



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**DIANA NAOMI MIURA TOYAMA  
NATÁLIA FREITAS FERREIRA**

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DE FITOTERÁPICOS A NANOFIBRAS  
ELETROFIADAS VIA SOLUÇÃO DE QUITOSANA**

2017

**DIANA NAOMI MIURA TOYAMA  
NATÁLIA FREITAS FERREIRA**

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DE FITOTERÁPICOS A NANOFIBRAS  
ELETROFIADAS VIA SOLUÇÃO DE QUITOSANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Doutoranda Tabata Prado Sato

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Toyama, Diana Naomi Miura

Influência da inclusão de fitoterápicos a nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana / Diana Naomi Miura Toyama; Natália Freitas Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.  
29 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: . Alexandre Luiz Souto Borges.

1. Betula. 2. Eletrofiação. 3. Quitosana. 4. Rosmarinus. I. Ferreira, Natália Freitas. II. Borges, . Alexandre Luiz Souto, orient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

Prof. Dr. João Mauricio Ferraz da Silva

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Odontologia Restauradora

São José dos Campos, 06 de novembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

Agradecemos primeiramente a Deus, que foi quem nos deu forças nos diversos momentos de dificuldade e desespero.

A instituição de ensino ICT UNESP, seremos eternamente gratas por todo o conhecimento adquirido durante esses últimos anos.

Ao nosso orientador Alexandre Luiz Souto Borges por todo o ensinamento e risadas, além de nos proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

O nosso agradecimento em especial a Tabata Prado Sato, que compartilhou seus conhecimentos, não medindo esforços, mesmo fora de hora, final de semana, em e-mail ou pessoalmente, jamais deixou de nos atender e foi fundamental, tanto na nossa formação quanto na elaboração deste trabalho, sendo não somente nossa orientadora, como uma amiga que iremos levar para sempre no coração.

Aos nossos pais, Alice e Frederico, Rosemary e Clélio, que sempre estiveram ao nosso lado, nos apoiando psicologicamente e incentivando para que corrêssemos com determinação atrás do que almejamos.

Àqueles que amamos e compartilhamos a vida, Lucas e Louize, pela paciência durante nossas ausências e apoio nos momentos em que mais precisávamos, que foram fundamentais para termos forças e chegarmos até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter nos dado saúde e força para superar todas as dificuldades. A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbramos um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes. A nossa orientadora, Tabata Prado Sato, por todo o aprendizado, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelos incentivos e bons momentos vividos. Aos nossos pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. E a todos, que direta ou indiretamente, fizeram parte da nossa formação, a nossa eterna gratidão.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível." (Charles Chaplin)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Materiais utilizados</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Preparo da solução</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2.1 Solução de quitosana pura (Ch)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2.2 Solução de quitosana com alecrim (ChAl)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.3 Solução de quitosana com bétula (ChB)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Eletrofição</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 Análise em microscópio eletrônico de varredura</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 Análise de imagem</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5.1 Análise de diâmetro de fibras</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5.2 Contabilização dos grânulos</b> .....	<b>16</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Análise em microscopia eletrônica de varredura</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Análises de imagem</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.1 Análise do diâmetro médio de fibras</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2 Análise de formação de grânulos</b> .....	<b>21</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>



Toyama DNM, Ferreira NF. Influência da inclusão de fitoterápicos a nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

A quitosana é um biopolímero de ampla utilização na síntese de biomateriais. Juntamente, o uso de fitoterápicos cresce por apresentar propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória. Assim, objetivou-se a caracterização morfológica das fibras eletrofiadas via solução de quitosana, associadas aos fitoterápicos alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) e bétula (*Betula pendula*). Para isso, preparou-se três soluções, uma de quitosana pura (Ch), uma com inclusão do extrato de alecrim (ChAl) e outra com inclusão de bétula (ChB). Estas foram eletrofiadas sob diferentes parâmetros: tensão elétrica, distância e razão de fluxo, gerando membranas diferenciadas (1, 2, 3, 4). Assim, análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura para mensuração do diâmetro médio de fibras e contabilização de grânulos. As micrografias com formação efetiva de fibras foram analisadas em software de imagem. Foi possível observar diferença estatística da média de diâmetro ( $p < 0,0001$ ) entre as três membranas de quitosana com alecrim, ChAl1 ( $0,64 \pm 0,31 \mu\text{m}$ ) e ChAl2 ( $2,04 \pm 0,80 \mu\text{m}$ ) e ChAl3 ( $2,03 \pm 0,52 \mu\text{m}$ ) e com relação à formação de grânulos, houve diferença significativa ( $p = 0,0002$ ) entre ChAl1 e ChAl2 em relação à ChAl3. Já as membranas de quitosana com bétula, apresentaram semelhança estatística entre ChB3 ( $0,70 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ) e ChB4 ( $0,77 \pm 0,33 \mu\text{m}$ ), apresentando maiores diâmetros que ChB1 ( $0,40 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ) e ChB2 ( $0,56 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ). Além disso, ChB exibiu formação de grânulos com diferença significativa dentre as combinações de parâmetro de síntese ( $p < 0,0001$ ) sendo ChB4 ( $1,312 \pm 1,662 \mu\text{m}$ ) a de menor formação. Com isso, é possível concluir que a inclusão dos fitoterápicos *Betula pendula* e *Rosmarinus officinalis L.* influencia a morfologia das fibras de quitosana.

Palavras-chave: Betula. Eletrofição. Quitosana. Rosmarinus.

Toyama DNM, Ferreira NFF. Influence of phytotherapeutic inclusion to chitosan solution electrospun nanofibers [graduation final work]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

## **ABSTRACT**

A wide use of chitosan biopolymer in the synthesis of biomaterials is remarkable. Together, the use of herbal medicines in the health area grows to present antimicrobial and anti-inflammatory properties. Thus, the objective of this study was the morphological characterization of the chitosan solution electrospun fibers associated with rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and birch (*Betula pendula*). For this, three solutions were prepared, one of pure chitosan (Ch), one with rosemary extract (ChA1) and another with birch (ChB) inclusion. These were electrospun under different parameters: electric voltage, distance and flow rate, generating differentiated membranes. Thus, analyzes were performed in Scanning Electron Microscope to measure the mean diameter of fibers and counting of granules. The micrographs with effective fiber formation were selected for analysis in software image. It was possible to observe statistical difference of the mean diameter ( $p < 0.0001$ ) between the three membranes of chitosan with rosemary, ChA1 ( $0.64 \pm 0.31 \mu\text{m}$ ) and ChA2 ( $2.04 \pm 0.80 \mu\text{m}$ ) and ChA3 ( $2.03 \pm 0.52 \mu\text{m}$ ). Regarding the formation of granules, significant difference ( $p = 0.0002$ ) between ChA1 and ChA2 and ChA3. However, the chitosan membranes with birch, presented a statistical similarity between ChB3 ( $0.70 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ) and ChB4 ( $0.77 \pm 0.33 \mu\text{m}$ ), presenting larger diameters than ChB1 ( $0.40 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ) and ChB2 ( $0.56 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ). In addition, ChB exhibited granule formation with significant differences among combinations of synthesis parameters ( $p < 0.0001$ ) with ChB4 ( $1,312 \pm 1,662 \mu\text{m}$ ) being the one of smaller formation. With this, it is possible to conclude the inclusion of the phytotherapeutics *Betula pendula* and *Rosmarinus officinalis* L. influences the morphology of the chitosan fibers.

**Keywords:** *Betula*. Electrochemistry. Chitosan. *Rosmarinu*

## 1 INTRODUÇÃO

Há mais de um século, observa-se a constante procura por materiais que possuam características adequadas para restauração de substituição total ou parcial de tecidos biológicos no corpo humano [1], visando uma recomposição mais próxima possível da ideal para anatomia e função da região comprometida [2]. Com isso, em meio ao desenvolvimento tecno-científico [3], notou-se uma significativa evolução na ciência dos biomateriais.

Sendo assim, biomateriais podem ser tanto de origem natural quanto sintética com propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos, de modo a estimular uma resposta de regeneração satisfatória [4]. Este material deve possuir características como biocompatibilidade, não demonstrar imunogenicidade grave ou citotoxicidade [5]; ter estabilidade biológica e química e boas propriedades mecânicas [6].

Nesse contexto, a nanotecnologia promove estudos quanto a aplicação dos biopolímeros. As nanofibras poliméricas apresentam diversas características relevantes como alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro), gerando uma maior área para um mesmo volume de fibras, o que é muito importante para fenômenos de superfície, que são potencializados pela criação dessa enorme área superficial [7].

A eletrofiação, dessa maneira, apesar de não ser uma tecnologia nova, tem sido relatada há décadas atrás [8, 9], conquistando a cada dia mais espaço nas áreas biomédicas por apresentar-se como um método relativamente simples e de baixo custo para a produção de fibras em escala nanométrica [10,11].

Tal técnica consiste na aplicação de forças eletrostáticas e de arraste à um sistema que contém uma solução em uma seringa com um capilar metálico e um anteparo coletor. Quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da solução polimérica ou do polímero fundido, um jato carregado da solução é ejetado, sendo que, durante o trajeto o solvente da solução evapora e o polímero se solidifica, formando uma manta de nanofibras que é depositada em um coletor metálico [12, 13].

A morfologia das fibras eletrofiadas são determinadas pelas características da solução polimérica (tensão superficial e viscosidade), pelos parâmetros do processo (tensão elétrica, distância do capilar ao coletor e razão de fluxo) e parâmetros ambientais (temperatura e umidade relativa) [14, 15].

Quanto à porosidade das fibras eletrofiadas, por exemplo, entende-se como resultado do tipo de evaporação do solvente da solução polimérica; estes poros afetam as propriedades mecânicas das fibras, tais como resistência à tração e módulo de elasticidade [15, 16].

Para isso, diversos polímeros são estudados, especialmente biopolímeros naturais, tais como a quitosana. Este biopolímero é obtido a partir da desacetilação da quitina, segundo mais abundante na natureza depois da celulose, cuja fonte natural primária é a carapaça de crustáceos (6), sendo possível uma variedade de fontes naturais tais como caranguejos, camarão e lagosta [17].

A quitosana, composta por uma amina primária e dois grupos hidroxila livres, pode ser expressa pela fórmula geral  $C_6H_{11}O_4N$ . A presença de grupos amina na estrutura da quitosana é quem promove solubilidade em soluções diluídas aquosas e ácidas. O peso molecular e grau de desacetilação são os principais parâmetros que definem a solubilidade e as propriedades físico-químicas desse polímero [17].

Para que a quitosana seja eletrofiada, é importante que solventes voláteis e com baixo ponto de ebulição sejam introduzidos à solução, como é o caso do ácido trifluoracético (TFA) e o diclorometano (DCM), que foram os solventes utilizados. Tais substâncias dissolvem as moléculas do biopolímero para que haja formação do jato de eletrofiação e, em seguida, transportam as moléculas dissolvidas de quitosana para o coletor [16].

Esse polímero apresenta características como hidrofiliabilidade [6], biocompatibilidade [6], o material não demonstra imunogenicidade grave ou citotoxicidade [5], biodegradabilidade [6], mucoadesão [18], bioatividade [19], atividade antimicrobiana [20,21] e anti-inflamatória.

Dessa forma, devido as suas interessantes propriedades biológicas, ou seja, por ser de origem natural e ser encontrada em abundância [16], a quitosana é utilizada na agricultura associada ao controle de agentes patogênicos, já que possui capacidade de afetar diretamente o crescimento de microrganismos [22]; na indústria alimentar para a conservação de alimentos devido ao seu caráter antibacteriano e antifúngico [16] e na área biomédica, utilizada como matéria prima de materiais para liberação controlada de fármacos e regeneração tecidual [23, 24].

Nesse sentido, o uso de plantas medicinais na área da saúde vem aumentando nas últimas décadas no mundo todo [25]. Produtos naturais têm sido a base para o tratamento de diversas doenças há séculos e o conhecimento destes

ainda é a principal fonte terapêutica para um grande número de comunidades [26]. Isto ocorre, pois, várias espécies de plantas são capazes de produzir compostos bioativos, que podem desempenhar um importante papel na manutenção da saúde humana, estes são os chamados fitoterápicos [27-29].

Assim, o fitoterápico *Rosmarinus officinalis L.*, conhecido como alecrim, é uma erva com uma longa história de uso na medicina [30]. É originária da região Mediterrânea, crescendo em regiões quentes e secas do sul da Europa [30], sendo distribuída em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil.

A atividade antimicrobiana do óleo de alecrim tem sido demonstrada e estudada [31] e é amplamente utilizado na medicina popular brasileira como sedativo, antiespasmódico, cardiotônico, para o tratamento de distúrbios menstruais, tosse, gripe, cólicas, febre, flatulência, dor de estômago e intestinal, problemas hepáticos e renais [32]. Também é utilizado no tratamento de doenças inflamatórias respiratórias, tais como a asma brônquica [32].

Seus principais componentes são o ácido rosmarínico, ácido carnósico, carnosol, ácido ursólico, ácido oleanólico, apigenina e luteolina [30]. Além de possuir  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora e componentes primários monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos. O óleo apresenta-se como um líquido amarelo e possui odor agradável [33].

Já o fitoterápico bétula (*Betula pendula*) é a denominação de um gênero de árvores da família das Betuláceas do norte da Europa que é utilizada como a principal matéria-prima para a produção de polpa celulósica, sendo oriunda de florestas nativas com solos pobres [34]. Tal planta, apesar de ainda não possuir muitos artigos na literatura científica, apresenta estudos que mostram suas propriedades medicinais satisfatórias, tais como antirreumática, antisséptica, diurética, cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatória, além de ser também um estimulante digestivo [35].

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização física e morfológica de fibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem adição dos fitoterápicos alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) e bétula (*Betula pendula*) com o intuito de analisar o arcabouço formado e possíveis efeitos da inclusão de um agente fitoterápico às propriedades das fibras.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais utilizados

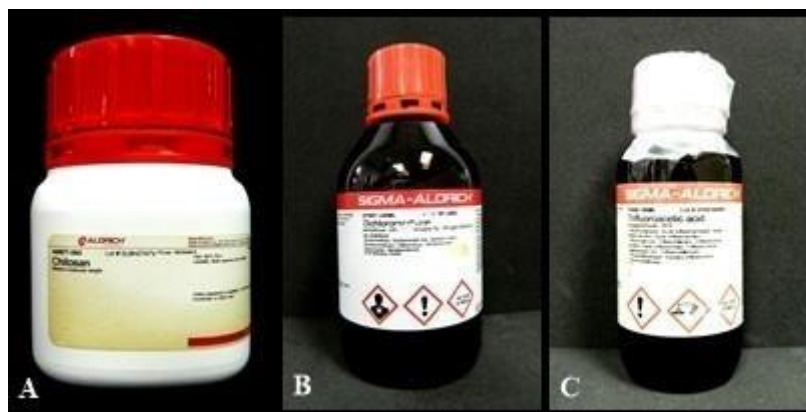
Quadro 1 – Materiais utilizados

Material	Fabricante	Composição
Quitosana (Peso Molecular Médio)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA	$C_6H_{11}O_4N$ (75%-85% Desacetilação)
Ácido Trifluoroacético	Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA	$C_2HF_3O_2$
Diclorometano	Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA	$CH_2Cl_2$
Extrato de alecrim	Fabricação própria	$Ca_{10}(PO_4)_6$
Extrato de bétula	Fabricação própria	$C_8H_8O_3$

### 2.2 Preparo da solução

#### 2.2.1 Solução de quitosana pura (Ch)

Uma solução de quitosana a 7% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,7g de quitosana de peso molecular médio (Figura 1), respectivamente, em 7mL de Ácido Trifluoroacético (TFA) e 3mL de Diclorometano (DCM). Tanto o TFA como o DCM podem ser vistos na figura 1.



**Figura 1** – (A) Solução de quitosana pura - Sigma-Aldrich; (B) Ácido Trifluoracético (TFA) - Sigma-Aldrich; (C) Diclorometano (DCM) - Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA.

A quitosana foi gradativamente dissolvida, posicionando o conjunto em um agitador (IKA RH Bacis, Staufen, Alemanha) sob a temperatura ambiente e velocidade de 300rpm. Posteriormente adicionou-se o DCM. O conjunto foi mantido sob agitação constante por 24h.

### 2.2.2 Solução de quitosana com alecrim (ChAI)

Para a produção de solução de quitosana com inclusão de alecrim (ChAI) 50 $\mu$ m de extrato de *Rosmarinus officinalis L.* foi adicionado à solução Ch e o conjunto foi mantido sob agitação por 12h.

### 2.2.3 Solução de quitosana com bétula (ChB)

Para a produção de solução de quitosana com inclusão de Betula (ChB) 50 $\mu$ m de extrato de *Betula pendula* foi adicionado à solução Ch e o conjunto foi mantido sob agitação por 12h.

## 2.3 Eletrofiação

Para a síntese de fibras, cada solução foi colocada em uma seringa de irrigação descartável de 5mL (BD Plastipack Becton Dickson - Indústrias Cirúrgicas&Ltda, Brasil) com uma agulha para irrigação sem bisel de 25x0,7mm (Injex, Indústrias Cirúrgicas&Ltda, Brasil) e submetida à eletrofiação (Figura 2).



**Figura 2** – O processo de eletrofiação.

O processo ocorreu sob diferentes combinações de parâmetros: razão de fluxo, distância do capilar metálico ao anteparo coletor e tensão elétrica, como elucidado no quadro 2.

**Quadro 2** – Parâmetros utilizados para o processo de eletrofiação de fibras Ch, ChAl e ChB

PARÂMETROS			
<b>Distância</b>	10cm	12cm	15cm
<b>Tensão Elétrica</b>	11kV	15kV	25kV
<b>Razão de Fluxo</b>	0,3mL/h	0,5mL/h	0,8mL/h



## **2.4 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)**

Apenas específicas combinações de parâmetros de eletrofição foram capazes de sintetizar fibras de Ch, ChAl e ChB.

Além disso, coletou-se o material formado da região central do papel coletor, onde há uma concentração padronizada de fibras.

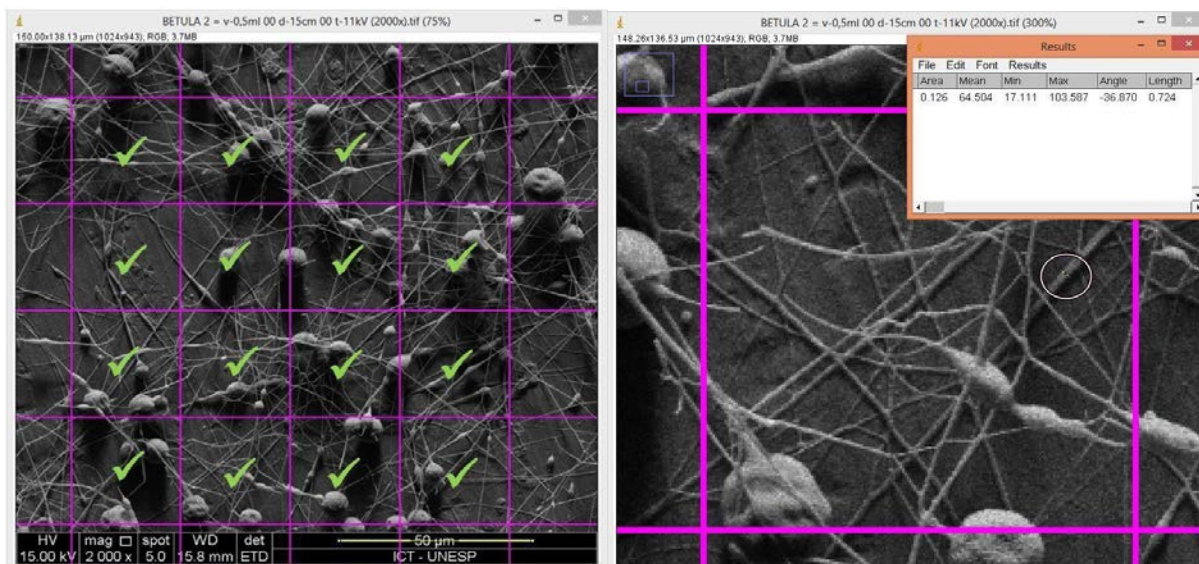
Assim, foram obtidas imagens através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para análises morfológicas.

## **2.5 Análise de imagem**

As micrografias obtidas foram submetidas à análise de imagem por meio do software ImageJ (Versão 1.44o, National Public of Health), caracterizando o diâmetro médio das fibras e a presença de grânulos.

### **2.5.1 Análise de diâmetro de fibras**

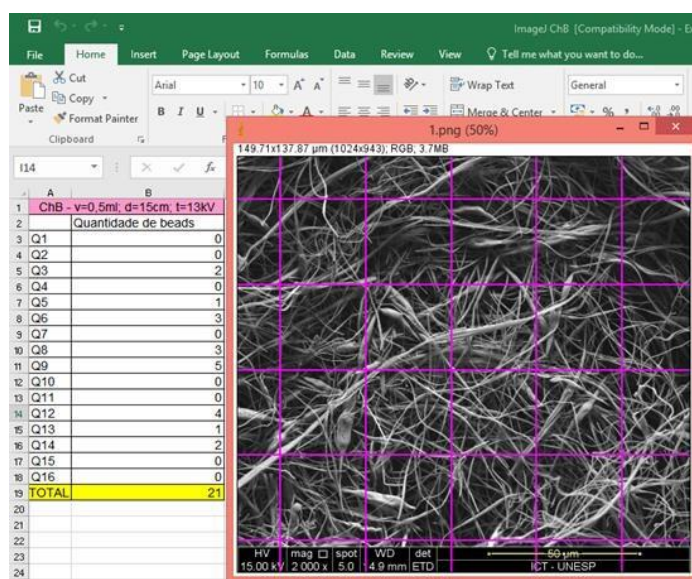
As imagens obtidas de Ch, ChAl e ChB foram divididas e 16 quadrantes centrais foram selecionados (Figura 3). Após os diâmetros de três fibras de cada quadro foram mensurados. Totalizando 48 análises por micrografia.



**Figura 3** – Análise de micrografia com divisão, seleção de quadrantes centrais e mensuração de diâmetro de fibra.

## 2.5.2 Contabilização dos grânulos

A quantidade de grânulos presentes nas fibras de Ch, ChAI e ChB também foi analisada por meio do ImageJ com as imagens obtidas a partir do MEV, dividindo a micrografia em 20 quadrantes, e contabilizada no Excel, conforme Figura 4.



**Figura 4** – Análise da presença e contabilização de grânulos nas fibras poliméricas.

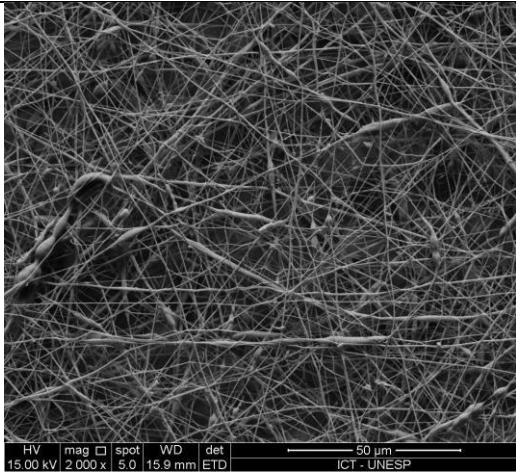
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

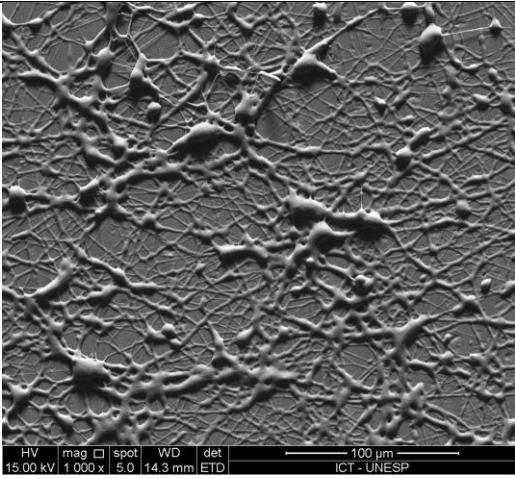
A partir das micrografias obtidas, foram selecionadas para análise apenas as membranas com formação efetiva de fibras. Isto porque, fibras descontínuas e com falhas não apresentariam propriedades mecânicas satisfatórias para atuarem como biomaterial.

Os Quadros 3 (3.1; 3.2; 3.3) e 4 apresentam as membranas submetidas às análises morfológicas de ChAI e ChB, respectivamente. Em relação às fibras ChAI as combinações efetivas de parâmetros foram: ChAI1 (11kV 10cm 0,3mL/h), ChAI2 (12kV 15cm 0,5mL/h) e ChAI3 (15kV 15cm 0,8mL/h). Em relação à ChB, notou-se efetiva formação de fibras nos parâmetros: ChB1 (11kV 15cm 0,5mL/h), ChB2 (10kV 15cm 0,5mL/h), ChB3 (10kV 12cm 0,5mL/h) e ChB4 (13kV 15cm 0,5mL/h).

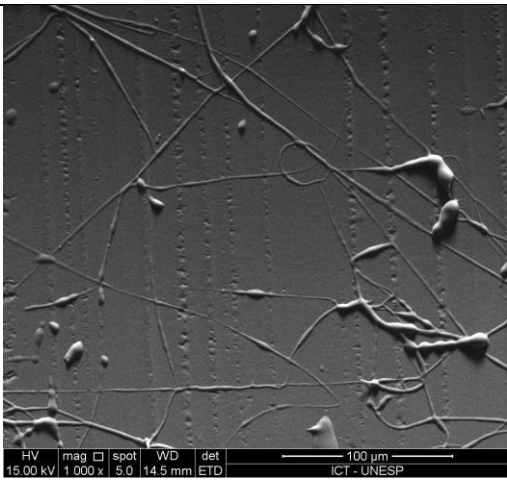
**Quadro 3.1** – Parâmetros utilizados na razão de fluxo de 0,3mL/h via solução de quitosana com inclusão de Alecrim (ChAI)

Distância/tensão elétrica	10kV	11kV	12kV	15kV
10cm	X		X	X
12cm	X	X	X	X
15cm	X	X	X	X
20cm	X	X	X	X

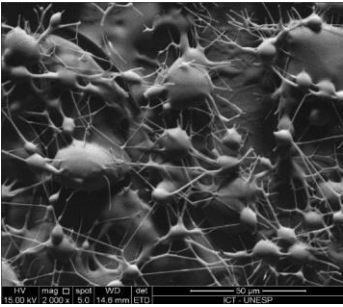
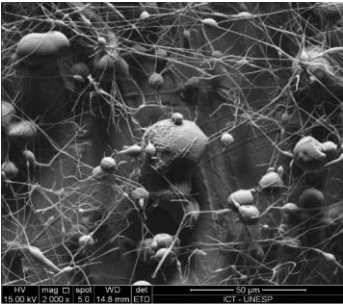
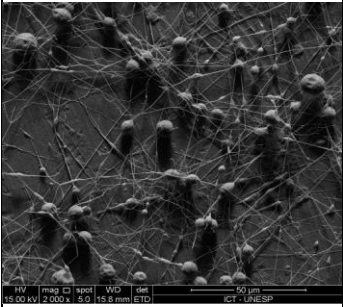
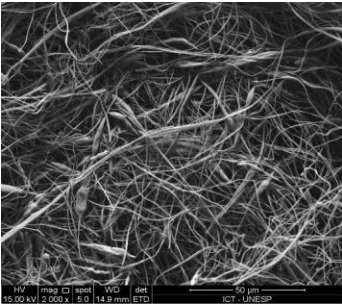
**Quadro 3.2** – Parâmetros utilizados na razão de fluxo 0,5mL/h via solução de quitosana com inclusão de Alecrim (ChAI)

Distância/tensão elétrica	10kV	11kV	12kV	15kV
10cm	X	X	X	X
12cm	X	X	X	X
15cm	X	X		X
20cm	X	X	X	X

**Quadro 3.3** – Parâmetros utilizados na razão de fluxo 0.8mL/h via solução de quitosana com inclusão de Alecrim (ChAI)

Distância/tensão elétrica	10kV	11kV	12Kv	15kV
10cm	X	X	X	X
12cm	X	X	X	X
15cm	X	X	X	
20cm	X	X	X	X

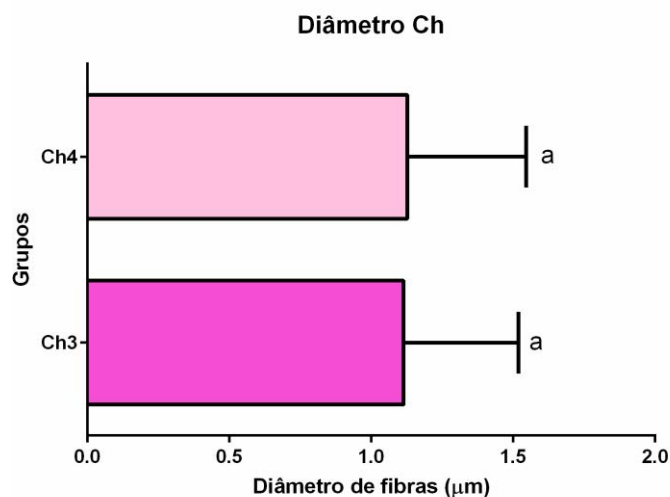
**Quadro 4** – Parâmetros utilizados na razão de fluxo de 0,5mL/h via solução de quitosana com inclusão de bétula (ChB)

Distância / tensão elétrica	10kV	11kV	13kV	15kV
10cm	X	X	X	X
12cm			X	X
15cm				X
20cm	X	X	X	X

## 3.2 Análises de imagem

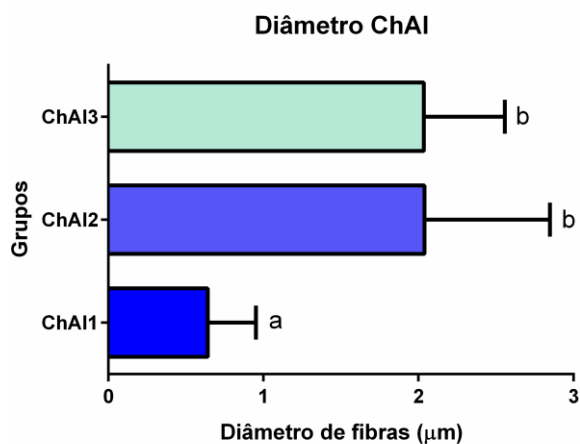
### 3.2.1 Análise do diâmetro médio de fibras

As membranas de Ch3 ( $1.11 \pm 0.40 \mu\text{m}$ ) e Ch4 ( $1.12 \pm 0.41 \mu\text{m}$ ) não apresentaram diferença significativa de diâmetro de fibra entre si (Figura 5).



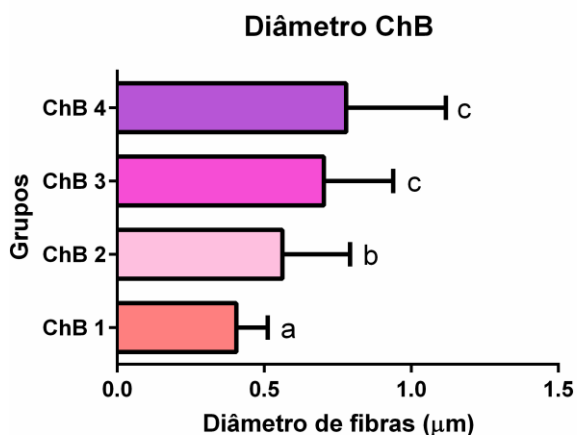
**Figura 5** – Análise estatística do diâmetro de fibras contabilizado nas amostras de quitosana pura (Ch).

Foi possível observar para diâmetro de fibras ChAI diferença estatística significativa ( $p < 0.0001$ ) entre ChAI1 ( $0.641 \pm 0.31 \mu\text{m}$ ) e ChAI2 ( $2.04 \pm 0.80 \mu\text{m}$ ) e ChAI3 ( $2.03 \pm 0.52 \mu\text{m}$ ) (Figura 6).



**Figura 6** – Gráfico estatístico relacionado ao diâmetro das nanofibras de ChAI.

Já para ChB, foi possível observar semelhança estatística entre ChB3 ( $0.70 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ) e ChB4 ( $0.77 \pm 0.33 \mu\text{m}$ ), apresentando maiores diâmetros que ChB1 ( $0.40 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ) e ChB2 ( $0.56 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ) (Figura 7).

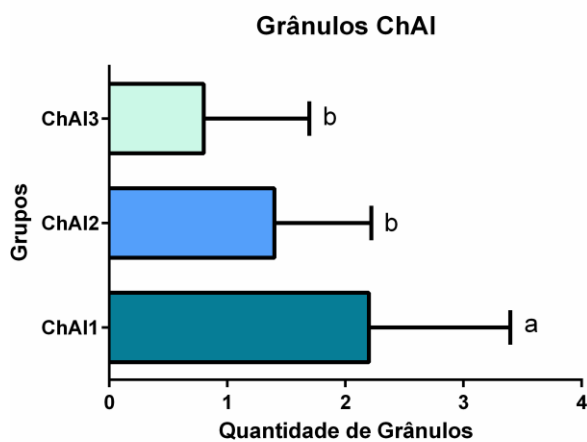


**Figura 7** - Análise estatística do diâmetro de fibras contabilizado nas amostras de quitosana com inclusão de bétula (ChB).

### 3.2.2 Análise da formação de grânulos

As membranas de fibras Ch não apresentaram formação significativa de grânulos.

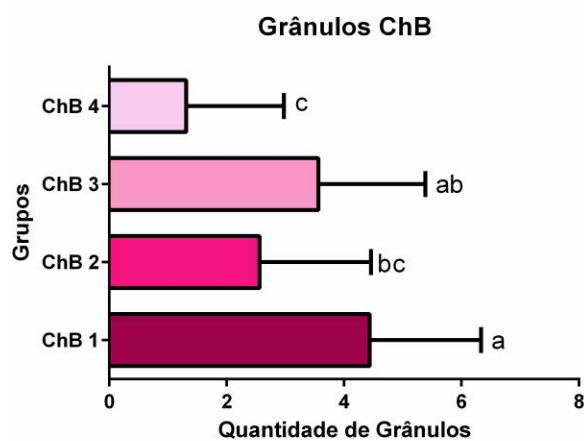
ChAI1 ( $2.2 \pm 1.196 \mu\text{m}$ ) apresentou diferença estatística significativa na formação de grânulos quando comparada a ChAI2 ( $1.4 \pm 0.820 \mu\text{m}$ ) e ChAI3 ( $0.8 \pm 0.894 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8).



**Figura 8** – Gráfico estatístico relacionado a quantidade de grânulos encontrada em cada micrografia de ChAI.

Houve diferença estatística significativa de formação de grânulos ( $p < 0.0001$ ) entre ChA1 em comparação à ChA2 e ChA3, estes últimos apresentaram menor número de grânulos.

Já ChB exibiu formação de grânulos com diferença estatística significativa dentre as combinações de parâmetro de síntese ( $p < 0,0001$ ) sendo ChB4 ( $1.312 \pm 1.662 \mu\text{m}$ ) a de menor formação, como pode ser visto na Figura 9.



**Figura 9** – Análise estatística da quantidade de grânulos contabilizada nas amostras de quitosana com bétula.



## 4 DISCUSSÃO

A quitosana é um biopolímero que possui interessantes propriedades para aplicações na área de síntese de biomateriais, sendo relatada na regeneração tecidual guiada [36] e formação de nanocomplexos microbicidas para proteção de infecções com o vírus HIV [37]. Juntamente com fitoterápicos como *Rosmarinus officinalis L.*, com atividade antimicrobiana [32], e a *Betula pendula*, com atividade anti-inflamatória, são complexos potenciais para atuação biomédica, sendo importante o conhecimento e caracterização de sua morfologia.

Sendo assim, inicialmente, os resultados do presente estudo apresentaram forte dependência em relação aos parâmetros de síntese envolvidos no processo de eletrofiação (distância, tensão elétrica e razão de fluxo), assim como achados da literatura [15]. Por este motivo, pode-se observar que, em relação a Ch, as combinações efetivas de parâmetros foram: Ch3 (15kV 10cm 0,5mL/h) e Ch4 (15kV 12cm 0,5mL/h). Para ChAI, observou-se formação de nanofibras em ChAI1 (11kV 10cm 0,3mL/h), ChAI2 (12kV 15cm 0,5mL/h) e ChAI3 (15kV 15cm 0,8mL/h). Já em relação à ChB, notou-se efetiva produção de fibras em: ChB1 (11kV 15cm 0,5mL/h), ChB2 (10kV 15cm 0,5mL/h), ChB3 (10kV 12cm 0,5mL/h) e ChB4 (13kV 15cm 0,5mL/h).

Em relação ao diâmetro das fibras, a tensão elétrica aplicada demonstrou-se diretamente proporcional ao aumento do diâmetro das fibras de ChAI, uma vez que a maior tensão acaba por aumentar as forças eletrostáticas no jato e ao campo elétrico criado [38]. O mesmo não foi encontrado para ChB.

Além disso, quando mantida a distância de ChB em 15cm apenas a variação de tensão elétrica se mostrou significativamente influente no diâmetro médio de fibras. Já para ChAI o aumento da distância em 12cm e 15cm foram associadas ao aumento do diâmetro médio.

O estudo do diâmetro médio dessas fibras se faz importante pois isto relaciona-se intimamente com suas dimensões e com uma elevada razão área superficial/volume, fazendo com que estas membranas apresentem novas aplicabilidades potenciais nas áreas biomédicas [39], sendo que quanto menor o diâmetro dessas fibras, melhores características elas apresentarão para serem aplicadas a nível celular [40].

Já quanto a formação de grânulos, diferentemente de Ch, verificou-se que todas as micrografias de ChB e ChAl apresentaram tais estruturas poliméricas que causam a descontinuidade das fibras, cuja formação pode ser explicada pela instabilidade do jato que desencadeia um espalhamento eletrostático ao invés do processo de eletrofiação propriamente dito [41].

No presente estudo, ChB com menor formação de grânulos foi verificada sob a maior distância e tensão elétrica e o mesmo foi apresentado por ChAl, discordando de trabalhos que acharam resultados contrários, justificando que maiores tensões elétricas e distâncias desestabilizariam o jato polimérico [42].

Além disso, entende-se que uma menor viscosidade da solução pode favorecer a saída mais rápida do jato da extremidade da agulha da seringa, o que contribui também para a deposição no anteparo coletor na forma de grânulos [43].

Estes grânulos formados nas membranas eletrofiadas, afetam mecanicamente as propriedades das nanofibras [15,16], no entanto podem servir teoricamente como um reservatório de fármaco para uma posterior liberação do mesmo [3].

Dessa forma, a presente caracterização de materiais que usufruem de matrizes poliméricas como a quitosana e agentes terapêuticos como o *Rosmarinus officinalis*

*l.* e a *Betula pendula*, vislumbra o início de uma rede complexa de análise para viabilizar seus potenciais de utilização nas áreas da saúde para regeneração guiada tecidual, desde reabilitação de queimados até mesmo para crescimento ósseo dentro da odontologia.

## 5 CONCLUSÃO

Com isso, é possível concluir que a inclusão dos fitoterápicos *Betula pendula* e *Rosmarinus officinalis L.* influencia a caracterização dos aspectos físicos e morfológicos das membranas de quitosana, de modo a intervir na conformação deste material para possíveis aplicações futuras nas áreas medicinais e odontológicas, servindo de arcabouço para as células na regeneração tecidual e na liberação controlada do fitoterápico para usos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

1. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progr Polym Sci.* 2006;31(7):603-32.
2. Donaruma LG. *Biocompatibility: interactions of biological and implantable materials: volume 1: polymers* by Frederick Silver and Charles Doillon. Nova York: VCH; 1990
3. Camargo NHDA, Bellini OJ, Gemelli E, Tomiyama M. Synthesis and characterization of nanostructured ceramics powders for biomedical applications. *Matéria.* 2007;12:574-82.
4. Oliveira BD, Assunção WG, Zanoni JN, Camarini ET, Okamoto R. Evaluation of biomaterials with and without platelet-rich plasma: a histometric study using beagle dogs. *Braz J Oral Sci.* 2015;14:306-10.
5. Costa VC, Costa HS, Vasconcelos WL, Pereira MDM, Oréfice RL, Mansur HS. Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Res.* 2007;10:21-6.
6. Spin-Neto R, Coletti FL, Freitas RMD, Pavone C, Campana-Filho SP, Marcantonio RAC. Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria. *Rev Odontol UNESP.* 2012;41:312-7.
7. Vasconcelos Y. Menores e mais eficientes. *Pesquisa FAPESP.* 2009(161):74.
8. Anton F, inventor. Process and apparatus for preparing artificial threads. US1975504A. 1929 Dec 7
9. Anton F, inventor. Method and apparatus for spinning. US2160962A. 1936 Jul 1.
10. Cui W, Zhou Y, Chang J. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Sci Technol Adv Mater* 2010;11(1):014108.
11. Segala K, Nista SVG, Cordi L, Bizarria MTM, Ávila Júnior Jd, Kleinubing SA, et al. Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning: a study of antimicrobial activity. *Braz J Pharm Sci.* 2015;51:911-21
12. Tucker N, Hofman K, Razzaq H. A history of electrospinning 1600 1995 [Internet]. *Plant and Food Research.* [2018 Feb 28]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Nick\\_Tucker2/publication/243458183\\_The\\_history\\_of\\_electrospinning\\_as\\_a\\_poster/links/0deec51d0e8c2543af000000/The-history-of-electrospinning-as-a-poster.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Nick_Tucker2/publication/243458183_The_history_of_electrospinning_as_a_poster/links/0deec51d0e8c2543af000000/The-history-of-electrospinning-as-a-poster.pdf)
13. Gomes DS, Silva ANRD, Morimoto NI, Mendes LTF, Furlan R, Ramos I.

Characterization of an electrospinning process using different PAN/DMF concentrations. *Polímeros*. 2007;17:206-11.

14. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J electrostatics*. 1995;35(2-3):151-60.
15. Li Z, Wang C. Effects of working parameters on electrospinning. *One-Dimensional nanostructures: electrospinning technique and unique nanofibers*. Berlin: Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p.15-28.
16. Ibrahim HM, El-Zairy EMR. Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and electrospun nanofibers. In: Bobbarala, Varaprasad. *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials*. Viena: InTech; 2015. doi 10.5772/59522.
17. Goy RC, Morais STB, Assis OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev Bras Farmacogn*. 2016;26:122-7.
18. Fujiwara GM, Campos R, Costa CK, Dias JDFG, Miguel OG, Miguel MD, et al. Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmaterol through the external ionic gelation technique. *Braz J Pharm Sci*. 2013;49:537-47.
19. van de Graaf GMM, De Zoppa ALDV, Moreira RC, Maestrelli SC, Marques RFC, Campos MGN. Morphological and mechanical characterization of chitosan-calcium phosphate composites for potential application as bone-graft substitutes. *Res Biomed Eng*. 2015;31:334-42
20. Kim SJ, Shin SR, Kim NG, Kim SI. Swelling behavior of semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on chitosan and poly acryl amide. *J Macromol Sci Chemistry*. 2005;42(8):1073-83
21. Shahzad S, Yar M, Siddiqi SA, Mahmood N, Rauf A, Anwar MS, et al. Chitosan- based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: novel anti-bacterial wound dressing matrices. *J Mater Sci., Mater Med*. 2015;26(3):136.
22. Jail NGD, Luiz C, Rocha Neto ACD, Di Piero RM. High-density chitosan reduces the severity of bacterial spot and activates the defense mechanisms of tomato plants. *Trop Plant Pathol*. 2014;39:434-41.
23. Ma S, Chen Z, Qiao F, Sun Y, Yang X, Deng X, et al. Guided bone regeneration with tripolyphosphate cross-linked asymmetric chitosan membrane. *J Dent*. 2014;42(12):1603-12.
24. Li W, Ding Y, Yu S, Yao Q, Boccaccini AR. Multifunctional chitosan-45S5 bioactive glass-poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microsphere composite membranes for guided tissue/bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(37):20845-54.
25. Moreno SRF, Feliciano GD, Freitas RS, Farah MB, Laurentino-Filho GL, Rocha EK, et al. Effect of ginkgo biloba on the labeling of blood elements with

technetium- 99m: in vitro study. Rev Bras Farmacogn. 2002;12:62-3.

26. Borges CC, Matos TF, Moreira J, Rossato AE, Zanette VC, Amaral PA. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. Rev Bras de Plantas Med. 2013;15:34-40.

27. Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmacol. 1997;58(1):45-54.

28. Botelho MA, Barros G, Queiroz DB, Carvalho CF, Gouvea J, Patrus L, et al. Nanotechnology in phytotherapy: antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in rats. Phytother Res. 2016;30(1):152-9.

29. Castro AHF, Braga KDQ, Sousa FMD, Coimbra MC, Chagas RCR. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). Rev Ciênc Agron. 2016;47:143-51.

30. Petrolini FVB, Lucarini R, Souza MGD, Pires RH, Cunha WR, Martins CHG. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. Braz J Microbiol. 2013;44:829-34.

31. Melo AAMd, Geraldine RM, Silveira MFA, Torres MCL, Rezende CSME, Fernandes TH, et al. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. Braz J Microbiol. 2012;43:1419-27.

32. Zanella CA, Treichel H, Cansian RL, Roman SS. The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. Braz J Pharm Sci. 2012;48:389-97.

33. Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD, Rech JC, Pansera MR, et al. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. Braz Arch Biol Technol. 2005;48:1035-9.

34. Bhat K, Karkkainen M. Variation in structure and selected properties of Finnish birch wood: III. Proportion of wood elements in stems and branches in *Betula pendula* Roth. Silva fenn. 1981;15:1-9.

35. Theriault G, Nkongolo KK, Michael P. Genetic and metal analyses of fragmented populations of *Betula papyrifera* (Marsh) in a mining reclaimed region: identification of population–diagnostic molecular marker. Ecol evol. 2014;4(17):3435-43.

36. Rattier BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. J Clin Eng. 1997;22(1):26.

37. Boyapalle S, Xu W, Raulji P, Mohapatra S, Mohapatra SS. A multiple siRNA-based anti-HIV/SHIV microbicide shows protection in both In Vitro and In Vivo

models. PloS one. 2015;10(9):e0135288.

38. Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*. 1999;40(26):7397-407.
39. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes ÂM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quím Nova*. 2015;38:957-71.
40. Chen M, Patra PK, Lovett ML, Kaplan DL, Bhowmick S. Role of electrospun fibre diameter and corresponding specific surface area (SSA) on cell attachment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(4):269-79.
41. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008;49(26):5603-21.
42. Entov V, Shmaryan L. Numerical modeling of the capillary breakup of jets of polymeric liquids. *Fluid Dynamics*. 1997;32(5):696-703.
43. Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72(1):156-65.