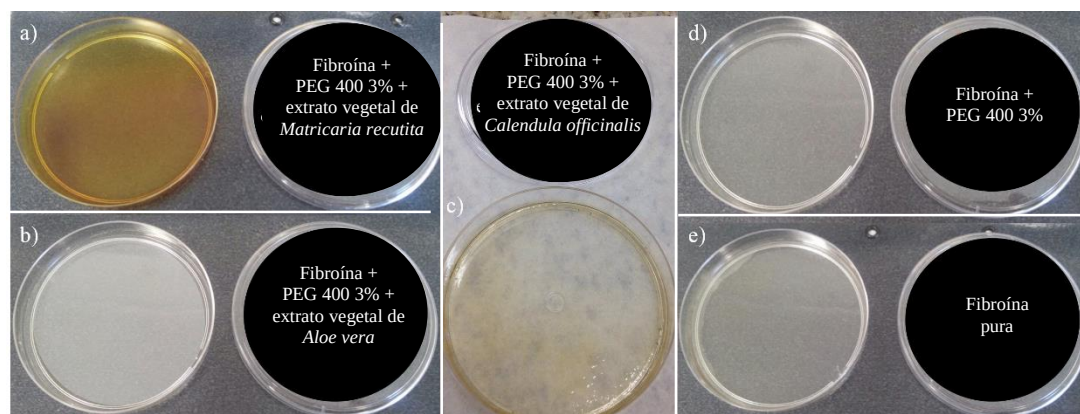
Os ensaios de difusão em ágar envolveram vários procedimentos antes do teste propriamente dito. Por uma questão didática e para facilitar a compreensão dos leitores os procedimentos serão subdivididos em etapas.

7.5 Incorporação e difusão em ágar dos extratos vegetais padronizados em FH-FS e mCB

Para incorporação dos extratos vegetais foi preparada uma solução aquosa de cada extrato vegetal (*A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita*) na concentração de 100 mg/mL. Esta solução serviu de base para incorporação dos extratos no FH-FS e para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Os FH-FS foram preparados utilizando Polietilenoglicol 400 (PEG 400) previamente dissolvido em água (3%). Para que volumes diferentes de cada extrato vegetal pudessem ser adicionados à dispersão de FH-FS+PEG 400 a solução obtida foi vertida em placa de petri esteril de poliestireno e colocadas em estufa com circulação de ar durante 24 horas a 25° C para obtenção dos filmes (FH-FS). A técnica de incorporação está representada na Figura 12.

Figura 12 - Ilustração da incorporação dos extratos vegetais em FH-FS



- a) Fibroína de Seda + PEG400 3% + extrato vegetal de *Matricaria recutita*
- b) Fibroína de Seda + PEG400 3% + extrato vegetal de *Aloe vera*
- c) Fibroína de Seda + PEG400 3% + extrato vegetal de *Calendula officinalis*
- d) Fibroína de Seda + PEG400 3%
- e) Fibroína pura

Fonte: Elaboração própria.

Para a retirada dos FH-FS das placas de poliestireno utilizou-se a metodologia descrita por Preda et al. (2013), onde adicionamos no fundo do dissecador de vácuo água ultrapura. Acondicionamos as placas de petri abertas com os filmes no dissecador e aplicamos um vácuo durante 10 minutos. Fechamos a válvula de vácuo e deixamos os filmes durante um período mínimo de 4 horas permitindo assim o recozimento do filme em água e cuidadosamente a remoção do FH-FS da placa de petri.

A capacidade de incorporação para mCB foi avaliada em função do tempo de contato com as soluções de extratos vegetais padronizados cuja concentração é de 500 mg/mL para *A. vera* e *M. recutita* e 800 mg/mL para *C. officinalis*, demonstrados na Figura 13.

Figura 13 – Ilustração da incorporação dos extratos vegetais na mCB



MR: *Matricaria recutita* | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* | mCB: membrana de Celulose Bacteriana
Fonte: Elaboração própria.

Para avaliar a capacidade de incorporação dos extratos vegetais as mCB foram previamente desidratadas em estufa a 50° C durante 2 h (ALMEIDA et. al., 2013), e suas respectivas massas foram determinadas (m_i). As mCB desidratadas foram imersas em 1 mL para cada extrato vegetal analisado. As mCB intumescidas com os extratos vegetais permaneceram sob agitação rotacional (AmericanLab modelo AL140) com 200 rpm, 25 °C até atingir o peso constante. O excesso superficial de solução de extrato vegetal foi retirado com papel absorvente e determinada suas respectivas massas (m_f). A capacidade de incorporação foi determinada segundo a equação 1 com os resultados expressos em % (SHEZAD et al., 2010).

$$\text{Capacidade de incorporação (\%)} = \frac{m_f - m_i}{m_f} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, m_i = massa inicial e m_f = massa final.

Após a incorporação dos extratos vegetais, para a realização da difusão em ágar da mCB e FH-FS, as mCB e FH-FS foram transferidas para capela de fluxo laminar e submetidas a radiação no número de ondas UV durante 15 minutos antes da difusão em ágar.

- I. Para avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, os microrganismos utilizados foram fornecidos pela Cefar Diagnostica Ltda Brasil. As cepas de *Escherichia coli* - CCCD E003, *Pseudomonas aeruginosa* CCCD P004 e *Staphylococcus aureus* CCCD S007 apresentam compatibilidade bioquímica com a

cepas *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; e *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC 25923.

- II. Para preparação dos inoculos os microrganismos foram suspensos em meio de cultivo padrão e mantidos em estufa a 37 °C, durante 24 horas. O inóculo utilizado no teste de sensibilidade por difusão em ágar foi padronizado pelo método de comparação visual com padrão de turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland, que resulta em $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL, e também pelo método turbidimétrico (Shimadzu, Multispec 1501, Quito, Japão) cuja absorvância deve ser com densidade óptica entre 0,08 a 0,10 em número de onda de 625 nm (CLSI, 2003).
- III. Para avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar dos extratos vegetais já incorporados com FH-FS e mCB foram utilizados os microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (CLSI, 2003), semeados em placa de petri contendo meio TSA. Como controle negativo foi utilizado água estéril e como controle positivo os antimicrobianos (Penicillin 10.000 UI/mL – Streptomycin 10 mg/mL). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Nos FH-FS foi utilizado três diferentes concentrações (10, 20 e 40 mg/mL) dos extratos de *A. vera* e *M. recutita*. Para o extrato vegetal de *C. officinalis* foi utilizado três filmes de FH-FS com diferentes concentrações (20, 40 e 80 mg/mL).

As mCB intumescidas e os FH-FS incorporados com extratos vegetais foram dispostos sobre a superfície do TSA contendo os microrganismos (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e incubadas em estufa a 37° C durante 24 horas. Discos inertes, contendo água ultrapura e discos contendo 30 µl de cada solução de extrato vegetal foram dispostos sobre a superfície do TSA e mantidas nas mesmas condições.

7.6 Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Esta análise foi realizada em espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (SHIMADZU, FTIR IRAffiniy-1S, Kyoto, Japan) combinada com refletância total atenuada (ATR) usando modos de transmitância para caracterizar a presença de grupos químicos específicos do filme de fibroína de seda adicionado ou isento de extrato vegetal padronizado. Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4.000 a 600 cm^{-1} durante 128 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} .

7.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas dos FH-FS foram obtidos por análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC). O aparelho empregado para análise de DSC foi o modelo Thermal analyser TA 60W-Shimadzu (DSC-60, Kyoto, Japan). Através de um ciclo de aquecimento com a temperatura variando de 25 °C até 350 °C, na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

7.8 Avaliação macroscópica

Para avaliação macroscópica dos FH-FS os aspectos foram avaliados referente as propriedades de integridade, peso médio, homogeneização visual, ausência de bolhas de ar e resistência à manipulação manual.

7.8.1 Propriedades fisiomecânicas

As propriedades fisiomecânicas dos FH-FS e mCB com e sem extrato vegetal foram avaliadas utilizando texturômetro equipado com célula de carga de 5 Kg (Stable Micro Systems – TA-XT Plus Analyzer. Surrey, Reino Unido) e as forças obtidas foram expressas em Newton (N). Para avaliação das propriedades fisiomecânicas de resistência à tração, relaxação, resiliência e perfuração foi utilizado aparato modelo *Heavy Duty Platform* (n 13155) e plataforma modelo *Film Support Rig* (n 13085) utilizando amostras de FH-FS com área de 6 cm². Os parâmetros utilizados foram de 10 mm de distância para o ensaio de perfuração e de 5 mm para os ensaios de resiliência e relaxação. Para avaliar a resistência mecânica à tração e alongamento do FH-FS, foi utilizado aparato *Mini Tensile Grips* (n 13101), onde as extremidades dos FH-FS foram fixadas por presilhas. As presilhas foram previamente recobertas com fita adesiva para minimizar o efeito dos sulcos na deformação do FH-FS durante a tração. A resistência à tração foi registrada no momento do rompimento do filme. Devido as propriedades deslizantes da mCB não foi possível realizar os ensaios de tração e perfuração. As medidas foram realizadas em triplicata.

7.8.2 Propriedades mucoadesivas

As propriedades mucoadesivas das formulações de mCB e FH-FS com e sem extrato vegetal, foram avaliadas sobre a superfície de discos de mucina empregando TAXTPlus Analisador de Textura (Stable Micro Systems, UK), em conformidade com o protocolo desenvolvido e validado no LaBNUS da Universidade de Sorocaba.

Os discos de mucina foram feitos por compressão (Lemaq, Máquina compressora rotativa, Mini Express LM-D8, Diadema, BR), utilizando punções planos, matriz cilíndrica com diâmetro de 8 mm e carga de compressão de 8 toneladas, da mucina (110 mg) com diâmetro de 8 mm e espessura de 0,2 mm. Antes do teste de mucoadesão, o disco de mucina foi hidratado por submersão em água purificada durante 30 min. O excesso de água na superfície do disco foi removida com a ajuda de papel absorvente. Os discos de mucina foram presos com fita adesiva dupla face na extremidade inferior da sonda analítica. Uma amostra de cada formulação foi transferida para um béquer de vidro e mantida em banho de água com temperatura ajustada para 37 °C. O disco de mucina fixado na sonda foi comprimido, sobre a superfície das amostras, com uma força de 0,1 N, direcionada no sentido apical → basal. O tempo de contato do disco com a superfície das amostras foi padronizado em 300 segundos, estabelecido para que decorresse um contato íntimo entre o disco de mucina e a amostra. A sonda foi retirada da superfície do FH-FS e mCB com uma velocidade constante de 10 mm.s⁻¹. A força necessária para separar o disco de mucina da superfície de cada formulação foi definida a partir de uma relação tempo x força. Todas as medições foram executadas em triplicata.

7.8.3 Espectrofotometria em número de onda na região do UV e construção da curva analítica para os extratos vegetais

Para determinação do pico máximo de absorbância foi preparada uma solução dos extratos vegetais (20 mg/mL) em água ultrapura. O número de maior absorbância foi determinado em espectrofotômetro UV-VIS (FEMTO - 880 XI, São Paulo, Brasil). As soluções dos extratos vegetais foram analisadas por varredura espectral entre 210 e 380 nm. Após a determinação do número de onda com maior absorção, a curva analítica dos extratos vegetais foi construída entre as concentrações de 0,02 mg/mL e 4,2 mg/mL em solução aquosa. Para as medidas de absorbância foram utilizadas cubetas de quartzo.

7.8.4 Perfil de liberação dos extratos vegetais incorporados em FH-FS e mCB

O estudo do perfil de liberação dos extratos vegetais incorporados nos FH-FS e mCB foi realizado para a avaliação do perfil de liberação, onde um fragmento de 2x2 cm dos FH-FS e 3x2 cm das mCB incorporados com os extratos vegetais foram cuidadosamente medidos com papel milimetrado e depositados em placas para cultura de células de 6 poços com fundo chato. Em cada poço da placa envolvendo a amostra foi incorporado 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 previamente obtida. O sistema foi retido em agitador orbital (Tecnal, TE-4200, Piracicaba, BR), na temperatura de 37 °C e 50 rpm. As condições *sink* foram determinadas com base no estudo de equilíbrio de solubilidade e retidas durante o experimento. Uma alíquota de 1 mL, do sobrenadante, foi removida nos intervalos de tempo de 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240 e 300 min. O volume do meio foi mantido constante pela adição de 1 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 pré-aquecida a 37° C. As alíquotas foram diluídas em água ultrapura e a absorbância dos extratos vegetais foram estabelecidas por espectroscopia UV ($\lambda=255$ nm) para *A. vera*, espectroscopia UV ($\lambda=350$ nm) para *C. officinalis* e espectroscopia UV ($\lambda=270$ e 320 nm) para *M. recutita*. O cálculo da concentração dos extratos vegetais foi feito através da equação da reta adquirida da curva analítica. O experimento foi guiado em triplicata (ALVES, 2016).

7.9 Análises estatísticas

Para determinação das propriedades mecânicas foi utilizada a análise estatística de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey para comparação das médias, e determinada com intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Determinação do pH e concentração da dispersão de fibroína (m/v) expressa em %

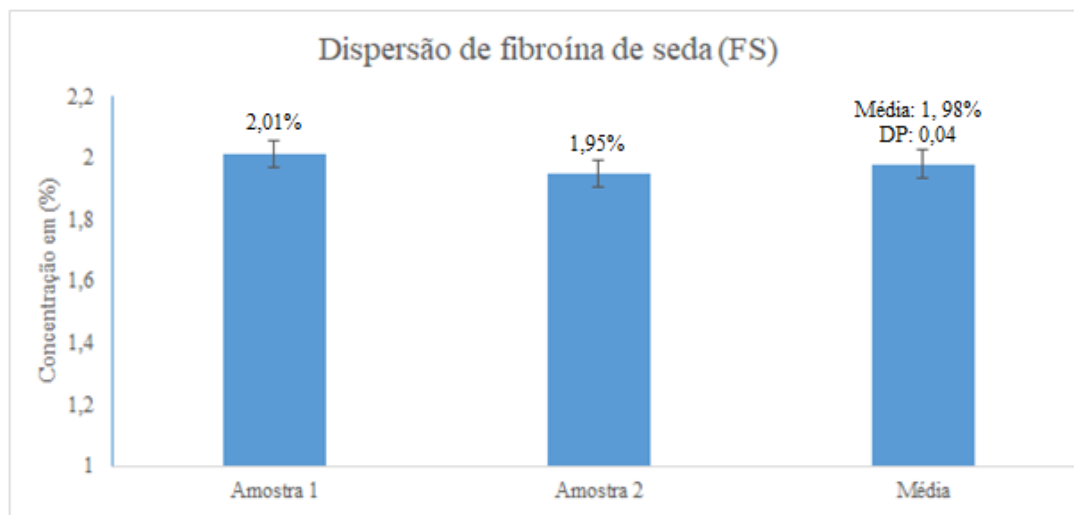
O ponto isoelétrico da fibroína varia numa faixa de pH de 3,6 a 5,2 dependendo de como a dispersão foi preparada (SASHINA et al., 2006), fato este que demonstra que a faixa de pH influencia na reticulação da dispersão de fibroína.

O pH obtido da dispersão de fibroína neste estudo foi de 7,8 antes e após a autoclavagem, fato este que justifica a não reticulação da proteína.

Os resultados da determinação da concentração da dispersão de fibroína são mostradas na Figura 14 e equação 2 conforme realizado por Preda et al. (2013).

As concentrações de fibroína de seda demonstradas na literatura são determinadas a partir da quantidade dos casulos cortados em 100 mL da solução ternária para dissolução da fibroína. No entanto, neste estudo foi avaliado a concentração da dispersão de fibroína de seda já obtida.

Figura 14 - Concentração da dispersão de FS em %



DP: Desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Equação 2

$$\left(\frac{\text{Massa 3} - \text{Massa 1}}{\text{Massa 2} - \text{Massa 1}} \right) \times 100$$

Onde: Massa 1= Cadinho de porcelana vazio; Massa 2= Cadinho de porcelana + 1 mL dispersão de fibroína; Massa 3= Cadinho de porcelana + 1 mL dispersão de fibroína seca após 24 horas.

8.2 Determinação da CIM dos extratos vegetais padronizados

Na Tabela 5 é possível observar a CIM apresentada pelos extratos vegetais de *A. vera*, *M. recutita* e *C. officinalis* contra os microrganismos *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. O extrato vegetal de *M. recutita* demonstrou ser duas vezes mais eficaz para inibir os microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus* do que o extrato vegetal de *A. vera*. Enquanto que o extrato vegetal de *M. recutita* demonstrou ser oito vezes mais potente para *P. aeruginosa* e 16 vezes mais potente para *S. aureus* quando comparado ao extrato vegetal de *C. officinalis*. Contudo, para o microrganismo *E. coli* os extratos vegetais de *A. vera* e *M. recutita* demonstraram ter a mesma capacidade inibitória. No entanto, o extrato vegetal de *C. officinalis* não apresentou atividade antimicrobiana contra o microrganismo *E. coli*.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL das soluções de *A. vera*, *M. recutita* e *C. officinalis* contra os microrganismos *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*

MICRORGANISMOS	SOLUÇÕES DOS ATIVOS VEGETAIS (mg/mL)		
	<i>Aloe vera</i> (mg)	<i>Matricaria recutita</i> (mg)	<i>Calendula officinalis</i> (mg)
<i>P. aeruginosa</i>	5	2,5	20
<i>S. aureus</i>	2,5	1,25	20
<i>E. coli</i>	10	10	NI

NI: Não inibiu.

Fonte: Elaboração própria.

O fato dos microrganismos pertencerem a grupos diferentes, *S. aureus* gram-positivo, *P. aeruginosa* e *E. coli* gram-negativos, resulta em diferentes CIM obtidas para cada cepa bacteriana.

Silva et al. (2012), determinaram a CIM para o extrato vegetal de *M. recutita* para *S. aureus* de 1,2 mg/mL e para *E. coli* 43,4 mg/mL. Esses valores foram diferentes do que nós obtivemos, no entanto, isso pode ser atribuído ao tipo de diluente utilizado para extração do extrato, o qual não foi informado neste estudo.

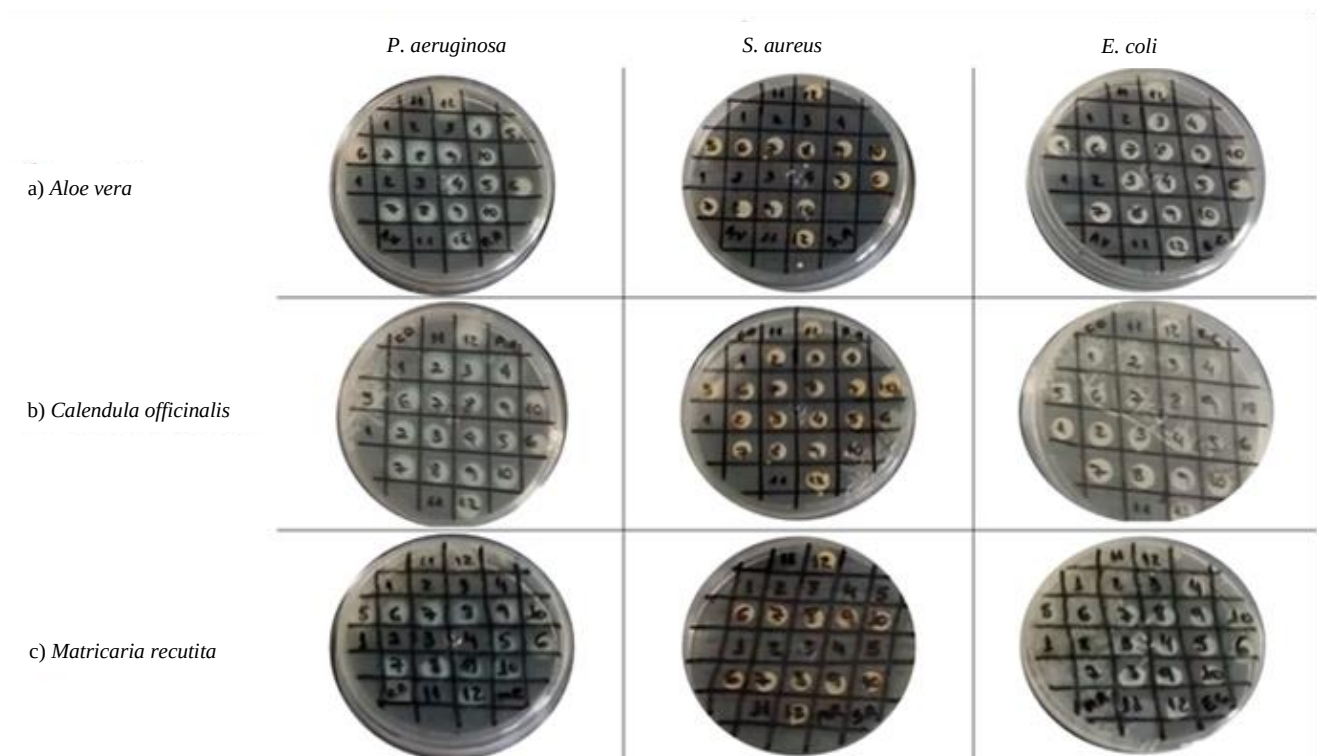
Entretanto, o extrato aquoso de *A. vera* determinou uma concentração inibitória mínima de 0,25 mg/mL para os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Todas as espécies de bactérias foram susceptíveis ao extrato bruto de *A. vera* gel, ocorrendo variações dependendo do método de extração utilizado (STANLEY et al., 2014).

As diferentes solubilidades dos compostos encontrados em *A. vera* apresentam diferentes efeitos antimicrobianos. A concentração encontrada em um estudo para o microrganismo *P. aeruginosa* presente em pacientes queimados, demonstrou atividade inibitória em 200 µg/mL com a mucilagem de *A. vera* (GOUDARZI et al., 2015).

8.3 Teste de desafio da concentração inibitória mínima (CIM)

A Figura 15 apresenta as imagens do teste de desafio da CIM, onde uma alíquota de 5µL de cada poço da CIM foi transferido para placa de petri contendo *trypticase soy agar* (TSA). É possível observar que nos locais onde não houve crescimento bacteriano, o número do poço aliqotado fica transparente correspondendo ao resultado obtido na CIM pelo método de microdiluição. No entanto, o resultado que pode ser confirmado pelos locais onde ocorreu o crescimento bacterianos ficaram manchados para os respectivos poços. A análise foi realizada em duplicata.

Figura 15 – Teste de desafio da CIM



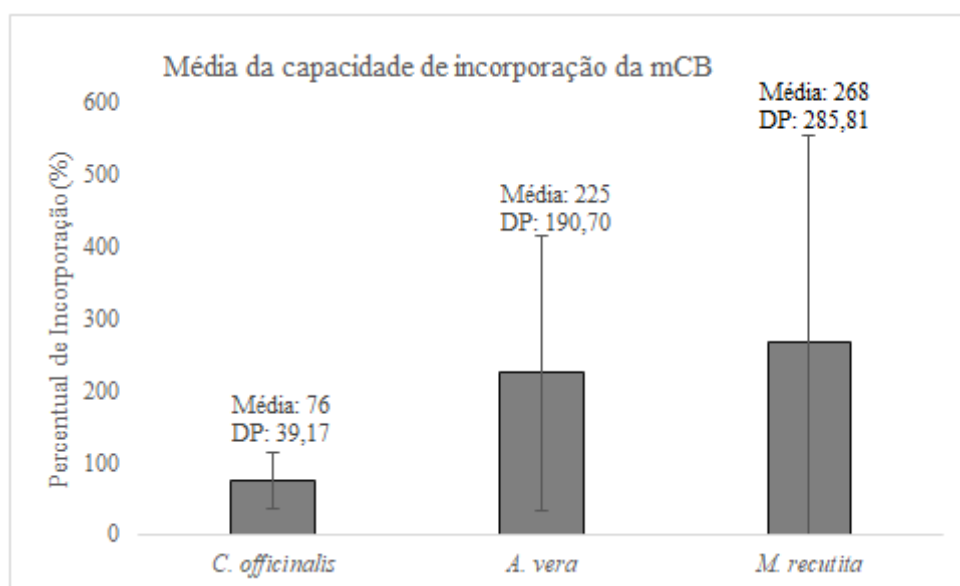
AV: *Aloe vera* | MR: *Matricaria recutita* | CO: *Calendula officinalis* |
 SA: *S. aureus* | PA: *P. aeruginosa* | EC: *E. coli*.
 Fonte: Elaboração própria.

8.4 Incorporação de extratos vegetais em membranas de Celulose Bacteriana (mCB) e Fibroína de Seda (FS)

A Figura 16 mostra o resultado obtido em mg/mL em função do tempo da capacidade de absorção dos ativos vegetais na mCB $n=6$. A mCB contendo o extrato vegetal de *M. recutita* apresentou a maior capacidade de incorporação (268%), entretanto, a mCB contendo extrato vegetal de *A. vera* apresentou uma capacidade de incorporação de 225%, estando próximo ao valor máximo de incorporação obtido. A mCB contendo extrato vegetal de *C. officinalis* foi a que apresentou menor capacidade de incorporação do ativo, ficando em 76%.

Analisando a Figura 16 observamos que a porcentagem de incorporação na mCB varia conforme o extrato vegetal empregado. Acreditamos que a composição molecular de cada extrato vegetal influencie a afinidade deste pela mCB, influenciando diretamente na sua efetividade contra os microrganismos estudados (GODINHO, 2014).

Figura 16 – Capacidade de incorporação dos extratos vegetais em massa percentual das mCB avaliadas ($n=6$)



C. officinalis: *Calendula officinalis* | *A. vera*: *Aloe vera* | *M. recutita*: *Matricaria recutita* | mCB:membrana de celulose bacteriana | DP: Desvio padrão

Fonte: Elaboração própria.

Os desvios padrão apresentados na Figura 16 são resultantes da exposição das folhas betas da fibroína. As folhas betas são insolúveis em água dificultando a homogeneização dos extratos nos FH-FS.

A Figura 17 apresenta a incorporação dos extratos vegetais na mCB.

Figura 17 – mCB obtida e incorporada com extratos vegetais



mCB: membrana de celulose bacteriana

Fonte: Elaboração própria.

Os filmes de FH-FS obtidos com a incorporação dos extratos vegetais são demonstrados na Figura 18. Para que volumes diferentes de cada extrato pudessem ser adicionados à dispersão de FH-FS+PEG 400 0,26% e vertida em placa de petri esteril de poliestireno para a formação de filme.

Figura 18 – FH-FS obtido e incorporado com extratos vegetais



FH-FS: filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda.

Fonte: Elaboração própria.

8.5 Atividade antimicrobiana através da difusão de extratos vegetais padronizados incorporados em mCB e FH-FS

Para padronização do inóculo utilizado no teste de sensibilidade por difusão em ágar pelo método turbidimétrico a absorbância obtida por densidade óptica foi 0.088, 0.085, 0.084 para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente, em um número de onda de 625 nm.

A Figura 19 e a Tabela 6 mostram os resultados obtidos no ensaio de sensibilidade por difusão em ágar dos extratos vegetais de *A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita* contra os microrganismos *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*.

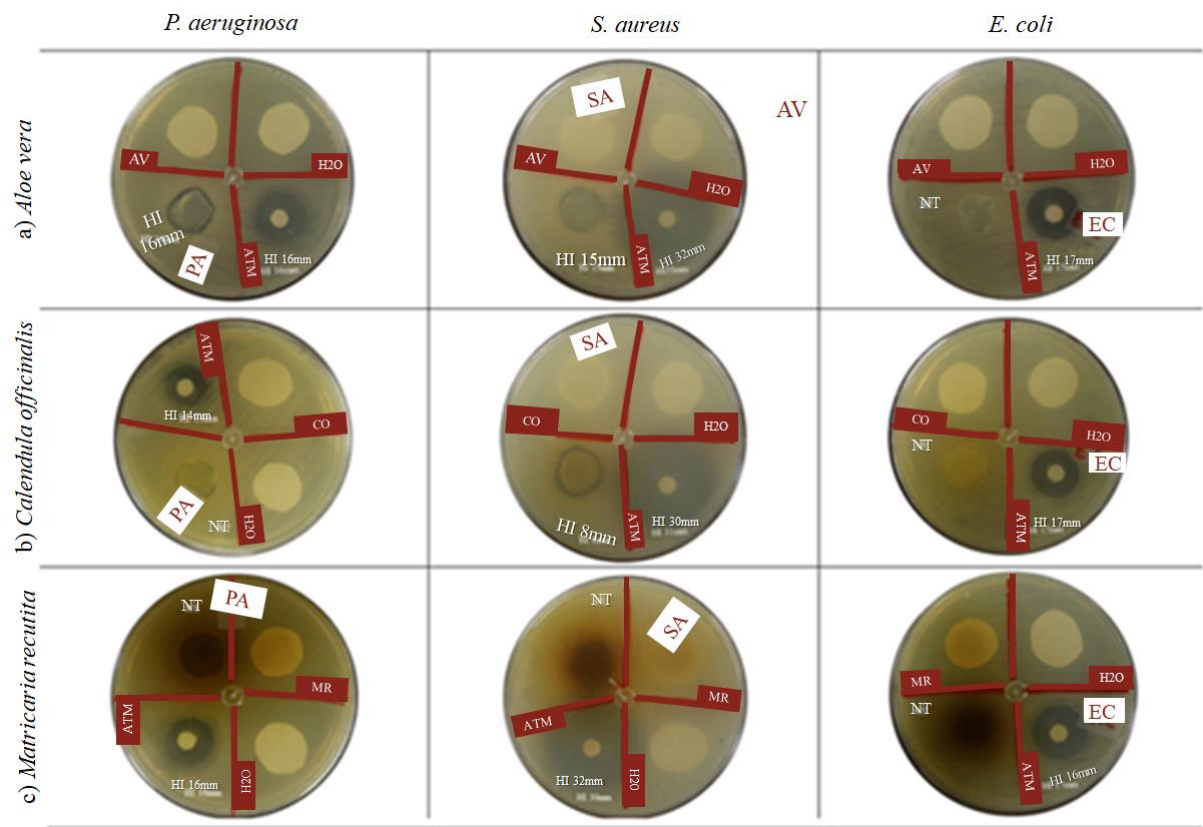
O resultado obtido para o extrato vegetal de *A. vera*, quando incorporado na mCB inibiu o crescimento microbiano na área de contato com formação do halo de inibição para os microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com halos de inibição de 16 mm e 15 mm, respectivamente. A mCB contendo extrato vegetal de *C. officinalis* apresentou halo de inibição de 8 mm contra o microrganismo *S. aureus*, não demonstrando halo de inibição contra *P. aeruginosa*. No entanto, nenhuma das mCB contendo os extratos vegetais estudados demonstraram atividade antimicrobiana contra o microrganismo *E. coli*.

O extrato vegetal de *M. recutita* quando incorporado na mCB não apresentou halo de inibição para nenhuma das cepas avaliadas neste estudo. O fato dos extratos vegetais estudados exercerem atividade antimicrobiana quando não incorporados na mCB pode estar relacionado a afinidade do polímero pelo extrato, não havendo a liberação do extrato.

A capacidade de difusão dos extratos vegetais incorporados em papel filtro a partir da CIM obtida e através da mCB, podem ser avaliadas distintamente.

Enquanto que para o disco de papel filtro foram adicionados apenas 30 µl, baseado na CIM obtida para as cepas *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, das soluções de *A. vera* e *M. recutita* em uma concentração de 500 mg/mL e *C. officinalis* 800 mg/mL. No entanto, nenhum dos extratos vegetais adicionados no disco de papel filtro obteve halo de inibição.

Figura 19 – Difusão em ágar da mCB incorporada com extratos vegetais



AV: Aloe vera | MR: Matricaria recutita | CO: Calendula officinalis |
SA: S. aureus | PA: P. aeruginosa | EC: E. coli |
H₂O: Água esteril | ATM: Antimicrobiano (Penicillin 10.000 UI/mL – Streptomycin 10 mg/mL) |
NT: Não teve halo de inibição | HI: halo de inibição.
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana das membranas contendo extrato vegetal padronizado de *Aloe vera*, *Calendula officinalis* e *Matricaria recutita* por meio do método da difusão em ágar

MICRORGANISMOS	EXTRATOS VEGETAIS		
	<i>Aloe vera</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Matricaria recutita</i>
<i>P. aeruginosa</i>	S = 16 mm	R	R
<i>S. aureus</i>	S = 15 mm	S = 8 mm	R
<i>E. coli</i>	R	R	R

S: Sensível | R: Resistente
Fonte: Elaboração própria.

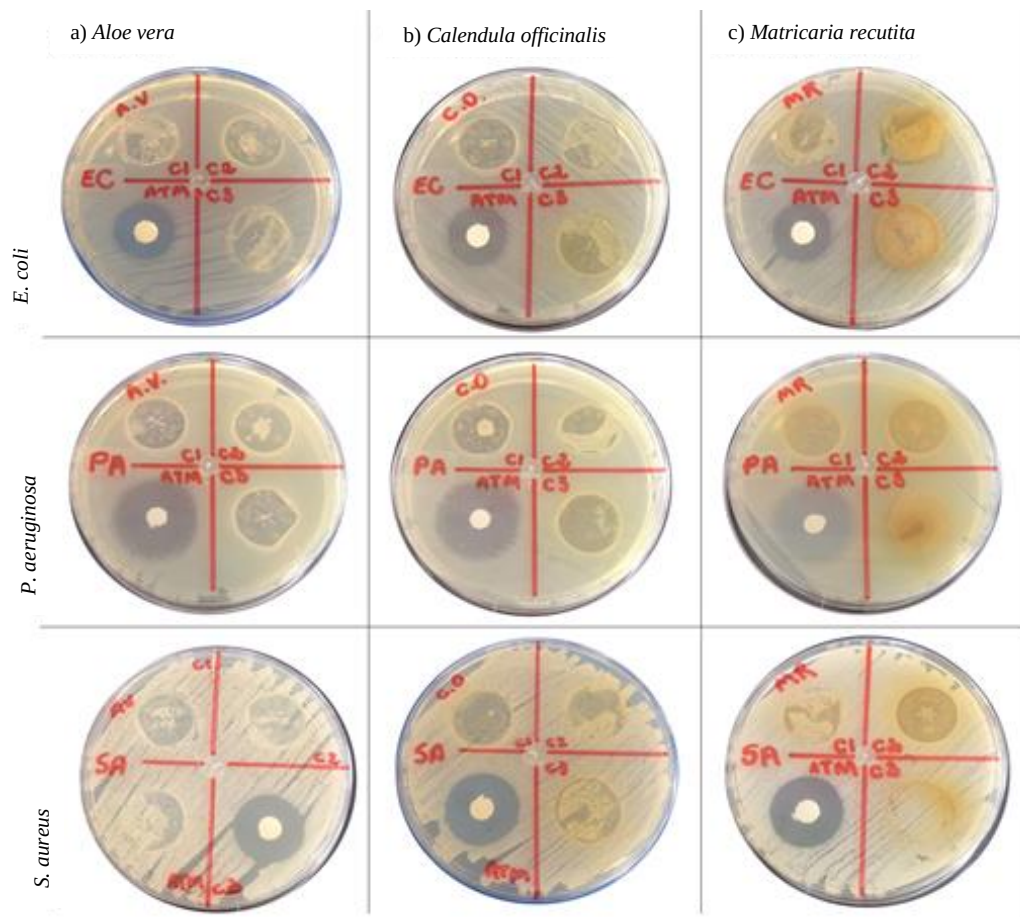
O extrato etanólico de *M. recutita* mostrou a zona inibitória máxima de 14,3 mm contra *E. coli* e 15,6 mm contra *S. aureus* com concentração de 20 µg/mL. Os extratos metanólicos de *M. recutita* mostraram uma zona inibitória máxima de 12 mm contra *E. coli* e 13,6 mm contra *S. aureus* a uma concentração de 12 µg/mL. Sendo assim, podemos sugerir que o extrato

etanólico pode ter maior potencial antibacteriano para *S. aureus* em comparação com *E. coli* mesmo em concentrações diferentes (MUNIR et al., 2014).

O método de difusão em ágar do FH-FS, demonstrados na Figura 20, em três diferentes concentrações de cada extrato vegetal não apresentaram halo de inibição quando submetidos a difusão em ágar contra as cepas microbianas analisadas neste estudo.

O FH-FS comparado com a mCB incorporada com os extratos vegetais distinguem-se em relação a atividade antimicrobiana apresentada. Fato este, pode estar correlacionado principalmente entre os diferentes biopolímeros utilizados os quais possuem distintas afinidades com os extratos vegetais.

Figura 20 - Difusão da FH-FS incorporada com extratos vegetais



- a) *Aloe vera* (C1: 10 mg/mL; C2: 20 mg/mL; C3: 40 mg/mL) | b) *Calendula officinalis* (C1: 20 mg/mL; C2: 40 mg/mL; C3: 80 mg/mL) | c) *Matricaria recutita* (C1: 10 mg/mL; C2: 20 mg/mL; C3: 40 mg/mL)

FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* | MR: *Matricaria recutita* | EC: *E. coli* | PA: *P. aeruginosa* | SA: *S. aureus* |

ATM: Antimicrobiano (Penicillin 10.000 UI/mL – Streptomycin 10 mg/mL) | NT: Não teve halo de inibição | C1: Concentração 1 | C2: Concentração 2 | C3: Concentração 3 | H₂O: Água estéril.

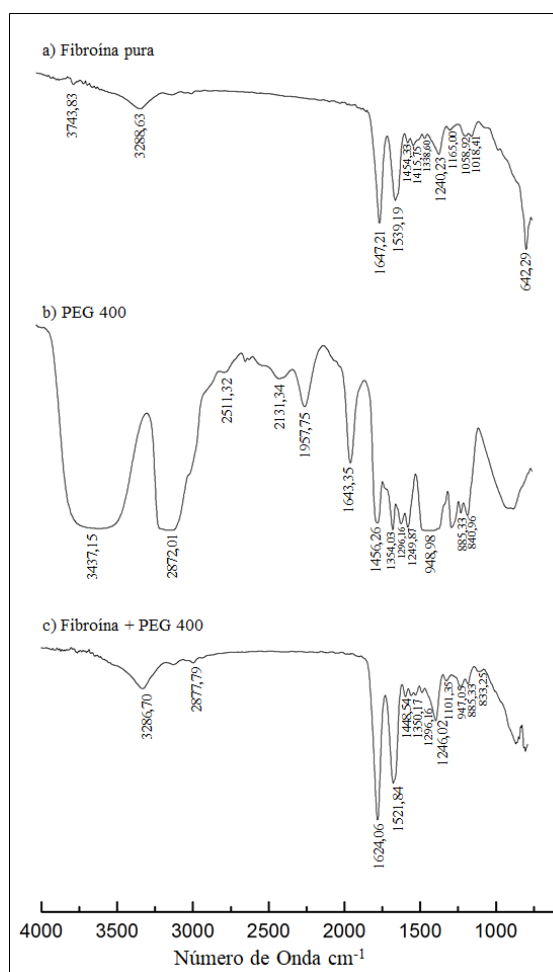
Fonte: Elaboração própria.

8.6 Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho obtidos dos FH-FS sem adição de extratos vegetais são apresentados na Figura 21. Os espectros obtidos para os FH-FS puro apresentados na Figura 21a foram de 1.647 cm^{-1} para amida I (estiramento C=O); 1.539 cm^{-1} para amida II referente a deformação (N-H), indicando à conformação estrutural das folhas β da seda II e alongamento em 1.240 cm^{-1} (C-N) para a amida III. Os estiramentos encontrados para os FH-FS puro por FTIR estão próximos com os descritos na literatura (VARKEY et al., 2015; MORAES et al., 2010; RIBEIRO et al., 2015).

A presença dos grupamentos característicos das estruturas de seda I e II da FS são encontrados nos FH-FS puro.

Figura 21 - FTIR das amostras de FH-FS sem adição dos extratos vegetais



a) Fibroína de Seda pura | b) PEG400 | c) Fibroína de Seda + PEG400

FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | PEG400: Polietilenoglicol

Fonte: Elaboração própria.

As bandas de absorção identificadas na literatura para o PEG apresentam uma banda larga entre 3.550 cm^{-1} , a qual está ligada com os grupos hidroxilas terminais e as bandas de 3.010 a 2.955 cm^{-1} , pertencentes aos grupos de dueto C–H e CH. O estiramento C–H do grupo CH_2 foi de 2885 cm^{-1} . A banda de $1.762,6\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se ao estiramento do grupo C=O. A absorção de 1.186 - $1.089,6\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se ao estiramento do grupo C–O (LI et al., 2001; CÔRTES et al., 2013). O PEG 400 demonstra um pico de absorção que se alonga entre 2.886 cm^{-1} a 3.749 cm^{-1} , este é atribuído ao grupamento CH_2 - CH_2 (ADALI et al., 2013).

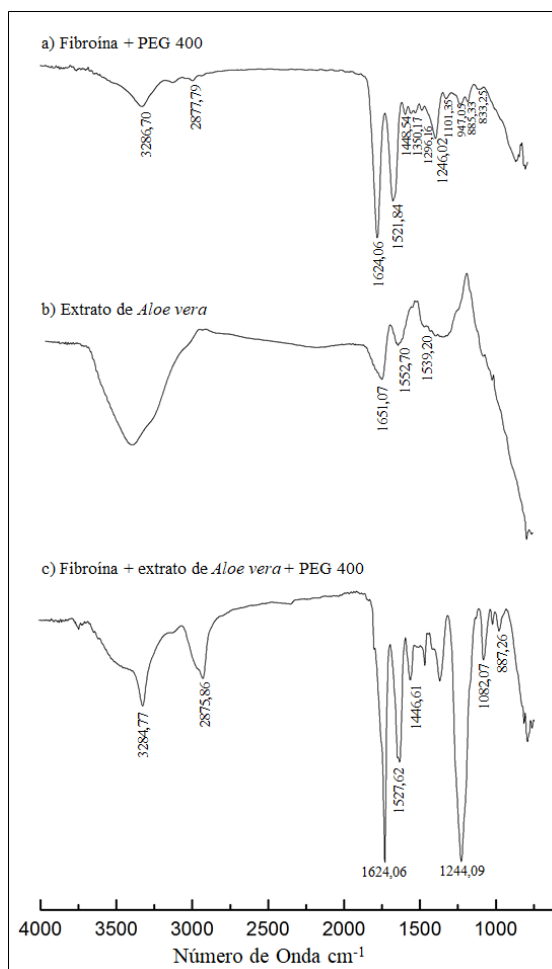
Os espectros observados neste estudo para o pico de maior absorção de PEG 400 foi 3.437 cm^{-1} referente ao grupamento O–H representados na Figura 21b.

Para os FH-FS+PEG 400 (Figura 21c), foi observado picos de absorção em 1.624 cm^{-1} referente a amida I; 1.521 cm^{-1} para amida II, indicando à conformação estrutural das folhas β da seda II; 1.246 cm^{-1} referente a amida III. O pico de absorção em 3.286 cm^{-1} refere-se à deformação axial de C–H do PEG400.

Os espectros dos FH-FS puro comparado com os FH-FS+PEG 400 (Figura 21c) são similares, pois em ambos aparecem estiramentos relativos a FS e PEG 400. Porém, nota-se que os picos de absorção foram deslocados, resultado de uma possível interação entre os compósitos da FS com PEG 400.

O espectro de absorção obtido para extrato de *A. vera* (Figura 22b) apresentou picos de absorção de 1.651 cm^{-1} relativo as deformações axiais de amidas primárias (C=O) e 1.552 cm^{-1} os quais são atribuídos a duplas ligações aromáticas, presentes na *Aloe vera*. Picos de absorção aproximados foram descritos na literatura, onde bandas de absorção entre 1.600 – 1.480 cm^{-1} referem-se as deformações axiais de amidas secundárias (N–H). Enquanto que, o pico de grupamento carboxílico em ácido hexadecanóico de *A. vera* aparece em 1.693 cm^{-1} (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010; GHAYEMPOUR; MONTAZER; RAD, 2016).

Figura 22 - FTIR das amostras de FH-FS+ extrato vegetal de *A. vera* + PEG400



a) Fibroína de Seda + PEG 400 | b) Extrato vegetal de *Aloe vera* |

c) Fibroína de Seda + extrato vegetal de *Aloe vera* + PEG 400

FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | PEG 400: Polietilenoglicol | *A. vera*: *Aloe vera*

Fonte: Elaboração própria.

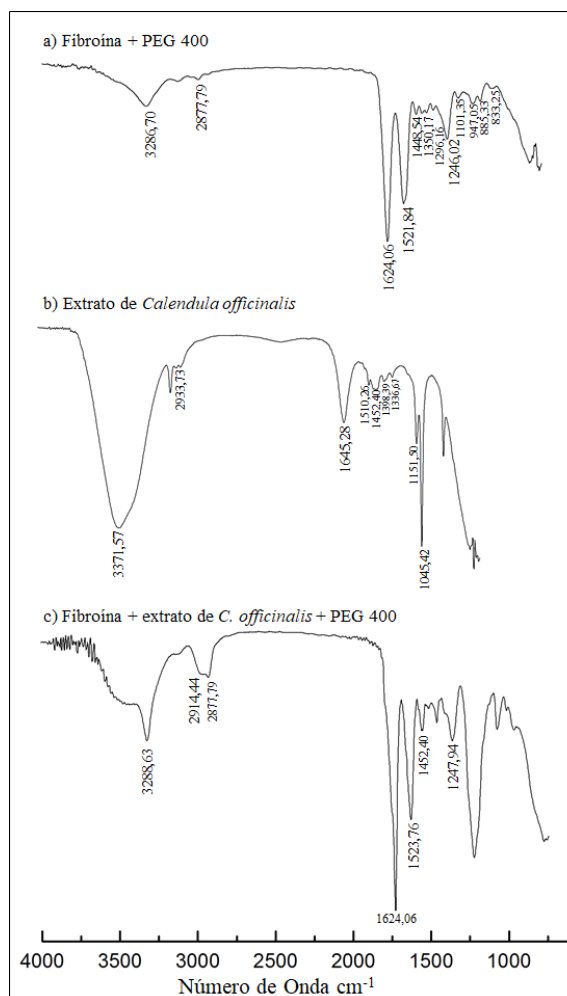
Os picos de absorção obtidos dos FH-FS + extrato de *Aloe vera* + PEG 400 (Figura 22c) foram de 1.624 cm^{-1} para a amida I; 1.527 cm^{-1} para amida II, sugerindo à conformação das folhas β da seda II; 1.244 cm^{-1} para a amida III. Os picos de absorção obtidos de FH-FS + extrato de extrato de *Aloe vera* + PEG 400 foram deslocados indicando uma provável interação química entre os componentes da formulação.

O extrato vegetal de *C. officinalis* (Figura 23b) exibiu um pico de absorção em 3.371 cm^{-1} , sendo este atribuído ao estiramento - OH da hidroxila fenólica. A banda de absorção em aproximadamente 2.933 cm^{-1} está relacionada a vibração de deformação axial da ligação C-H. Os picos de absorção entre 3.371 cm^{-1} e 2.933 cm^{-1} originam-se da deformação axial assimétrica (vas CH₂) e da ligação simétrica (vs CH₂). A absorção em 1.645 cm^{-1} é referente ao grupamento C=O, referindo-se a uma das bandas livres de interferência e maior reconhecimento do espectro de infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015).

A banda de absorção em 1.654 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) da rutina. Contudo, neste estudo, a banda de absorção observada para o extrato vegetal de *C. officinalis* foi deslocada para 1.645 cm^{-1} e o pico de absorção para o anel fenil C=C em 1.452 cm^{-1} (JIN et al., 2007).

O pico de absorção característico da deformação axial do grupo funcional (C–O) foi 1.045 cm^{-1} , enquanto a banda de absorção foi em torno de 1.336 cm^{-1} a qual remete-se ao estiramento C–O. Para a deformação angular assimétrica no plano do grupo metila, o pico de absorção foi 1.452 cm^{-1} . Com intensidade média, revela-se o pico em 1.398 cm^{-1} referente à deformação angular simétrica do grupamento metila -CH₃ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015).

Figura 23 - FTIR das amostras de FH-FS + extrato vegetal de *C. officinalis* + PEG 400



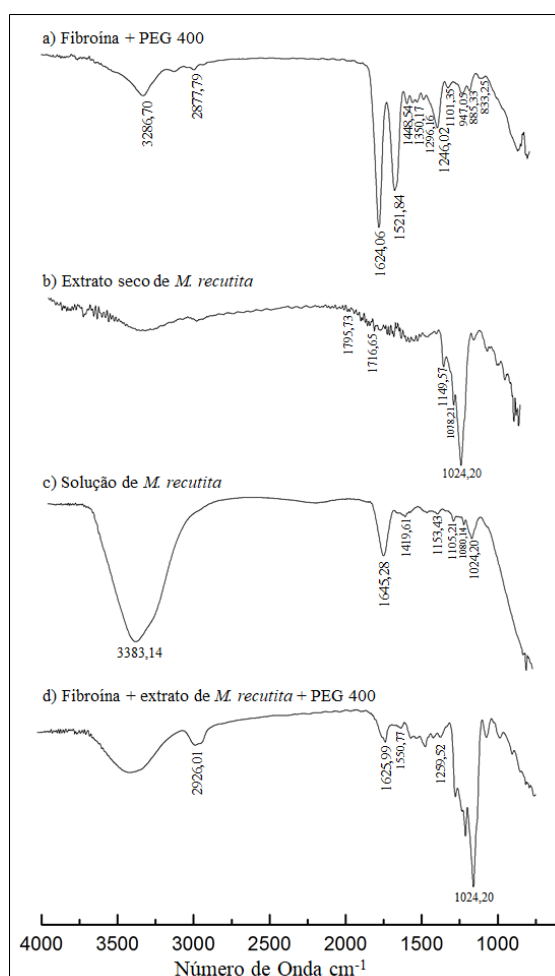
a) Fibróina de Seda + PEG 400 | b) Extrato de *C. officinalis* | c) Fibróina + extrato de *C. officinalis* + PEG 400
 FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibróina de seda | PEG 400: Polietilenoglicol |
C. officinalis: *Calendula officinalis*

Fonte: Elaboração própria.

Os picos de absorção específicos dos FH-FS+PEG 400+extrato de *C. officinalis* (Figura 23c) foram de $1,624\text{ cm}^{-1}$ relativo a amida I; $1,523\text{ cm}^{-1}$ para amida II, indicando à conformação das folhas β da seda II; $1,247\text{ cm}^{-1}$ para a amida III da FS. O estiramento obtido neste estudo para a identificação do PEG 400 no FH-FS+PEG+extrato de *C. officinalis* deslocou-se de $2,872\text{ cm}^{-1}$ (grupamento CH₂-CH₂) para $2,877\text{ cm}^{-1}$. O extrato vegetal de *C. officinalis* manteve um pico de absorção em $3,288\text{ cm}^{-1}$ o qual confere-se ao grupamento -OH. Porém, o espectro da banda de absorção relacionada à deformação axial da ligação C-H foi deslocado para $2,914\text{ cm}^{-1}$, quando comparado ao extrato vegetal de *C. officinalis*. O pico de absorção referente ao anel fenil (C=C) manteve-se em $1,452\text{ cm}^{-1}$.

Os espectros do extrato seco e da solução de *M. recutita* demonstrados na Figura 24 (b, c) apontou um pico de absorção entre $1,024$ e $1,105\text{ cm}^{-1}$ referente a presença de grupos de polifenóis. Para o grupo dominante, as bandas foram entre $1,080$ e $1,153\text{ cm}^{-1}$ e para as bandas intensivas $1,645$ e $1,419\text{ cm}^{-1}$. A banda de absorção em $1,645\text{ cm}^{-1}$ é responsável pela presença dos grupamentos típicos C-O e C-C para compostos polifenólicos (BIJACK et al., 2013).

Figura 24 - FTIR das amostras de FH-FS + extrato de *M. recutita* + PEG 400



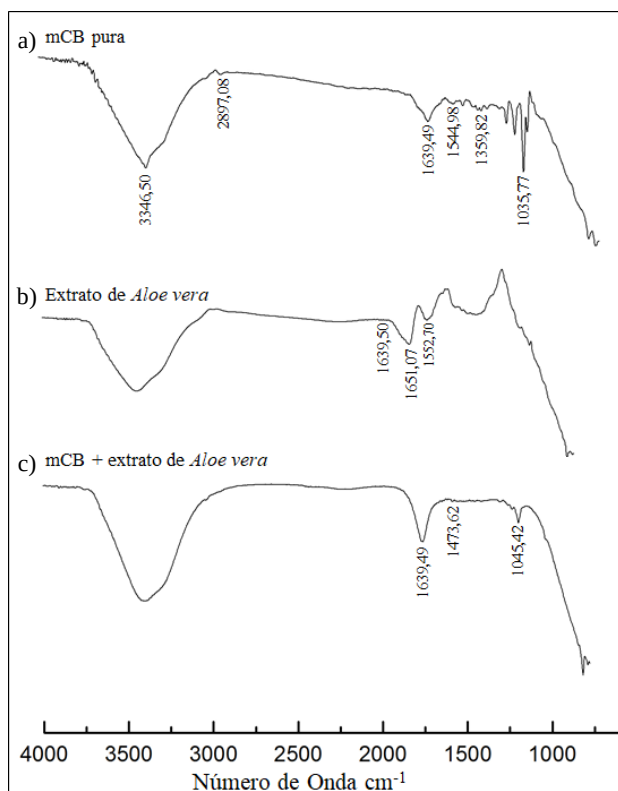
a) Fibroína de Seda + PEG 400 | b) Extrato seco de *M. recutita* | c) Solução de *M. recutita* | d) Fibroína + *M. recutita* + PEG 400
 FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | PEG 400: Polietilenoglicol | *M. recutita*: *Matricaria recutita*
 Fonte: Elaboração própria.

A banda em 1.716 cm^{-1} presente no espectro de infravermelho pertence a vibração de alongamento C=O, sendo este atribuído à presença de matricina. Além disso, a banda de absorção em 1.024 cm^{-1} pertence ao trecho de O-C-C, atribuído ao estiramento do éster (matricina). Em outros estudos, foram relatados picos entre 1.770 e 1.720 cm^{-1} nos espectros, cuja intensidade variou de médio a forte, sendo característica do extrato de *M. recutita*. A banda em 1.789 cm^{-1} refere-se ao alongamento C=O (CIKO et al., 2016). No entanto, a banda de absorção neste estudo, deslocou-se para 1.795 cm^{-1} .

Os picos de absorção obtidos para o FH-FS+extrato de *M. recutita*+PEG 400, apresentado na Figura 24d, foram de 1.625 cm^{-1} para a amida I. Para amida II 1.550 cm^{-1} o qual foi levemente deslocado, indicando à conformação das folhas β da seda II; 1.259 cm^{-1} para a amida III da FS. O estiramento para a identificação do PEG 400 no FH-FS+extrato de *Matricaria recutita*+PEG 400 obteve um pico de absorção em 2.926 cm^{-1} .

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam os espectros de infravermelho obtidos das mCB com ou sem extratos vegetais. As mCB foram analisadas por FTIR combinada com refletância total atenuada (ATR) com o objetivo de caracterizar quimicamente e identificar os grupos funcionais presentes nas amostras.

Figura 25 - FTIR da mCB + extrato de *A. vera*



mCB: membrana de Celulose Bacteriana | *A. vera*: *Aloe vera*

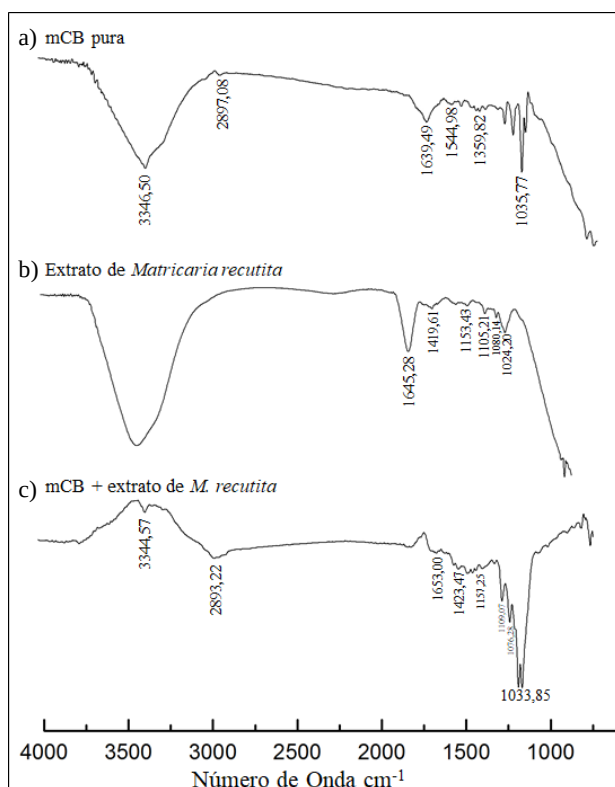
Fonte: Elaboração própria.

Para a mCB pura (Figura 25a, 26a e 27a) as principais bandas de absorção obtidas foram 3.346 cm^{-1} referente ao estiramento O-H; 2.897 cm^{-1} referente ao estiramento C-H; 1.639 cm^{-1} referente a deformação OH e 1.035 cm^{-1} referente a deformação C-O. Sendo estas, bandas próximas as encontradas por Barud et al. (2011). Observam-se, também que os espectros obtidos estão próximos aos descritos na literatura, onde bandas de absorção na região em 1.544 e 1.359 cm^{-1} referente ao grupamento NH_2 ; esta banda está associada à deformação axial do grupamento funcional C=O assim como a deformação do grupamento NH_2 de amidas primárias e secundárias (DELERIS; PETIBOIS, 2003; LIN et al., 2013; GODINHO, 2014).

As bandas de absorção presentes na região de 1.639 cm^{-1} na mCB+extrato de *Aloe vera* (Figura 25c) podem ser atribuídas a presença de grupo amino e de grupos amidas primárias e secundárias. Os estiramentos em 1.473 cm^{-1} conferem deformações axiais de amidas secundárias N-H presentes no extrato de *A. vera* (KLEMM et al., 2001; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). O pico de absorção encontrado em 1.035 cm^{-1} para mCB pura referente a deformação C-O foi deslocado para 1.045 cm^{-1} quando incorporado o extrato de *Aloe vera*. Desta forma, podemos identificar bandas de absorção tanto do extrato de *A. vera* como da mCB pura.

A mCB+extrato de *M. recutita* (Figura 26c) manteve os estiramentos característicos do extrato de *M. recutita* com pequeno deslocamento entre os picos obtidos quando não incorporado o extrato vegetal na mCB. Os picos de absorção foram deslocados para 1.033 e 1.109 cm^{-1} referente os grupos de polifenóis presentes no extrato de *M. recutita*. O grupo dominante de bandas obtiveram 1.076 e 1.157 cm^{-1} e as bandas intensivas 1.653 e 1.423 cm^{-1} . A banda de absorção em 1.653 cm^{-1} é responsável pela presença dos grupamentos típicos C-O e C-C, para compostos polifenólicos (BIJACK et al., 2013).

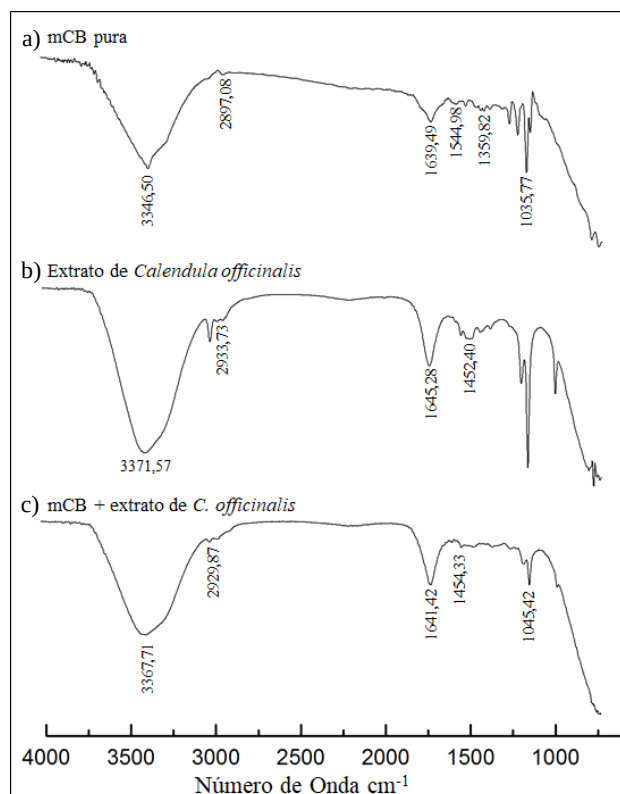
Pequenos deslocamentos foram obtidos para as bandas de absorção na mCB+*M. recutita* (Figura 26c) em 3.344 cm^{-1} referente ao estiramento O-H; 2.893 cm^{-1} referente ao estiramento C-H; 1.653 cm^{-1} referente a deformação OH e 1.033 cm^{-1} referente a deformação C-O (BARUD et al., 2011).

Figura 26 - FTIR da mCB + extrato de *M. recutita*

mCB: membrana de Celulose Bacteriana | *M. recutita*: *Matricaria recutita*
 Fonte: Elaboração própria.

A mCB+extrato de *C. officinalis* (Figura 27c) teve um leve deslocamento no pico de absorção em 3.367 cm^{-1} atribuída ao grupamento -OH quando comparada a mCB pura (Figura 25a, 26a e 27a). No entanto, o espectro da banda de absorção relacionada à deformação axial da ligação C-H foi deslocado em 2.929 cm^{-1} , quando comparado ao pico obtido apenas para o extrato vegetal de *C. officinalis*. A banda de absorção observada para o extrato de *C. officinalis* puro foi deslocada de 1.645 cm^{-1} para 1.641 cm^{-1} quando incorporado na mCB. O pico de absorção referente ao anel fenil (C=C) obteve um leve deslocamento para 1.454 cm^{-1} . A banda de absorção em 1.035 cm^{-1} característica da mCB foi deslocada para 1.045 cm^{-1} .

Figura 27 - FTIR da mCB + extrato de *C. officinalis*



mCB: membrana de Celulose Bacteriana | *C. officinalis*: *Calendula officinalis*
 Fonte: Elaboração própria.

8.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas dos FH-FS foram obtidos por análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) com e sem adição de extratos vegetais, os quais são demonstrados na Figura 28 (a, b, c). Os FH-FS pura e FH-FS+PEG 400 apresentaram um pico endotérmico próximo a 283 °C relativo a degradação térmica de FS em temperaturas inferiores a 290 °C são específicos da FS amorfa, ou seja, a seda I (MORAES et al., 2010).

O FH-FS+PEG 400 obteve dois eventos onde o primeiro ocorreu aproximadamente em 120 °C representando um evento endotérmico e um segundo pico foi visto em aproximadamente 290 °C no DSC, o qual está relacionado com a decomposição da estrutura da fibroína.

O mesmo evento endotérmico próximo a 283 °C é observado no FH-FS+A. vera+PEG 400 (Figura 28a), porém com menor intensidade, o que pode estar associado a uma menor estabilidade físico-química obtida pela incorporação da *A. vera* na formulação. O evento endotérmico em aproximadamente 120 °C presente no termograma FH-FS+PEG 400 (Figura 28a, b, c) está ausente no FH-FS+A. vera+PEG 400 (Figura 28a).

O mesmo evento endotérmico da FS próximo a 283 °C também é observado no FH-FS+*C. officinalis*+PEG 400 (Figura 28b), mas com menor intensidade quando comparado ao FH-FS pura e FH-FS+PEG400. Devido a menor estabilidade físico-química obtida pela incorporação dos extratos de *C. officinalis* e *A. vera* na formulação.

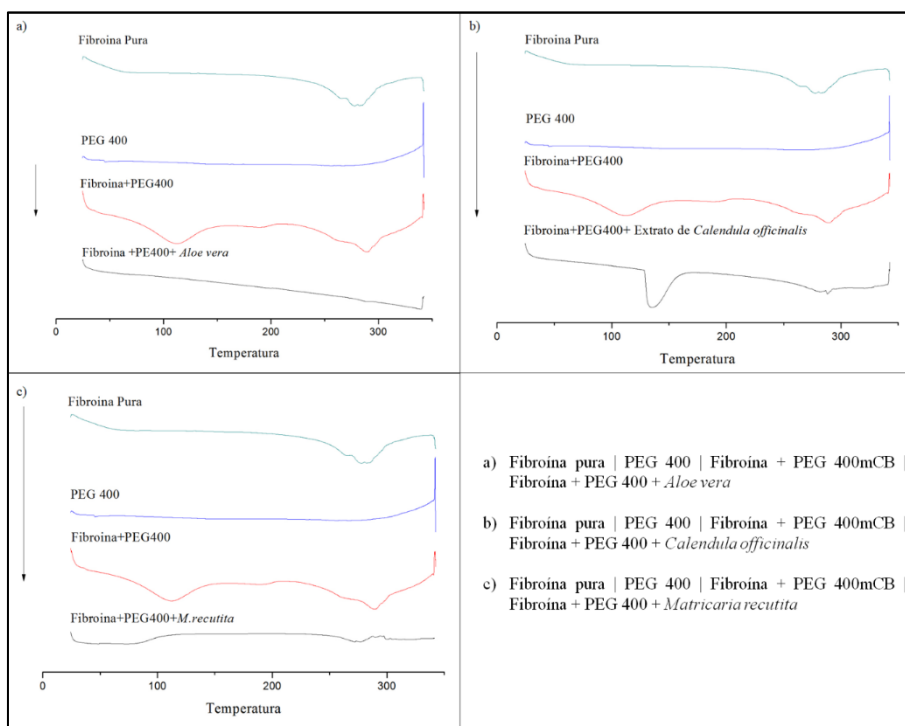
O FH-FS incorporado com extrato vegetal de *C. officinalis* (Figura 28b) demonstrou um evento endotérmico em aproximadamente 140 °C presente no termograma do FH-FS+*C. officinalis*+PEG 400, pico próximo ao alcançado também no FH-FS+PEG 400 (aproximadamente 120 °C), promovendo um aumento da estabilidade físico-química quando comparado a incorporação do extrato vegetal de *C. officinalis* na formulação.

Os termogramas dos FH-FS+*M. recutita*+PEG 400 observados na Figura 28c obteve um pico de absorção próximo a 283 °C porém com menor intensidade quando comparado com ao FH-FS pura e FH-FS+PEG 400. Fato este que também pode estar correlacionado a menor estabilidade físico-química obtida pela incorporação da *M. recutita* na formulação.

O evento endotérmico em aproximadamente 120 °C presente no termograma FH-FS+PEG 400 está ausente no FH-FS+*M. recutita*+PEG 400.

Sendo assim, a análise de DSC demonstrou que a incorporação dos extratos vegetais reduz levemente a intensidade da estabilidade físico-química da fibroína de seda.

Figura 28 - Termogramas das amostras de FH-FS



FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | PEG: Polietilenoglicol 400 | *M. recutita*: *Matricaria recutita*
 Fonte: Elaboração própria.

A análise dos termogramas da mCB pura e incorporada com os extratos vegetais de *A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita* são demonstrados na Figura 29 (a, b, c).

A mCB pura apresentou um leve pico endotérmico na faixa de temperatura de 45 °C. Este evento pode ser atribuído a desidratação da membrana ou a evaporação de água.

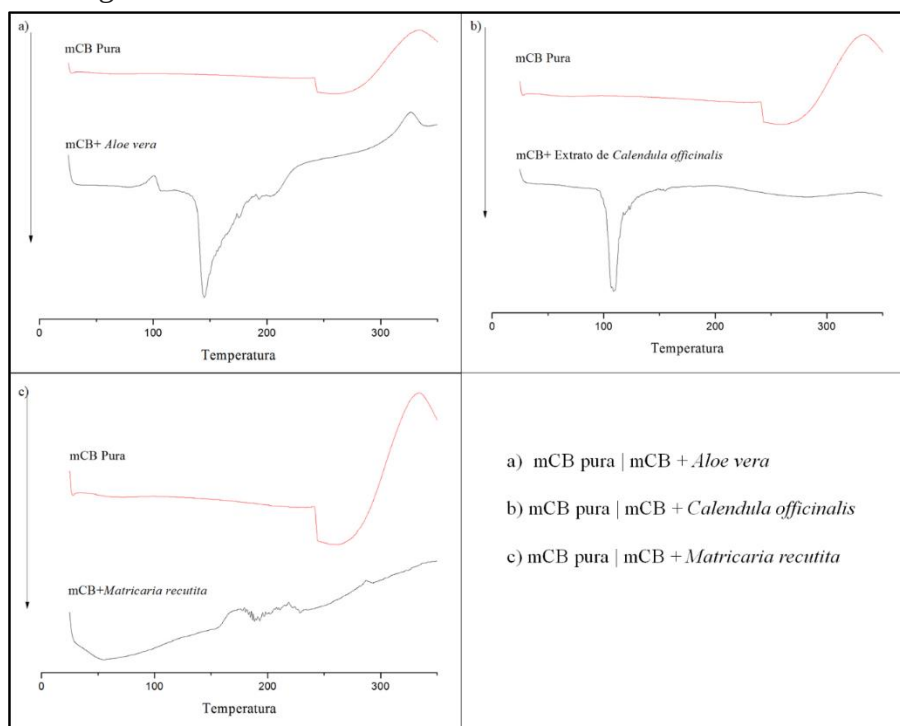
Um outro evento acentuado foi observado na faixa de temperatura que compreendeu o intervalo de 250 °C a 350 °C. Esse pico foi observado na curva de DSC através de um pico exotérmico em aproximadamente 340 °C, o qual está relacionado a processos de degradação da celulose (GEORGE et al., 2005).

O termograma da mCB+A. vera (Figura 29a) apresentou picos exotérmico em aproximadamente 100 °C e endotérmico em aproximadamente 145 °C. O pico exotérmico encontrado em aproximadamente 340 °C na mCB pura foi observado na mCB incorporada com extrato de *A. vera* em aproximadamente 330 °C, o qual está relacionado a degradação da mCB.

No entanto, o termograma da mCB+C. officinalis (Figura 29b) apresentou pico endotérmico em aproximadamente 120 °C.

A mCB+M. recutita (Figura 29c) apresentou picos endotérmicos em aproximadamente 60 °C e 230 °C e exotérmicos em aproximadamente 175 °C e 290 °C.

Figura 29 - Termogramas das amostras de mCB



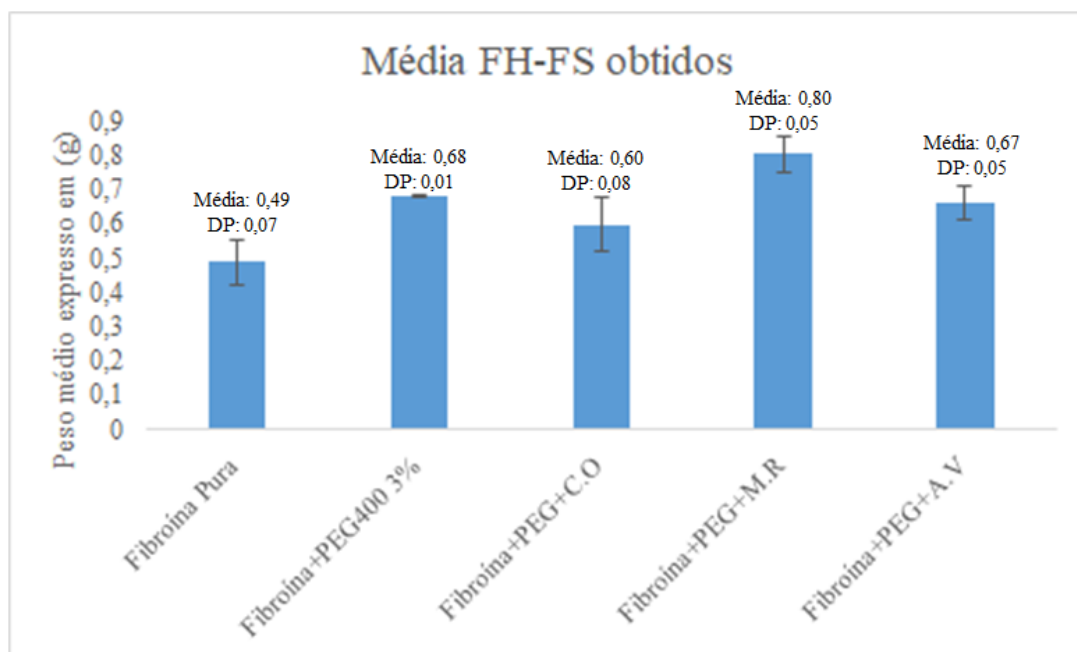
mCB: membrana de celulose bacteriana

Fonte: Elaboração própria.

8.8 Avaliação macroscópica

Os FH-FS apresentaram aspectos macroscópicos positivos, atendendo aos requisitos de integridade, ausência de bolhas de ar e resistência à manipulação manual. No entanto, não houve total homogeneização dos FH-FS quando adicionados de extratos vegetais. Os pesos médios dos FH-FS são representados na Figura 30.

Figura 30 - Média dos FH-FS obtidos em gramas (g)



DP: Desvio padrão | CO: *Calendula officinalis* | MR: *Matricaria recutita* | AV: *Aloe vera* | PEG 400: Polietilenoglicol 400 | FH-FS: filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda.
Fonte: Elaboração própria.

8.9 Propriedades fisiomecânicas

As propriedades fisiomecânicas de um material são analisadas a partir da aplicação de uma deformação ou tensão. Quando uma tensão ou deformação é constante, os ensaios são classificados como estáticos. No entanto, um ensaio de tensão ou deformação são destrutivos, pois ocorre a ruptura do corpo de prova (CASSU; FELISBERTI, 2005).

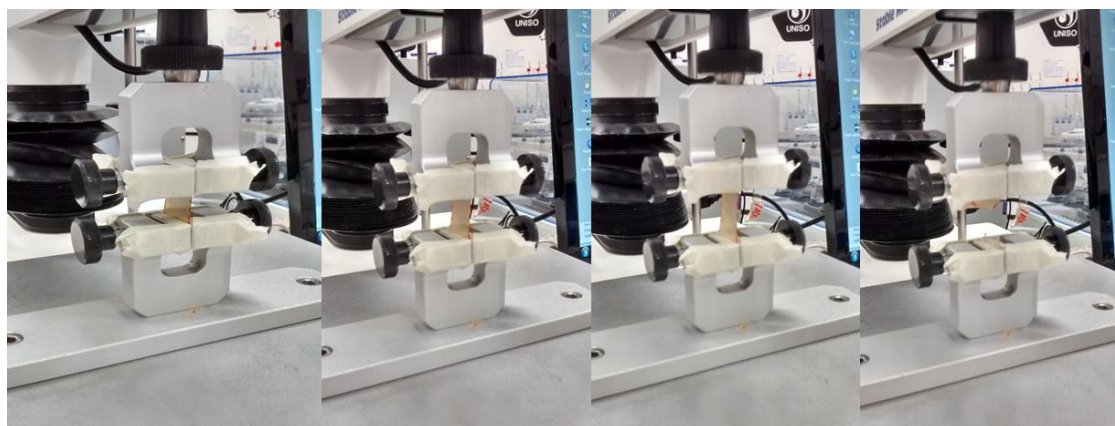
As propriedades mecânicas foram avaliadas utilizando texturômetro (Stable Micro Systems – TA-XT Plus Analyzer. Surrey, Reino Unido), conforme apresentado na Figura 31. Sendo, a Figura 32 uma ilustração do ensaio de tração mecânica.

Figura 31 –Texturômetro (Stable Micro Systems–TA-XT Plus Analyzer. Surrey, Reino Unido)



Fonte: Elaboração própria.

Figura 32 – Foto ilustrativa do ensaio de tração mecânica



Fonte: Elaboração própria.

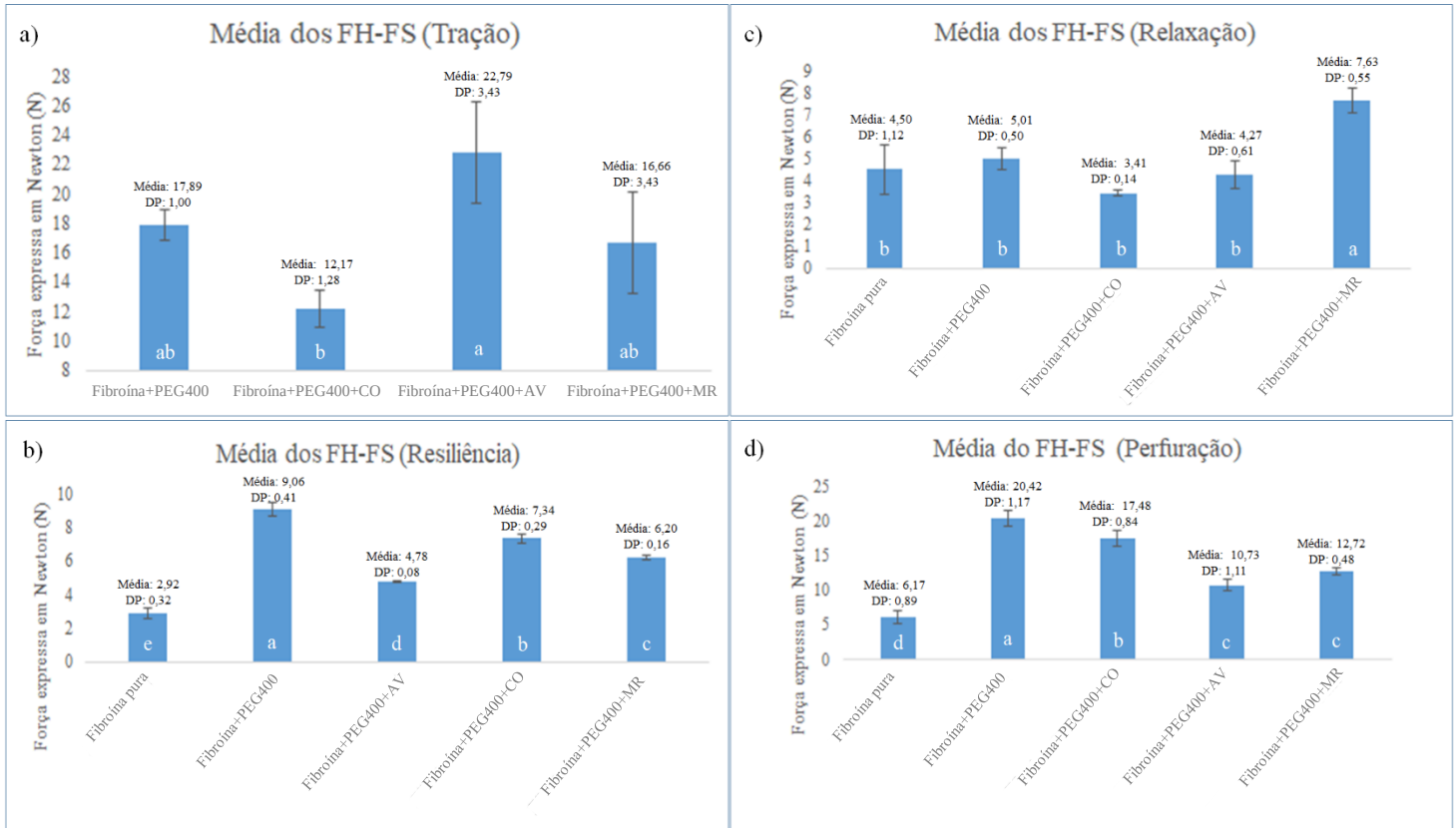
Os resultados da avaliação da resistência mecânica dos FH-FS à perfuração, tração, resiliência e relaxação bem como o tempo de resistência a cada medida de força em função do tempo, são representados na Tabela 7 e Figura 33 (a, b, c, d).

Tabela 7 – Média das propriedades fisiomecânicas de FH-FS em triplicata

	Tração (N)	Relaxação (N)	Resiliência (N)	Perfuração (N)
FH-FS+PEG 400	17,89 ± 1,00	4,45 ± 0,45	9,06 ± 0,41	19,81 ± 1,54
FH-FS+AV+PEG 400	22,78 ± 3,43	4,27 ± 0,61	4,78 ± 0,08	10,31 ± 1,23
FH-FS+MR+PEG 400	16,66 ± 3,43	7,63 ± 0,55	6,20 ± 0,16	12,72 ± 0,48
FH-FS+CO+PEG 400	12,17 ± 1,28	3,41 ± 0,14	7,34 ± 0,29	17,48 ± 0,84

FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | N: Força em Newton | PEG 400: Polietilenoglicol 400|
AV: *Aloe vera* | MR: *Matricaria recutita* | CO: *Calendula officinalis*

Fonte: Elaboração própria.

Figura 33 - Média das propriedades fisiomêcanicas dos FH-FS

FH-FS: filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* | MR: *Matricaria recutita* | DP: Desvio Padrão | PEG 400: Polietilenoglicol 400 | N: Newton.

Nota: Letras iguais indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias.

Fonte: Elaboração própria.

Considerando a relação entre os resultados FH-FS+*A. vera*+PEG 400, apresentaram maior resistência à tração (Figura 33a), isto pode ser devido a presença da mucilagem da *A. vera* a qual melhorou a capacidade de deformação elástica e plástica dos FH-FS, quando comparados aos FH-FS+PEG 400. O extrato vegetal de *A. vera* favoreceu a formação de interações entre as cadeias poliméricas levando ao aumento da força de tração do FH-FS+AV+PEG 400. Contudo, essa diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$), mostrando que a incorporação do extrato vegetal não altera a resistência à tração e ruptura.

A ruptura dos FH-FS envolve a quebra das ligações entre as cadeias poliméricas, a diminuição da rigidez dos FH-FS obtidos nos ensaios de perfuração (Figura 33d) mostra que a incorporação dos extratos vegetais nos FH-FS+PEG 400, resultou em diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, exceto para as amostras contendo extrato vegetal de *A. vera* e *M. recutita*.

Isoladamente todos os filmes hidrogelatinosos suportam mais de 1 Kg de pressão sobre uma película de 3 x 2 cm.

A análise de resiliência é um conceito relacionado à propriedade de que são atribuídos alguns materiais de acumular energia quando submetido a um estresse sem ocorrer ruptura (ALMEIDA et al., 2015). É possível observar que houve uma diminuição na propriedade elástica dos FH-FS após a incorporação dos extratos vegetais.

A propriedade de resiliência (elasticidade) dos FH-FS está diretamente relacionada com a resistência à manipulação industrial ou manual pelos possíveis usuários. Os FH-FS+PEG 400 apresentou maior valor de resiliência (Figura 33b), medida que está relacionada com a capacidade de sofrer uma deformação sem sofrer alteração, quando comparado ao FH-FS+PEG 400 com adição de extrato vegetal. Isso indica que o PEG 400 promoveu um aumento da elasticidade dos FH-FS. No entanto, há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre todas as amostras.

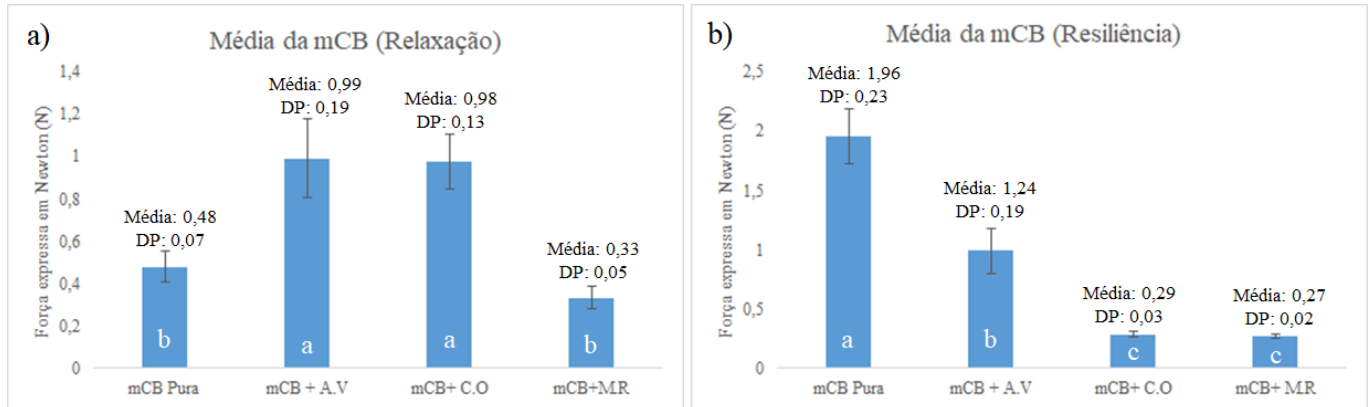
O resultado da avaliação da relaxação dos FH-FS (Figura 33c) indica que após adição dos extratos vegetais houve uma reticulação entre as cadeias poliméricas, onde esse parâmetro está diretamente relacionado com a disposição destas cadeias e consequentemente com a taxa de liberação de fármacos.

Da mesma forma, manter as propriedades de relaxação (flexibilidade) contribui para a adequação do filme durante o movimento corporal do paciente.

Entretanto, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas, exceto para a amostra de FH-FS+MR+PEG 400 que há diferenças estatística significativa ($p < 0,05$).

A Figura 34a apresenta os resultados da avaliação da relaxação das mCB indicando que, após a adição dos extratos vegetais houve um aumento da flexibilidade nas mCB+A. vera e mCB+C. officinalis, com exceção da mCB+M. recutita e mCB pura. Porém, não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras mCB+ A. vera e mCB+ C. officinalis e entre mCB+ M. recutita e mCB pura. A mCB pura apresentou maior valor de resiliência, medida que está relacionada com a capacidade de sofrer uma deformação sem sofrer alteração, quando comparado a mCB com adição de extrato vegetal. No entanto, há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, apresentadas na Figura 34b.

Na Tabela 8 são demonstradas as propriedades fisiomecânicas das mCB.

Figura 34 - Média mCB pura e com adição de extratos vegetais

mCB: membrana de Celulose Bacteriana | DP: Desvio Padrão | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* | MR: *Matricaria recutita* | N: Newton.

Nota: Letras iguais indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 – Propriedades fisiomecânicas mCB

	Tração (N)	Relaxação (N)	Resiliência (N)	Perfuração (N)
mCB pura	NR	0,49±0,07	1,96±0,23	NR
mCB + AV	NR	0,99±0,19	0,99±0,19	NR
mCB + MR	NR	0,33±0,05	0,27±0,02	NR
mCB + CO	NR	0,98±0,13	0,29±0,03	NR

mCB: membrana de Celulose Bacteriana | N: newton | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* |

MR: *Matricaria recutita* | NR: Não realizado | ±: Desvio padrão

Fonte: Elaboração própria.

Comparando as propriedades fisiomecânicas apresentadas pelos FH-FS e mCB foi possível constatar que as mCB são mecanicamente menos resistentes.

8.10 Propriedades mucoadesivas

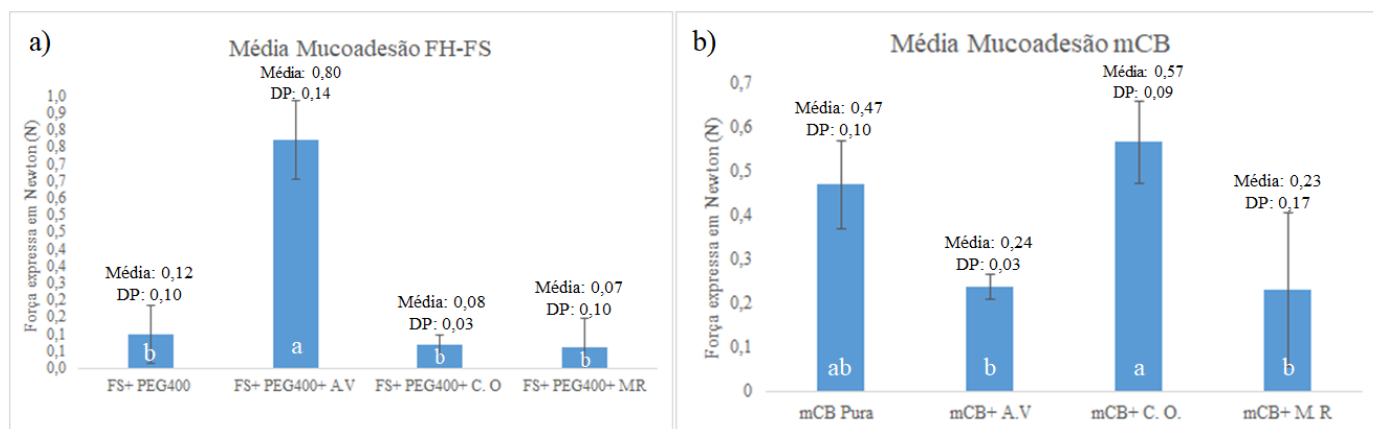
O termo mucoadesão pode ser usado para se referir ao subgrupo de bioadesão e, mais especificamente, nos casos em que a formulação interage com a camada de muco que recobre o tecido mucosal. A maioria dos métodos são baseados na mimetização das condições *in vivo*. Os parâmetros de mucoadesão podem ser avaliados por diferentes métodos *in vivo*, *ex - vivo* ou *in vitro*, as medidas das propriedades de mucoadesão é medida pelo tempo de contato ou pela força requerida para separar a formulação do tecido (*ex - vivo*) ou de discos de mucina (*in vitro*) (CHIVA CARVALHO; CHORILLI; DAFLON GREMIÃO, 2014).

A Figura 35a, apresenta os resultados obtidos para as propriedades mucoadesivas dos FH-FS. A presença de extrato vegetal de *A. vera* (FH-FS+PEG400+AV) aumentou

significativamente ($p < 0,05$) a propriedade mucoadesiva dos FH-FS+PEG 400 comparados aos sem adição de extrato vegetal. Fato este pode estar correlacionado a presença da mucilagem de *A. vera*. Porém, a presença dos extratos vegetais de *C. officinalis* e *M. recutita* (FH-FS+PEG+*C. officinalis* e FH-FS+PEG+*M. recutita*) não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) quanto a propriedade mucoadesiva quando comparadas aos FH-FS+PEG400. Assim, a formulação de filmes hidrogelatinosos com maior potencial para propriedade mucoadesiva é a formulação contendo extrato vegetal de *A. vera*.

A Figura 35b, apresenta os resultados obtidos para as propriedades mucoadesivas da mCB. A presença de extrato vegetal de *C. officinalis* (mCB+*C. officinalis*) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a propriedade mucoadesiva da mCB quando comparada a mCB com extrato de *A. vera* e *M. recutita*. No entanto, não há diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre as amostras de mCB pura quando comparadas a mCB com extrato vegetal de *C. officinalis*, *A. vera* e *M. recutita*.

Figura 35 – Média mucoadesão FH-FS e mCB



DP: Desvio Padrão | FS: Fibroína de Seda | FH-FS: filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | mCB: membrana de celulose bacteriana | N: Newton.

Nota: Letras iguais indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias.

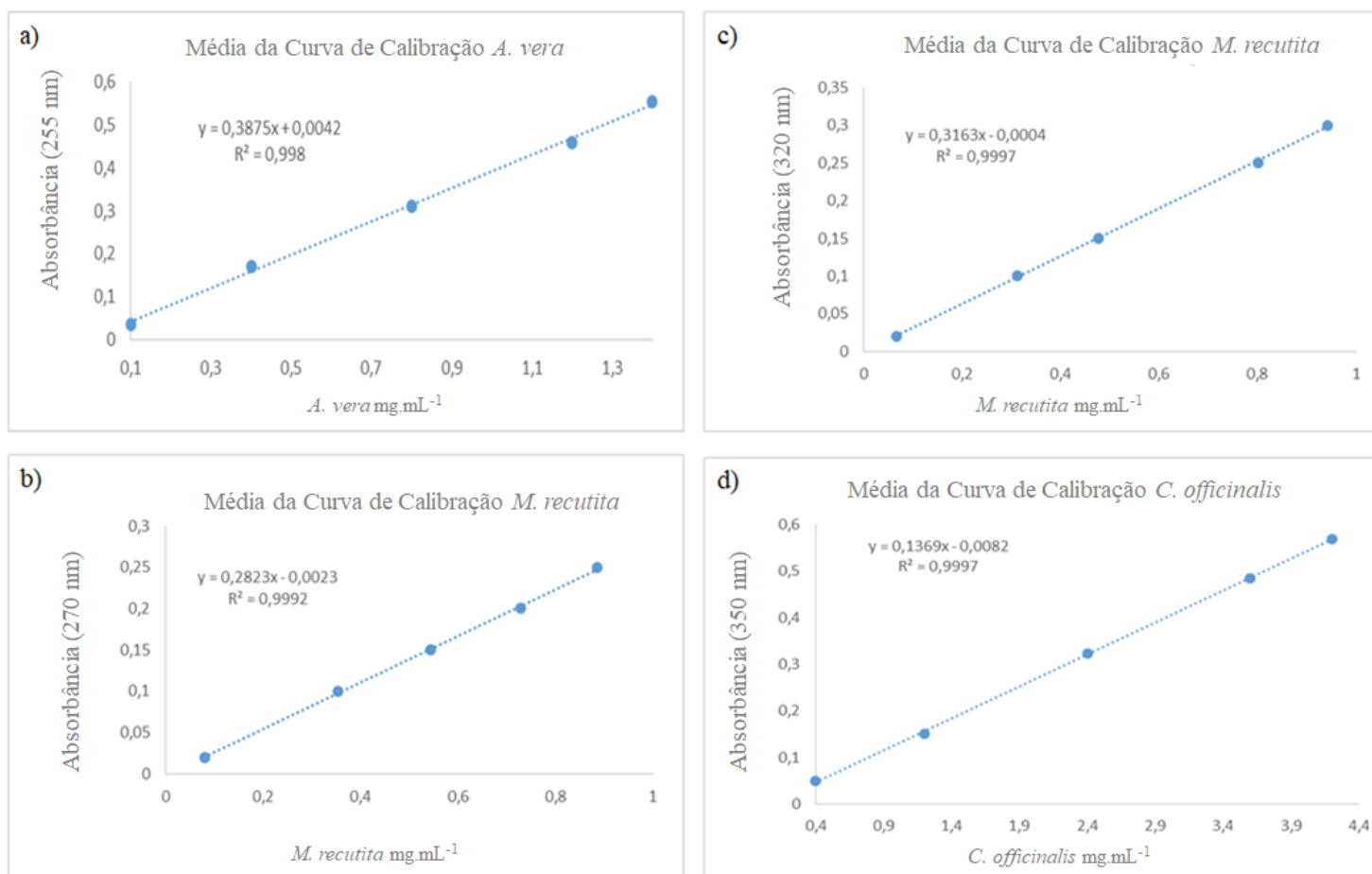
Fonte: Elaboração própria.

As propriedades mucoadesivas apresentadas pelos FH-FS e mCB mostram que as mCB possuem um aumento da propriedade mucoadesiva quando comparada aos FH-FS exceto para a amostra de FH-FS+PEG400+AV, a qual pode estar relacionada a melhor biocompatibilidade da mucilagem com o biopolímero empregado.

8.11 Espectrofotometria em número de onda na região UV e construção da curva analítica para os extratos vegetais

A varredura espectral de absorção no UV - visível mostrou o pico máximo de absorção dos números de onda dos extratos vegetais determinadas por espectroscopia UV ($\lambda=255$ nm) para *A. vera* (YANG; YAO; FANG, 2010), espectroscopia UV ($\lambda=350$ nm) para *C. officinalis* (NUNES, 2008) e espectroscopia UV ($\lambda=270$ e 320 nm) para *M. recutita* (ZAGUE et al., 2009). Os métodos analíticos para quantificação dos extratos vegetais foram aceitos pela confirmação da linearidade na faixa de 0,1 a 1,4 mg/mL⁻¹ para *A. vera*, linearidade na faixa de 0,4 a 4,2 mg/mL⁻¹ para *C. officinalis* e linearidade na faixa de 20 a 300 µg/mL⁻¹ para *M. recutita*. Os resultados das médias de duas determinações obtidos com a curva analítica são apresentados na Figura 36. O coeficiente de correlação linear (r) foi determinado conforme Tabela 9 indicando relação funcional linear entre a concentração dos extratos vegetais e as respectivas bandas de absorção.

Figura 36 - Curva Analítica dos extratos vegetais



A. vera: Aloe vera | *M. recutita*: Matricaria recutita | *C. officinalis*: Calendula officinalis

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 - Valores da equação da reta e coeficiente de regressão da curva analítica dos extratos vegetais analisados

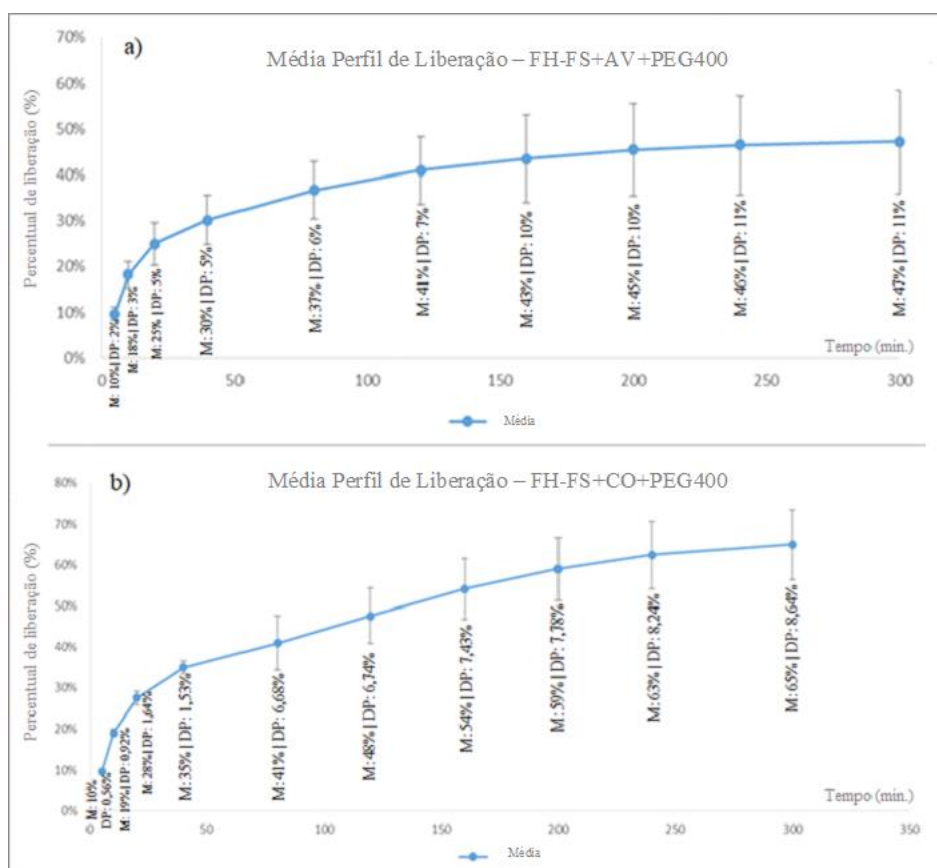
Parâmetros avaliados	Resultados analíticos
Equação da reta <i>Aloe vera</i>	$y = 0,3832x - 0,0089$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9976
Equação da reta <i>Calendula officinalis</i>	$y = 0,1371x - 0,0082$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9985
Equação da reta <i>Matricaria recutita</i> (270 nm)	$y = 0,0035x - 0,007$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9994
Equação da reta <i>Matricaria recutita</i> (320 nm)	$y = 0,0032x - 0,0003$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9997

Fonte: Elaboração própria.

8.12 Perfil de liberação dos extratos vegetais incorporados em FH-FS

O perfil de liberação dos FH-FS foi construído para avaliar a liberação dos extratos vegetais durante 5 horas. Para as formulações de FH-FS+AV+PEG 400 (Figura 37a) e FH-FS+CO+PEG 400 (Figura 37b) o percentual de liberação ao longo de 300 minutos é em média de 47% e 65%, respectivamente.

Figura 37 – Perfil de liberação dos extratos vegetais de AV e CO

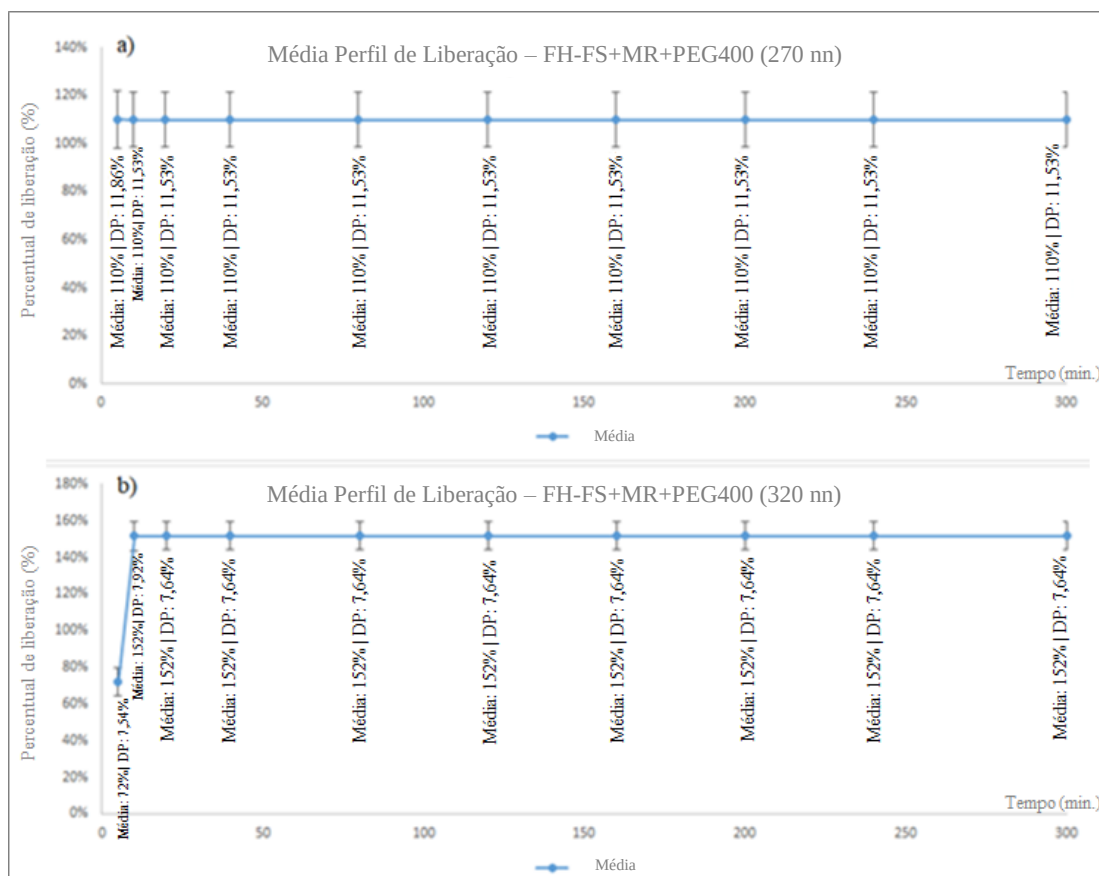


FH-FS: Filmes hidrogelatinosos de fibroína de Seda | AV: *Aloe vera* | CO: *Calendula officinalis* | PEG400: Polietilenoglicol 400 | M: Média | DP: Desvio padrão | min.: minutos

Fonte: Elaboração própria.

A análise desses resultados com base no percentual liberado e no perfil das curvas mostra que a liberação dos ativos vegetais FH-FS+AV+PEG 400 e FH-FS+CO+PEG 400 poderia acontecer gradualmente, por um intervalo de tempo maior que 300 min. A massa dos extratos vegetais liberada da formulação FH-FS+CO+PEG 400 nos 300 min. é maior que a massa liberada para FH-FS+AV+PEG 400. Este fato pode ser atribuído a afinidade dos diferentes extratos utilizados pelo polímero. Esse perfil de liberação/dissolução favorece uma ação terapêutica mais efetiva do extrato de *C. officinalis* nos primeiros 300 min., com manutenção da ação terapêutica a partir desse tempo, uma vez que o percentual liberado foi de 65%. Enquanto que para a formulação de FH-FS+MR+PEG 400 em dois números de ondas distintos são apresentados na Figura 38 (a, b). O percentual de liberação para o número de onda (270 nm) foi de 110% em apenas 5 minutos. Enquanto que para o número de onda (320 nm) o percentual de liberação foi de 72% em 5 minutos. Onde no tempo de 10 minutos, já havia total liberação do ativo.

Figura 38 – Média perfil de liberação do extrato vegetal de MR



FH-FS: filmes hidrogelatinosos de fibroína de seda | MR: *Matricaria recutita* | PEG400: Polietilenoglicol 400 | M: Média | DP: Desvio padrão | min.: minutos

Fonte: Elaboração própria.

A avaliação do perfil de liberação dos FH-FS incorporado com os extratos vegetais demonstrou uma liberação controlada durante um intervalo de 300 min. Onde os FH-FS+CO+PEG400 liberou 65% do ativo, enquanto que para FH-FS+AV+PEG400 foi de 47%. Este fato pode estar relacionado as diferentes afinidades de cada extrato pelo polímero.

Para os FH-FS+MR+PEG400 o percentual foi liberado totalmente em apenas dez minutos. Este resultado pode ser explicado pela exposição das folhas betas da fibroína o que torna o filme insolúvel em meio aquoso. Neste caso os extratos não estão incorporados, mas adsorvidos na superfície dos filmes.

Entretanto, a mCB incorporada com os extratos vegetais não foi apresentada pois, uma vez que no período de cinco minutos já havia um maior percentual de liberação dos extratos quando comparado com a concentração teórica pré-determinada. Portanto, para que possamos transpor resultados confiáveis e robustos, se faz necessário a repetição do perfil de liberação da mCB.

9 CONCLUSÃO

Este estudo teve como finalidade preparar e caracterizar FH-FS reforçados com PEG 400 e mCB adicionados de extratos vegetais padronizados de *A. vera*, *C. officinalis* e *M. recutita*.

Os resultados obtidos na avaliação das propriedades fisiomecânicas dos FH-FS foram superiores as de mCB. Os FH-FS+PEG400 apresentaram as melhores propriedades fisiomecânicas, exceto para o ensaio de tração FH-FS+PEG400+AV. No entanto, essa diferença não é estatisticamente significativa quando comparado aos outros filmes. A adição dos extratos vegetais ocorre uma leve redução das propriedades fisiomecânicas. Todos os FH-FS+PEG400 com e sem adição de extratos vegetais mostraram-se mais flexíveis.

O perfil de liberação controlada apresentado pelos FH-FS permitiu um maior tempo de liberação do extrato, exceto para FH-FS+PEG400+MR.

O método de difusão em ágar permitiu identificar que a mCB possui melhor atividade antimicrobiana quando comparada com FH-FS. Fato este que pode estar relacionado a afinidade dos extratos vegetais nos diferentes biopolímeros.

Na avaliação das propriedades mucoadesivas verificou-se que a mCB apresentou um aumento da propriedade mucoadesiva quando comparada com o FH-FS, exceto para a amostra de FH-FS+PEG400+AV, a qual pode estar relacionada à somatória do efeito da mucilagem dada *A. vera* com o biopolímero empregado.

Os espectros obtidos na análise por FTIR mostraram que as propriedades físico-química dos extratos não foram alteradas na presença de mCB e FH-FS. Entretanto, os eventos endotérmicos e exotérmicos observados nos FH-FS e mCB com extrato vegetal sugere uma leve redução da estabilidade físico-química quando comparados sem adição de extratos vegetais.

O conjunto dos resultados obtidos sugerem que os materiais utilizados para a obtenção dos FH-FS e mCB podem ser utilizados para veiculação de extratos de plantas medicinais. Contudo o sucesso do projeto depende do biopolímero escolhido e da técnica de preparação. Ao usar fibroína da seda o procedimento técnico deve ser cuidadosamente escolhido para evitar exposição das folhas beta, devido à baixa solubilidade desta conformação da fibroína em água.

REFERÊNCIAS

- ADALI, T. et al. PEG–calf thymus DNA interactions: Conformational, morphological and spectroscopic thermal studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 373-378, 2013.
- AiNAOUI, A.; VERGNAUD, J. Effect of the nature of the polymer and of the process of drug release (diffusion or erosion) for oral dosage forms. **Computational and Theoretical Polymer Science**, v. 10, n. 5, p. 383-390, 2000.
- ALCANTARA JR, P. Espectroscopia molecular. **Curso Física Moderna II**, 2002.
- ALMEIDA, D. M. et al. Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 4, 2013.
- ALMEIDA, N. M. G. et al. A novel dosage form for buccal administration of bupropion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 91-100, 2015.
- ALMEIDA, N. M. G.; LOPES, T.; CHAUD, M. V. Desenvolvimento de uma formulação de cloridrato de metoclopramida sob a forma de filme hidrogelatinoso. **Rev Bras Farm**, v. 93, n. 1, p. 114-119, 2012.
- ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.
- ALVES, T. F. Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis termorresponsivos para administração vaginal e veiculação de curcumina. 2016. 139p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2016.
- AMARAL, W. et al. Desenvolvimento, rendimento e composição de óleo essencial de camomila [*Chamomila recutita* (L.) Rauschert] sob adubação orgânica e mineral. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 10, n. 4, p. 1-8, 2008.
- ANTONIO, R. V. et al. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 176, 2012.
- ARMENTANO, I. et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polymer degradation and stability**, v. 95, n. 11, p. 2126-2146, 2010.
- BARNES, J. et al. **Herbal medicines**. 3^a ed. Pharmaceutical Press London, 2007.
- BARUD, H. S. et al. Bacterial cellulose/poly (3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1279-1284, 2011.
- BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BEXIGA, N. M. et al. Production and characterization of fibroin hydrogel using waste silk fibers. **Fibers and Polymers**, v. 18, n. 1, p. 57-63, 2017.

BIJAK, M. et al. The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 218-229, 2013.

BINYAMIN, G.; SHAFI, B. M.; MERY, C. M. Biomaterials: a primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery*. Elsevier, p. 276-283, 2006.

BRASIL; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Diretoria Colegiada. **Instrução Normativa n. 5, de 11 de dezembro de 2008**. ANVISA. Brasília: Diário Oficial da União p. 242: 3, 2008.

BRASIL; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 5ª edição. Brasília: ANVISA 2010.

BRASIL; Ministério da Saúde; Portal da Saúde – SUS. Assistência Farmacêutica. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples**. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 17/09/2017.

BRASIL; Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa n. 2, de 13 de maio de 2014**. ANVISA. Brasília: Diário Oficial da União 90: 1 p. 2014.

BRASIL; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Memento Fitoterápico. Farmacopeia Brasileira, 1ª edição**. ANVISA. 2016.

BUZZI, O.; YUAN, S.; ROUTLEY, B. Development and Validation of a New Near-Infrared Sensor to Measure Polyethylene Glycol (PEG) Concentration in Water. **Sensors**, v. 17, n. 6, p. 1354, 2017.

CAPAR, G.; AYGUN, S. S.; GECIT, M. R. Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery. **Journal of membrane science**, v. 325, n. 2, p. 920-931, 2008.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química nova**, 2005.

CAVALIERI, S.; ASF, M. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology. **Pan American Health Organization**, 2005.

CHANG, X. L. et al. Effects of heat treatments on the stabilities of polysaccharides substances and barbaloin in gel juice from *Aloe vera* Miller. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 2, p. 245-251, 2006.

CHEN, X. et al. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 09969-09974, 2001.

CHIVA CARVALHO, F.; CHORILLI, M.; DAFLON GREMIÃO, M. P. Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos-propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 2, 2014.

CHOI, S.; CHUNG, M.-H. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in integrative medicine*. Elsevier. p.53-62, 2003.

CIKO, L. et al. A Study on Oil Extraction from Albanian Chamomile and Characterization by IR Spectroscopy. **J. Int. Environmental Application & Science**, v. 11, n. 2, p. 154-158, 2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—8th Edition 2003. **NCCLS** document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CÔRTEZ, M. A. et al. Imunomodulação de Fagócitos do Sangue Humano pelo Extrato de Strychnos Pseudoquina ST. HILL Adsorvido em Microesferas de Polietilenoglicol. **Polímeros**, v. 23, n. 3, p. 402-409, 2013.

DA SILVA, N. et al. Aloe Vera: Extrato a base de seu Gel e Usos. 2013.

DAT, A. D. et al. Aloe vera for treating acute and chronic wounds. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, 2012.

DE PAULA RAMOS, A.; PIMENTEL, L. C. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização/Effectiveness of Aloe vera on the tissue repair and healing process. **Brazilian Journal of Health**, v. 2, n. 1, 2013.

DELERIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, n. 1, p. 129-136, 2003.

DONINI, Í. A. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, 2010.

DOS SANTOS, S. A.; VIDIGAL, P. G.; MERLINI, L. S. A criação do Bombyx mori (bicho-da-seda) e as principais doenças. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 57-64, 2011.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 355-366, 2002.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. **Chamomile: industrial profiles**. Medicinal and aromatic plants – industrial profiles, New York: Taylor and Francis Group. CRC press, 2005.

FREITAS, V.; RODRIGUES, R.; GASPI, F. Pharmacological activities of Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

GARCIA-SEGOVIA, P. et al. Osmotic dehydration of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller). **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 2, p. 154-160, 2010.

GAZOLA, A. M.; FREITAS, G.; BATISTA EVANGELISTA-COIMBRA, C. C. O uso da Calendula officinalis no tratamento da reepitelização e regeneração tecidual. **UNINGÁ Review**, v. 20, n. 3, 2014.

GE, Z. et al. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 41, n. 5, p. 673-680, 2012.

GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. **Progress in materials science**, v. 54, n. 3, p. 397-425, 2009.

GEORGE, J. et al. Characterization of chemically treated bacterial (Acetobacter xylinum) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 189-194, 2005.

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M.; RAD, M. M. Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, p. 344-349, 2016.

GODINHO, J. F. Hidrogéis de celulose bacteriana incorporados com frações de Aloe vera. 2014. 116p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2014.

GOUDARZI, M. et al. Aloe vera gel: effective therapeutic agent against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from burn wound infections. **Chemotherapy research and practice**, v. 2015, 2015.

GRELA, K. P.; MARCINIAK, D. M.; PLUTA, J. Stability Evaluation of Thermosensitive Drug Carrier Systems Based on Pluronic F-127 Polymer. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 12-14, 2014.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1599-1616, 2008.

HE, Q. et al. Quality and safety assurance in the processing of Aloe vera gel juice. **Food control**, v. 16, n. 2, p. 95-104, 2005.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.

HOLANDA, P.; MATA, S.; LIMA, A. Propriedades físicas e secagem de casulos do bicho-da-seda em leito fixo: uma investigação teórica e experimental. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 101-114, 2004.

HURLER, J. et al. Improved texture analysis for hydrogel characterization: gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 1, p. 180-188, 2012.

JARRAHI, M. An experimental study of the effects of *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino rats. **Natural product research**, v. 22, n. 5, p. 422-427, 2008.

JOZALA, A. F. et al. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 115-121, 2015.

JIN, G.-P. et al. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica acta**, v. 52, n. 7, p. 2535-2541, 2007.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. Seminars in pediatric surgery. Elsevier, p. 112-118, 2014.

KHALID, K. A.; DA SILVA, J. T. Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 12-27, 2012.

KIM, U-J. et al. Structure and properties of silk hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 786-792, 2004.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.

KUNDU, S. **Silk biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine**. Elsevier, 2014. ISBN 0857097067.

KURKIN, V.; SHAROVA, O. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. **Chemistry of natural compounds**, v. 43, n. 2, p. 216-217, 2007.

LI, Y.-P. et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **Journal of controlled release**, v. 71, n. 2, p. 203-211, 2001.

LIN, W.-C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 603-611, 2013.

LIU, T.-L. et al. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 11, n. 1, p. 10-16, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais Do Brasil Nativas e Exóticas**. 2ed. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum, 544p, 2008.

MAGHAMI, P. et al. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 3, p. 376-383, 2010.

MARK, J.; CALVERT, P. Biomimetic, hybrid and in situ composites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 1, n. 3, p. 159-173, 1994.

MARTINS, M. D. et al. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. **Phytotherapy research**, v. 23, n. 2, p. 274-278, 2009.

MATANOVIĆ, M. R.; KRISTL, J.; GRABNAR, P. A. Thermoresponsive polymers: insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 472, n. 1, p. 262-275, 2014.

MENÉNDEZ, A. B. et al. Actividad Cicatrizante y Ensayos de Irritación de la Crema de Calendula officinalis al 1%. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 811, 2007.

MENESES-REYES, J. C. et al. Optimización del proceso de extracción de flavonóides de flor de manzanilla (Matricaria recutita L.). **Agrociencia**, v. 42, n. 4, p. 425-433, 2008.

MOGHBEL, A.; GHALAMBOR, A.; ALLIPANAH, S. Wound healing and toxicity evaluation of Aloe vera cream on outpatients with second degree burns. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 157-160, 2007.

MOGOŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International journal of pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127-136, 2014.

MOLINA, M. A.; RIVAROLA, C. R.; BARBERO, C. A. Study on partition and release of molecules in superabsorbent thermosensitive nanocomposites. **Polymer**, v. 53, n. 2, p. 445-453, 2012.

MORAES, M. A. D. et al. Preparation and characterization of insoluble silk fibroin/chitosan blend films. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 719-727, 2010.

MUNIR, N. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species atropa belladonna and matricaria chamomilla. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 5, p. 111-117, 2014.

NICOLAOU, N.; GOODACRE, R. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Analyst**, v. 133, n. 10, p. 1424-1431, 2008.

NISHIKAWA, D. et al. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 227-232, 2007.

NOGUEIRA, G. M.; BEPPU, M. M. Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. In: **8º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Águas de Lindóia, p. 430-431, 2005.

NOGUEIRA, G. M. et al. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8446-8451, 2010.

NOGUEIRA, G. M. et al. Hydrogels from silk fibroin metastable solution: formation and characterization from a biomaterial perspective. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p. 997-1001, 2011.

NUNES, K. M. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L. 2008. 141p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

PADAMWAR, M. N. et al. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 4, p. 250-257, 2005.

PAIM, L. F. N. A. et al. Assessment of plant development, morphology and flavonoid content in different cultivation treatments of *Calendula officinalis* L., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 974-980, 2010.

PARENTE, L. M. L. et al. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 6, n. 2, 2002.

PARENTE, L. M. L. et al. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil Healing effect and antibacterial activity of *Calendula officinalis* L. cultivated in Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 383-391, 2009.

PARENTE, L. M. L. et al. *Aloe vera*: características botânicas, fitoquímicas e terapêuticas. **Arte Méd Ampl**, v. 33, n. 4, p. 160-4, 2013.

PATEL, A.; MEQUANINT, K. Hydrogel biomaterials. In: (Ed.). **Biomedical engineering-frontiers and challenges**. InTech, 2011.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. 127p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, SP. 2005

PINTO, T. D. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. Atheneu, 2003. ISBN 857454082X.

PORTELLA, D. L. et al. Avaliação histopatológica das queimaduras de 2º grau em dorso de ratos tratadas com curativo de celulose bacteriana. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba. ISSN eletrônico 1984-4840**, v. 18, n. Supl., p. 92, 2016.

PREDA, R. C. et al. Bioengineered silk proteins to control cell and tissue functions. **Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications, Second Edition**, p. 19-41, 2013.

REBELO, M. A. Desenvolvimento e caracterização de scaffold com potencial para aplicação na regeneração de tecido ósseo. 2015. 104p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2015.

RECOUVREUX, D. D. O. S. Produção de celulose bacteriana: identificação do Operon bcs e produção de biofilme celulósico por *Chromobacterium violaceum*. 2004.

RIBEIRO, M. et al. Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 66-77, 2015.

RODRIGUES, P. O.; GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L.(Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, 2004.

ROCKWOOD, D. N. et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature protocols**, v. 6, n. 10, 2011.

ROLIM, A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005.

ROSS, S. M. Chamomile: a spoonful of medicine. **Holistic nursing practice**, v. 22, n. 1, p. 56-57, 2008.

SAIBUATONG, O.-A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455-460, 2010.

SALERNO, A.; PASCUAL, C. D. Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 826-838, 2015.

SANTOS, E. O. Aloe Vera e o cuidado com feridas: Uma revisão sistemática. 2017.

SANTOS JUNIOR, A. R. D. Cultura de células vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli (L-ácido láctico). 2001.

SASHINA, E. S. et al. Structure and solubility of natural silk fibroin. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 869-876, 2006.

SASHINA, E. et al. Silver nanoparticles on fibers and films of *Bombyx mori* silk fibroin. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 974-980, 2009.

SCHNEIDER, F.; DANSKI, M. T. R.; VAYEGO, S. A. Uso da *Calendula officinalis* na prevenção e tratamento de radiodermatite: ensaio clínico randomizado duplo cego. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 2, p. 221-228, 2015.

SHEZAD, O. et al. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 173-180, 2010.

SIEPMANN, J.; GÖPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 48, n. 2, p. 229-247, 2001.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural product research**, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2012.

SILVA, C. D. M. D. et al. Estudo farmacobotânico e fitoquímico de *Matricaria recutita* (camomila). **Anais do Salão de Ensino e de Extensão**, p. 269, 2012a.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro. **7ª ed. Rio de Janeiro: LTC**, 2015.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: a herbal medicine of the past with a bright future. **Molecular medicine reports**, v. 3, n. 6, p. 895-901, 2010.

STANLEY, M. C.; IFEANYI, O. E.; EZIOKWU, O. G. Antimicrobial effects of Aloe vera on some human pathogens. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1022-1028, 2014.

SWETHA, M. et al. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2010.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M; Herbarium compêndio de fitoterapia. **4ª ed. Curitiba/PR: Herbarium Lab. Botânico**, 317p. 2001.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655-663, 2009.

VARKEY, A. et al. Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. Suppl 1, p. 43, 2015.

VELASCO, M. V. et al. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.

VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8, p. 991-1007, 2007.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, 2010.

WANG, S. et al. Properties of silk fibroin/poly (ethylene glycol) 400 blend films. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 21, n. 1, p. 87-91, 2003.

WANG, Y. Biadaptability: an innovative concept for biomaterials. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 801-809, 2016.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.

YANG, Q.-Y.; YAO, C.-S.; FANG, W.-S. A new triglucosylated naphthalene glycoside from Aloe vera L. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 59-62, 2010.

XU, X. et al. 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.

ZAGUE, V. et al. Ação de extratos vegetais de camomila, macela e arnica do Brasil, no processo de modificação da cor dos cabelos, em diferentes veículos extratores. 2009.

ZHOU, P. et al. Effects of pH and calcium ions on the conformational transitions in silk fibroin using 2D Raman correlation spectroscopy and ¹³C solid-state NMR. **Biochemistry**, v. 43, n. 35, p. 11302-11311, 2004.

ANEXO A – ALOE VERA



Aprovado

Certificado de Análise

ALOE VERA GEL CONCENTRADO

Lote: 240616.01818

Fabricação: 24-06-2016

Vencimento: 24-06-2017

Data de Aprovação: 13/07/2016

Rev.5 - IOLIVEIR - 05/07/2016 16:52:09

Informações Gerais		Especificação	
Cód. Produto	200320		
Conservantes	Metilparabeno		
Droga Vegetal : Derivado Vegetal	8 - 12:1		
Excipientes	Nenhum		
Família	Xanthorrhoeaceae Dumort.		
Nome Científico	Aloe vera (L.) Burm. f.		
Nome do Produto	Aloe Vera Gel Concentrado 2,7 - 3,3% Polissacarídeos Totais		
Origem da Droga Vegetal	Brasil		
Pais de Fabricação	Brasil		
Parte Usada	Gel Proveniente de Folha		
Processo de Produção	Concentração		
Organoléptico		Especificação	Resultado
Aspecto	Líquido Espesso		Líquido Espesso
Cor	Amarelo Claro a Rosado		Amarelo
Físico-Químico		Especificação	Resultado
Densidade (g/mL)	Informativo		1,34
pH direto	Informativo		3,8
Resíduo Seco (%)	Informativo		7,5
Teor		Especificação	Resultado
Teor - Polissacarídeos Totais (%)	2,70 - 3,30		3,25
Microbiológico		Especificação	Resultado
Contagem Total de Bactérias	< 10.000 UFC/mL		< 10 UFC/mL
Aeróbias			
Contagem Total de Fungos e Leveduras	< 1.000 UFC/mL		10 UFC/mL
Contaminantes		Especificação	
Política de Contaminantes:	O monitoramento de contaminantes é realizado de acordo com procedimentos internos estabelecidos pelo fabricante.		

Produto não destinado ao consumidor final. É responsabilidade do cliente assegurar o uso e suas condições, de acordo com as regulamentações vigentes nos mercados de comercialização.

Armazenamento: O produto deve ser armazenado em recipientes fechados, protegidos do calor e da umidade. Embalagens abertas devem ser fechadas imediatamente.

Embalagem: Bombona plástica com 25 kg.

Validade: A validade deste produto é de 1 ano quando armazenado sob as condições especificadas.

Juliane Batista
Juliane Cristina Paes Batista
Responsável Técnico CRF: 76.254

ANEXO B – CALENDULA OFFICINALIS



Certificado de Análise

Este certificado é a garantia da qualidade do seu produto Bio Tae

AUTORIZ/MS: 1.08330.0

Nº CEVS: 355400301-211-000001-1-6

Reg. IBAMA: 5535531

CRF/SP Nº: 55052

Inscrição Municipal: 3081200

Data de Emissão: 07/12/2016

Produto: 102297 - CALENDULA EXT FLUIDO - EX

Nome Científico: (*calendula officinalis*, linne)

Família: ASTERACEAE

Parte Utilizada: FLOR

Ratio: 1:2

Data de Fabricação: 21/10/2016

Análise: 016675

Lote: 025085

Origem/Procedência: NACIONAL

Solvente de Extração: ÁLCOOL DE CEREALIS E ÁGUA

Excipiente: N.A.

Validade: 21/10/2018

Nº Fracionamento: 002469

Método de Produção: MACERAÇÃO E PERCOLAÇÃO

Análise	Especificação	Resultado
FISICO-QUÍMICAS		
ASPECTO	LIQUIDO LIMPIDO E HOMOGENEO	CONFORME
COR	CASTANHO A CASTANHO ESCURO	CONFORME
ODOR	CARACTERISTICO	CONFORME
PH	4,0 A 7,0	5,35
TEOR ALCOOLICO	30°GL A 60°GL	42
SOLUBILIDADE	SOLUVEL EM ALCOOL E AGUA	CONFORME
DENSIDADE	0,900 G/ML A 0,980 G/ML	0,945
INDICE DE REFRACAO	1.340 ND A 1.380 ND	1.372
RESIDUO SECO	INFORMATIVO %	8,5
PRINCÍPIOS ATIVOS E/OU MARCADORES		
DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS CALCULADOS COMO HIPEROSÍDEO	0,8 MG/ML A 1,0 MG/ML	0,84
TESTES DE PUREZA E INTEGRIDADE		
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTOXICOS E AFINS	INFORMATIVO	AUSENTE
MICOTOXINAS	INFORMATIVO	NÃO SE APLICA
MICROBIOLÓGICAS		
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS	<1000 UFC/G	<10
CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS	<100 UFC/G	<10
PESQUISA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	AUSENTE	AUSENTE
PESQUISA DE SALMONELLA	AUSENTE	AUSENTE
PESQUISA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	AUSENTE	AUSENTE
PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS	AUSENTE	AUSENTE
PESQUISA DE COLIFORMES FECAIS	AUSENTE	AUSENTE

Metodologia: Farmacopéia Brasileira 5ª Edição

Alteração de cor e/ou decantação poderá ocorrer devido se tratar de produto natural.

Conservar hermeticamente ao abrigo da luz, em local seco e arejado, longe de umidade e calor.

A validade será desconsiderada caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.

Informações: Consulte nosso departamento técnico

Thais H. B. Estanagel
Farmacêutica Responsável
CRF/SP 43.787

Inajara Anai de Lima
Farmacêutica Controladora de Qualidade
CRF/SP 66.126

Bio Tae Ind. e Com. de Insumos Farmacêuticos Cosméticos e Alimentícios Eireli – EPP / biotae@biotae.com.br / www.biotae.com.br
Rua: Derville Gabriel Pereira, 310 - Centro Empresarial de Tatui - Tatui - SP Fone Coml: (11)5589-5666 – Fone Fáb: (11) 3259-5705

ANEXO C – MATRICARIA RECUTITA



Especificação CAMOMILA EXTRATO SECO

RQ2-059 Rev.02		Rev.2 - LCUNHA - 29/01/2016 09:39:50
Informações Gerais	Especificação	
Cód. Produto	200057	
Conservantes	Nenhum	
Droga Vegetal - Derivado Vegetal	1,5 - 3,5:1	
Excipientes	Maltodextrina e Dióxido de Silício	
Família	Asteraceae Bercht. & J. Presl	
Nome Científico	Matricaria chamomilla L.	
Nome do Produto	Camomila Extrato Seco 0,85 - 1,15% Apigenina-7-O-Glicosídeo	
Origem da Droga Vegetal	Brasil	
País de Fabricação	Brasil	
Parte Usada	Capítulo Floral	
Processo de Produção	Extração / Concentração / Secagem	
Solventes	Água e Etanol	
Organoléptico	Especificação	Método/Referência
Aspecto	Pó Fino Higroscópico	IT2-100 / Farm. Bras.
Cor	Pardo a Pardo Esverdeado	IT2-100 / Farm. Bras.
Físico-Químico	Especificação	Método/Referência
Densidade Aparente (g/L)	Informativo	IT2-100 / Farm. Bras.
Determinação de Água (%)	Máx. 5,0	IT2-052 / Método Interno
Granulometria (%)	Informativo Passa em 40 Mesh	IT2-107 / Método Interno
Solubilidade em Água	Ligeiramente Solúvel a Pouco Solúvel	IT2-100 / Farm. Bras.
Substâncias Extraíveis em Etanol (mg/g)	Informativo	IT2-100 / Farm. Bras.
Teor	Especificação	Método/Referência
Teor - Apigenina-7-O-Glicosídeo (%)	0,85 - 1,15	IT2-161 / USP
Microbiológico	Especificação	Método/Referência
Contagem Total de Bactérias Aeróbias	< 10.000 UFC/g	IT2-046 / USP, Farm. Eur., Farm. Bras.
Contagem Total de Fungos e Leveduras	< 1.000 UFC/g	IT2-046 / USP, Farm. Eur., Farm. Bras.
Escherichia coli	Ausente em 10g	IT2-047 / USP, EP, Farm. Bras.
Salmonella sp	Ausente em 10g	IT2-047 / USP, Farm. Eur., Farm. Bras.
Contaminantes	Especificação	Método/Referência
Metais Pesados Totais (ppm)	Máx. 20,0	IT2-077 / Farm. Bras.
Política de Contaminantes:	O monitoramento de contaminantes é realizado de acordo com procedimentos internos estabelecidos pelo fabricante.	
Identificação	Especificação	Método/Referência
Perfil Cromatográfico Camomila	Positivo	IT2-215 / Farm. Bras.
Produto não destinado ao consumidor final. É responsabilidade do cliente assegurar o uso e suas condições, de acordo com as regulamentações vigentes nos mercados de comercialização.		
Armazenamento: O produto deve ser armazenado em recipientes fechados, protegidos do calor e da umidade. Embalagens abertas devem ser fechadas imediatamente.		
Embalagem: Caixa de papelão com 25 kg contendo embalagem plástica dupla.		
Validade: A validade deste produto é de 1 ano quando armazenado sob as condições especificadas.		