

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

FERNANDA VIEIRA DE SÁ

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO**  
**INCORPORADO COM ÓLEO DE CRAVO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO**  
**COMO CURATIVO**

BELO HORIZONTE

2019

FERNANDA VIEIRA DE SÁ

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE COLÁGENO  
INCORPORADO COM ÓLEO DE CRAVO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO  
COMO CURATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo  
Coorientadora: Dra. Camila Silva Brey Gil

BELO HORIZONTE

2019

FERNANDA VIEIRA DE SÁ

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE COLÁGENO INCORPORADO  
COM ÓLEO DE CRAVO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CURATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

---

Prof. Dra. Camila Silva Brey Gil

---

Prof. Dr. Marcello Rosa Dumont

---

Dra Kátia Michelle Freitas

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir estar nesse momento nesse lugar. Além de me dar força, disposição e inteligência emocional para superar todos os obstáculos enfrentados até aqui.

À minha família, meus pais Carlos e Giovanna e meus irmãos, Matheus, Fillipe e Gabriella pelo apoio, incentivo e amor incondicional sempre.

À Vinícius e sua família pelo apoio, companheirismo e ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos de Itabira, do Colégio Santo Antônio, do CEFET, pela amizade, companheirismo, paciência e por me ouvirem sempre que precisei.

À minha orientadora Dra. Danielle Marra, pela compreensão, pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança.

À minha coorientadora Camila Gil, pela colaboração, paciência, ensinamento mesmo de longe. Obrigada também pela comunicação com o Departamento de Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas da UFMG para obtenção do colágeno e realização de experimentos.

À Dra Kátia Freitas, responsável pelo laboratório de Biomateriais, que me auxiliou durante os ensaios microbianos.

Ao colega Plínio, que me auxiliou durante o experimento do UV-vis.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), pela oportunidade, experiência, e ensinamentos que foram tão importantes na minha vida acadêmica/pessoal.

Ao Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira (professor na Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG), pelo fornecimento do colágeno.

E a todos os demais que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

## RESUMO

O estudo e o desenvolvimento de curativos tem despertado interesse devido à inovação de materiais com potencial liberação controlada de fármacos prevenindo a invasão bacteriana e o reduzindo o risco de infecções. O óleo de cravo é amplamente utilizado na medicina popular devido às suas propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica. O biopolímero colágeno têm sido utilizado na área de biomateriais devido à biocompatibilidade e capacidade de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento, promovendo a cicatrização de feridas causadas por traumas químicos e mecânicos. No presente trabalho, produziram-se filmes de colágeno, proveniente dos resíduos da indústria coureira, incorporados com óleo de cravo através da técnica evaporação de solvente para potencial aplicação como curativos. A fração mássica do óleo de cravo adicionada a solução de colágeno foi de 0%, 10% e 30%. O óleo de cravo foi caracterizado pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG). Os filmes produzidos também foram caracterizados por FTIR, TG, por Eletroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis), ângulo de contato e ensaio de disco-difusão. Foram obtidos filmes transparentes com 0,10mm de espessura. O óleo de cravo utilizado é constituído por 85,47% de eugenol. A presença do óleo de cravo foi confirmada nos filmes de colágeno através do ensaio de FTIR. A liberação do óleo de cravo em meio aquoso ocorreu de forma sustentada até o término do ensaio, 150 minutos. O óleo de cravo puro e diluído apresenta atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* e *S.aureus*, entretanto, pela técnica utilizada não foi possível confirmar a atividade antimicrobiana dos filmes de colágeno contendo óleo de cravo. Os resultados preliminares obtidos sugerem que os filmes de colágeno com óleo de cravo possuem potencial aplicação como curativos.

Palavras Chave: Colágeno Reciclado, óleo de cravo, eugenol, curativo

## ABSTRACT

The study and development of dressings has aroused interest due to the innovation of materials with controlled drug release potential that prevent the invasion of bacteria and the risk of infections. Clove oil is used in folk medicine because of its biological properties as antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory and painkiller activity. Biopolymer is used in the field of biomaterials due to its biocompatibility and ability to guide the formation of developing tissues, promoting wound healing caused by chemical and mechanical trauma. In the present work, we produce collagen films, from residues of the leather industry, incorporated with clove oil through the technical solvent casting for potential application as dressings. A fraction of clove oil added to a collagen solution was 0%, 10% and 30% w / w.

The characterization of the clove oil was conducted through Fourier Transform Infrared Spectrometry technique (FTIR), gas chromatography (GC/MS), and thermogravimetric analysis (TG) techniques. The films were also characterized by FTIR, TG, Visible Ultraviolet Electroscopy (UV-vis), contact angle and antimicrobial assay: It was obtained films of 0.10 mm thick. The used clove oil consists of 85.47% eugenol. The presence of clove oil was confirmed in fiction films through the FTIR essay. The release of clove oil in aqueous medium was sustained until the end of the test, 150 minutes. Pure and diluted clove oil has antimicrobial activity against *E. coli* and *S.aureus* bacteria, however, the technique could not confirm the antimicrobial activity of collagen films used with clove oil. The preliminary results selected suggest that clove oil oil films have potential application as dressings.

Key words: Recycled Collagen, Clove Oil, Eugenol, Dressing

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do eugenol.....	19
Figura 2 – Fluxograma das etapas de trabalho.....	21
Figura 3 – Solubilização do resíduo de colágeno da indústria coureira.....	22
Figura 4 – FTIR do óleo de cravo.....	27
Figura 5 – Cromatograma GC/MS do óleo de cravo.....	28
Figura 6 – Filmes de Colágeno produzidos.....	30
Figura 7 – FTIR do filme de colágeno puro.....	31
Figura 8 – FTIR dos filmes de colágeno incorporados com óleo de cravo.....	33
Figura 9 – FTIR dos filmes das amostras.....	34
Figura 10 – Análise termogravimétrica do filme de colágeno puro .....	35
Figura 11 – Análise termogravimétrica do óleo de cravo.....	36
Figura 12 – Análise termogravimétrica das amostras.....	37
Figura 13 – Imagem da gota de água na superfície dos filmes .....	38
Figura 14 – Imagem da gota de água na superfície dos filmes após 5 min.....	39
Figura 15 – Espectroscopia UV/vis do óleo de cravo em água ultrapura.....	40
Figura 16 – Curva de calibração do óleo de cravo em água ultrapura .....	41
Figura 17 – Perfil de liberação do óleo de cravo presente nos filmes de colágeno.....	42
Figura 18 – Placa de <i>E. coli</i> contendo as amostras após 24 h de incubação.....	44
Figura 19 – Placa de <i>S. aureus</i> contendo as amostras após 24 h de incubação .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos e materiais utilizados no ensaio de disco-difusão em ágar.....	25
Tabela 2 – Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para o óleo de cravo.....	27
Tabela 3 – Constituintes encontrados no óleo de cravo através da técnica de GC/MS.....	29
Tabela 4 – Constituintes com atividades biológicas relatados para o óleo de Cravo.....	29
Tabela 5 – Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para o filme de colágeno puro.....	31
Tabela 6 – Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para os filmes de colágeno incorporados com óleo de cravo.....	33
Tabela 7 – Porcentagem de massa do óleo de cravo e dos filmes de colágeno puro e incorporados com o óleo de cravo, em função da temperatura.....	37
Tabela 8 – Ângulos de contato dos filmes de colágeno.....	38
Tabela 9 – Valor médio das porcentagens de óleo de cravo liberado em função do tempo.....	41
Tabela 10 – Valores padrões de halos inibitórios utilizados no ensaio de disco-difusão.....	43
Tabela 11 – Halos de inibição e sensibilidade para a bactéria <i>E. coli</i> .....	44
Tabela 12 – Halos de inibição e sensibilidade para a bactéria <i>S. aureus</i> .....	46

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

TGA: Análise Termogravimétrica

GC/MS: Cromatografia Gasosa acoplada  Espectrometria de Massa

OC: leo de Cravo

UV/vis: Ultravioleta Vsvel

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Principal.....	13
2.2 Objetivo Específicos.....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
3.1 Lesões na Pele e tratamentos.....	14
3.2 Colágeno e aplicação como curativo.....	15
3.3 Óleo de Cravo.....	18
3.4 Material Proposto.....	20
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>
4.1 Materiais.....	21
4.2 Delineamento Experimental.....	21
4.3 Preparo da solução de colágeno.....	22
4.4 Determinação da concentração da solução de colágeno.....	22
4.5 Produção dos filmes.....	23
4.6 Caracterização do Óleo de cravo.....	24
4.7 Caracterização dos filmes.....	24
4.7.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	25
4.7.2 Análise Termogravimétrica.....	25
4.7.3 Ângulo de Contato.....	25
4.7.4. Espectroscopia UV-vis.....	25
4.7.5 Ensaio de disco-difusão.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>28</b>
5.1 Caracterização do Óleo de Cravo.....	28
5.2 Produção dos filmes de colágeno com e sem óleo de cravo .....	30

5.3 Caracterização físico-química dos filmes de colágeno.....	31
5.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	31
5.3.2 Análise Termogravimétrica.....	35
5.3.3 Ângulo de Contato.....	38
5.3.4. Espectroscopia UV-vis.....	41
5.3.5 Ensaio de disco-difusão.....	44
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, e, portanto, apresenta fundamental importância, uma vez que além de revestir a superfície do corpo, desempenha funções como proteção do organismo contra agentes externos, desidratação e atrito. Atua na manutenção da temperatura corporal, síntese de vitamina D, proteção contra raios ultravioleta, sensibilidade corporal, excreção e balanço hídrico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). A descontinuidade do tecido epitelial ocasionada por fatores externos tais como objetos perfurantes, reagentes químicos, calor, irradiações e agentes biológicos resultam no comprometimento da sua função e danos à fisiologia corporal. Neste sentido, o tratamento das lesões superficiais é de suma importância para o reestabelecimento da função normal da pele (ZHOURI, 2016, MURRAY *et al.*, 2019).

Por ser um órgão que está em contato direto com o ambiente externo, lesões nesta região ocorrem com frequência, e o agravamento de tais lesões pode ocasionar problemas sérios de saúde devido às perdas volumosas de fluidos e a invasão de microrganismos (RATNER *et al.*, 2004). Desta forma, o tratamento de feridas superficiais é importante, pois propicia a restauração das funções básicas da pele. Nesse cenário, os curativos são uma estratégia essencial, pois consistem em um tratamento não invasivo e amplamente utilizado. Diversos grupos de pesquisa têm trabalhado no desenvolvimento de diferentes curativos com o intuito de acelerar a cicatrização, evitar a contaminação por microrganismos e consequentemente aumentar a eficácia do tratamento (REZENDE, *et al.*, 2005; BARNEA, *et al.*, 2010, ROGNONI, *et al.* 2018; MURRAY *et al.*, 2019).

O colágeno constitui uma classe de proteínas com função estrutural e que compõe 30% da massa total das proteínas em seres humanos. O colágeno possui ampla aplicação como biomaterial, destacando-se seu uso como implante, revestimento de feridas, enxertos, aplicações odontológicas e farmacológicas (SIONKOWSKA, 2000, WU *et al.*, 2008, GIL *et al.*, 2016). Dentre as propriedades físico-químicas do colágeno, pode-se destacar boa aderência na pele, e, sobretudo, biocompatibilidade, características que tornam o colágeno um excelente candidato para aplicações em curativos, tratamento de feridas e enxertos. Lyra e colaboradores (2007) demonstram a utilização de colágeno como sistema de liberação de fármacos para promover a cicatrização de feridas causadas por traumas químico-mecânicos.

A estratégia de agregar novas propriedades a biopolímeros como atividade bactericida, fungicida, antioxidante ou anti-inflamatória a partir da incorporação de substâncias bioativas

tem sido intensamente estudada (BARNEA, *et al.*, 2010; Morelli *et al.*, 2015; SAHRARO *et al.*, 2016; FARRUGIA, *et al.*, 2018). Nesse sentido, o óleo de cravo é um composto interessante para ser utilizado como aditivo pois, apresenta baixo custo e ampla utilização na medicina popular brasileira como antisséptico, anti-inflamatório e anestésico (GIL, 2013). O principal constituinte do óleo de cravo é o eugenol, que possui propriedades antioxidantes e antibacterianas (SILVESTRI *et al.*, 2010). No presente trabalho foram produzidos filmes de colágeno, utilizando resíduos da indústria coureira, pela técnica de evaporação de solvente com e sem óleo de cravo para potencial aplicação como curativo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

Produzir e caracterizar filmes de colágeno utilizando resíduos da indústria coureira incorporados com óleo de cravo para potencial aplicação como curativos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Produzir filmes de colágeno pelo método de evaporação de solvente sem óleo de cravo.
- Produzir filmes de colágeno pelo método de evaporação de solvente com fração mássica de 10% e 30 % de óleo de cravo.
- Caracterizar o óleo de cravo pelas técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG).
- Caracterizar os filmes produzidos pelas técnicas de FTIR, TG, ângulo de contato e ensaio de disco-difusão.
- Investigar a liberação do óleo de cravo nos filmes de colágeno produzidos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Lesões na Pele e tratamentos

A pele é o maior órgão do corpo humano, e, portanto, apresenta fundamental importância, uma vez que além de revestir a superfície do corpo, desempenha funções como proteção do organismo contra agentes externos, desidratação e atrito. Atua na manutenção da temperatura corporal, na síntese de vitamina D, proteção contra raios ultravioleta (melanina), na sensibilidade (receptores sensoriais), excreção e balanço hídrico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Pelo fato de a pele ser o órgão que está em contato direto com o ambiente externo, a ocorrência de feridas nesta região é muito comum e dependendo da gravidade do processo pode comprometer seu funcionamento e a homeostase do organismo (COSTA, 2005). Além disso, a persistência dessas lesões pode ocasionar problemas mais graves ao indivíduo, devido às perdas volumosas de fluidos e a invasões de microrganismos (RATNER *et al.*, 2004).

A descontinuidade do tecido epitelial pode ser ocasionada por fatores externos (frio, calor, irradiação), químicos (reagentes químicos), biológicos (microrganismos) e mecânicos (contensão, perfuração e corte) que resultam no comprometimento da sua função e danos à fisiologia corporal (COSTA, 2005). Neste sentido, o tratamento das lesões superficiais é de suma importância para o reestabelecimento da função normal da pele (ZHOURI, 2016).

As lesões na pele podem ser classificadas de diferentes maneiras. Segundo Echer *et al.* (2010), a classificação pode ser também baseada no tipo de cicatrização e no tempo de duração da lesão. Já, Savassi-Rocha *et al.* (2013) ressaltam a complexidade dessa classificação, pelo fato de ter que se considerar as causas, a profundidade da lesão, o grau de contaminação, e a complexidade da ferida. Costa (2005), por sua vez, classifica as feridas quanto ao tempo de duração, em feridas agudas e crônicas.

Após a lesão, em qualquer ferida, inicia-se o processo de cicatrização, que pode ser definido como um conjunto de processos complexos para restauração do tecido lesionado (COSTA, 2005; ECHER *et al.*, 2010). Esse processo irá apresentar três fases principais: fase inflamatória, que tem início imediatamente após a lesão, com duração aproximada de 3 a 5 dias e cujo objetivo eliminar ou conter o agente lesivo, além de substituir as células afetadas por células saudáveis. Posteriormente, ocorre a fase proliferativa, que tem a função de formar um tecido temporário, para o preenchimento da lesão. Por último, se inicia a fase da

maturação, um processo com duração maior, em que há a remodelação do tecido cicatrizado em tecido normal (COSTA, 2005).

Inúmeros tratamentos são utilizados na clínica médica para acelerar o processo de cicatrização das feridas, promover a regeneração do tecido lesionado e restabelecer a integridade funcional e anatômica do tecido (SMANIOTTO *et al.*, 2012). De maneira geral, o tratamento consiste em limpeza do local da ferida, redução da dor, redução da progressão hemorrágica e do edema traumático. A limpeza deve ser feita com água e sabão ou soluções antissépticas não irritativas, podendo ser indicado o resfriamento do local (utilizando gelo), imobilização, elevação e repouso da área afetada. E, em casos de dor, é recomendado o uso de analgésico. Em caso de potencial risco de infecção, antibióticos deverão ser ministrados (SAVASSI-ROCHA *et al.*, 2013).

Além disso, os curativos são amplamente utilizados no tratamento de feridas, pois, permitem uma cobertura estéril da lesão, propiciam um ambiente favorável para a cicatrização e contribuem para a manutenção da umidade da ferida, além de permitir a troca gasosa (COSTA, 2005). Os curativos também auxiliam na absorção de secreções e redução do odor (SAVASSI-ROCHA *at al.*, 2013). Costa (2005) relata que antes da seleção e emprego do curativo há necessidade de avaliação da lesão quanto ao grau de contaminação, a etiologia, fatores locais e sistêmicos e presença de exsudato com a finalidade de acelerar o processo cicatricial e assegurar a proteção da ferida.

Atualmente, existem diversos curativos disponíveis no mercado que variam de acordo com os requisitos de suas aplicações, como por exemplo: gazes, filmes transparentes, espumas poliméricas, hidrocolóides, hidrogéis e curativos contendo carvão ativado, papaína e fatores de crescimento (SMANIOTTO *et al*, 2012). Os materiais poliméricos têm sido amplamente utilizados como curativos para o tratamento de feridas. Estes materiais além de apresentarem baixo custo, possuem fácil processamento por não exigirem elevadas temperaturas, possibilitam a obtenção de um mesmo material a partir de diferentes métodos de processamento, são transparentes permitindo a análise da evolução da ferida e possibilitam a troca gasosa com o ambiente (MACHADO, 2017).

### **3.2 Colágeno e aplicação como curativo**

Colágeno é a proteína mais abundante em organismos animais, compondo aproximadamente 30% da proteína corporal total (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). É um

componente mecânico de suma importância para a força, integridade e proteção do corpo, exercendo função de suporte na estrutura geral dos tecidos, já que formam fibras insolúveis com alta força de sustentação (FRIESS, 1998; GIRARDI 2005; GIL *et al.*, 2016). As propriedades mecânicas do colágeno se devem à configuração de tripla hélice formada pelas cadeias polipeptídicas. Já foram identificadas até o presente momento pelo menos 46 cadeias peptídicas diferentes que variam no comprimento da hélice e na natureza e tamanho das porções não helicoidais (SHOULDERS, 2009; SILVA & PENNA 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O colágeno do tipo I é o mais conhecido quimicamente e estruturalmente devido à sua abundância e ao importante papel que desempenha na manutenção da resistência dos ossos (SENA, 2004). Apresenta na estrutura primária três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, que conferem ao arranjo grande resistência a carregamentos de tração para as fibras. Adicional estabilidade mecânica e química são derivadas de interações inter e intramoleculares (RODRIGUES, 2009).

A utilização de colágeno como biomaterial não é recente. É descrito na literatura a utilização de materiais a base de colágeno em cirurgias reconstrutivas há mais de 200 anos (KESSLER, 2003). O avanço e o desenvolvimento dos biomateriais nos últimos 50 anos e o surgimento de tecnologias para limpeza e esterilização, intensificaram o uso de colágeno na área médica (WU, 2008; GIL *et al.*, 2016).

Colágeno tem sido utilizado em estudos de tratamentos de queimaduras, revestimento de feridas, reconstituição tecidual, reparo de hérnias, ossos, cartilagem e reconstrução guiada de ossos e dente (MIYATA, 1981). Também pode ser utilizado como mecanismo de liberação controlada de drogas (TAKEDA, 2003) e na Engenharia de Tecidos, ao promover um ambiente favorável para a atividade celular, possibilitando o crescimento de células (BARNEA, *et al.*, 2010). Essa ampla utilização do colágeno nas mais diversas funções é possível devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas, que conferem alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada, biocompatibilidade e características anti-inflamatórias (GOISSIS, 2007; FRIESS, 2011).

Diversos trabalhos têm desenvolvido curativos a base de colágeno (CHEN & CHANG, 2008; BAO *et al.*, 2008; FLECK, 2010). Esse biopolímero apresenta propriedades desejáveis para a aplicação como curativo, tais como: baixa toxicidade, alta capacidade de suporte estrutural, biodegradabilidade controlada, boa aderência na pele e biocompatibilidade (SIONKOWSKA, 2000; DI, *et al.*, 2009). Além dessas características, biomateriais feitos à base de colágeno podem estimular o recrutamento de células específicas, como macrófagos e

fibroblastos, melhorando a cicatrização da ferida e criando um ambiente que promove a cura (FLECK, 2010).

Miyata e colaboradores (1981) depositaram uma patente descrevendo a produção de curativos à base de colágeno para tratamento de feridas e queimaduras. Os curativos desenvolvidos possuíam boa aderência à ferida, aceleração no processo de epitelização, prevenção contra infecções, redução de dor, não estimulação de resposta do tecido e capacidade de preservação ao longo termo. *Fleck* e colaboradores (2010) descreveram a produção de um curativo de colágeno e celulose capaz de estimular fatores de crescimento e inativar metaloproteínases da matriz extracelular no tecido da ferida. *Bao* e colaboradores (2008) desenvolveram um compósito de colágeno e ágar para ser utilizado como curativos para tratamento de queimaduras e úlceras. O curativo desenvolvido não apresentou toxicidade e regenerou o tecido lesionado após três semanas. No estudo desenvolvido por *Chen* e colaboradores (2007) o curativo formado por um compósito de nanofibras de colágeno tipo I, quitosana e óxido de polietileno apresentou ausência de citotoxicidade contra fibroblastos. Esse curativo, em testes animais, obteve resultados melhores em regeneração tecidual, quando comparados à gaze e outros materiais de colágeno comercializados como curativo.

Filmes de colágeno também são utilizados como sistemas de liberação de fármacos, pois permitem a inserção da droga, e posteriormente, sua liberação diretamente na lesão (FRIES, 1998; NUNES, 2009). Devido à alta solubilidade em água, o colágeno pode ser extraído em uma solução aquosa e ser modelado em diferentes formas para facilitar o mecanismo de liberação. Além disso, podem ser esterilizados e quando hidrolisados tornam-se flexíveis, mantendo assim, a resistência necessária para serem manipulados (LEE *et al.*, 2001).

Estudos anteriores descreveram a utilização de colágeno sob a forma de filme, contendo substâncias bioativas como, por exemplo, tetraciclina (MINABE *et al.* 1989) e ácido úsnico (NUNES, 2009). Os filmes contendo tetraciclina propostos por *Minabe* e colaboradores (1989) foram utilizados em bolsas periodontais e após uma semana da sua aplicação, a concentração de tetraciclina no local era superior à concentração mínima inibitória da microflora, diminuindo significativamente a densidade de microrganismos. *Nunes* (2009), por sua vez, utilizou o filme de colágeno com ácido úsnico para tratamento de queimaduras provocadas em ratos e observou a melhora da cicatrização das lesões. Essa melhora foi associada à modulação da resposta inflamatória e epitelização.

Mesmo com a ampla utilização do colágeno como biomaterial, uma das limitações ao uso está relacionada ao seu elevado valor econômico. Apesar da sua abundância em

organismos animais, o colágeno puro, como matéria prima, possui um custo ainda elevado (GIL, 2013). Por isso, fontes ricas em colágenos e acessíveis financeiramente, são importantes para desenvolvimento de novos materiais.

O colágeno é uma proteína fibrosa que pode ser obtida de diversas espécies animais. Os biomateriais, na maioria das vezes, são formulados a partir de colágeno tipo I bovino, aviário ou suíno (RUSCZAK, 2003). Todavia, devido à grande atividade da indústria agropecuária no Brasil, a maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da carne, como derme e ossos. Esses tecidos passam por um tratamento químico visando a remoção da gordura, eliminação do cálcio e purificação do colágeno (SILVA & PENNA, 2012).

Dentre as atividades agropecuárias, a indústria coureira gera grande quantidade de resíduos e impactos ambientais, o que acarretou a criação de normas e legislações ambientais cada vez mais rigorosas, a fim de minimizar o impacto dessas atividades produtivas (GIL, 2003). Além da grande quantidade de resíduos gerados por esse setor, grande parte desse rejeito contém Cromo III, composto tóxico utilizado no processo de curtimento. O maior problema se encontra no resíduo sólido contendo o cromo (raspas, aparas e serragens industriais após o curtimento) que possuem aplicações limitadas, constituindo um sério nocivo ambiental. Entretanto, após tratamentos específicos, a partir desses resíduos pode ser obtido colágeno tipo I (GIL, 2013). Dessa maneira, o colágeno utilizado no presente trabalho é proveniente do resíduo da indústria coureira, tornando sua utilização economicamente viável e ambientalmente sustentável.

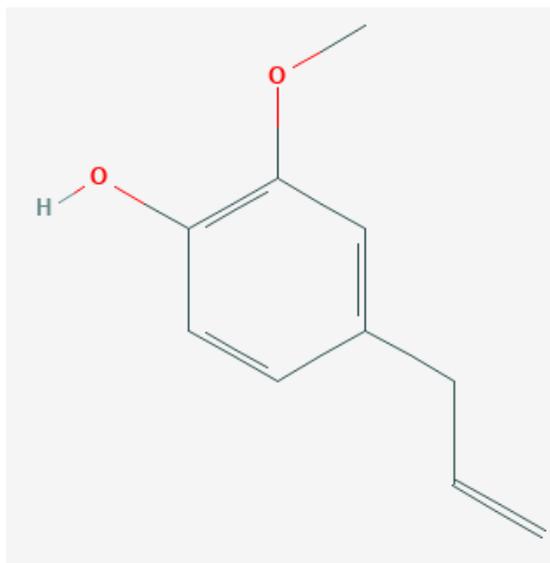
### **3.3 Óleo de Cravo**

O óleo de cravo é oriundo da planta arbórea Cravo da Índia (*Eugenia Caryophyllata*). Possui odor fortemente aromático. Sua composição química é constituída principalmente por eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico e substâncias das classes triterpeno como ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis. O eugenol, principal constituinte desse óleo, apresenta propriedades biológicas antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, propriedades antioxidantes e até mesmo anticâncer (FARJADO, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2000; PRAMOD *et al.*, 2010; CHAEIB, *et al.*, 2007). O óleo de cravo pode conter até 90% de eugenol, tendo como segundo maior constituinte o cariofileno (ASCENÇÃO *et al.*, 2013). Desta forma, o baixo custo e o alto teor

de eugenol fazem do óleo de cravo uma opção interessante como matéria-prima para a produção de produtos de maior valor comercial (CRAVEIRO *et al.*,1993).

O eugenol é um fenilpropeno, um guaiacol com uma cadeia lateral alílica (Figura 1) e constitui-se como um líquido oleoso, límpido, com coloração amarela pálida e um aroma picante. É extraído principalmente do cravo da índia, canela, folha de louro, noz-moscada, manjerição e baunilha (CHATTERJEE *et al.*, 2013; WORANUCH *et al.*, 2013)

**Figura 1 – Estrutura química do eugenol**



Fonte: National Center for Biotechnology Information - PubChem Database. Eugenol.

O eugenol é um líquido com densidade de 1,067g/ml à temperatura de 25°C, massa molecular de 164,20g.mol<sup>-1</sup>, ponto de fusão de -7,5°C e ponto de ebulição de 254°C, sendo ligeiramente solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos (MOUCHREK FILHO, 2000). O eugenol tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e na indústria alimentícia (embalagens) devido ao seu potencial caráter antimicrobiano e atividade antioxidante (CHATTERJEE & BHATTACHARJEE, 2013; GOÑI *et al.*, 2016). A atividade do eugenol contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (DORMAN, 2000; FRIEDMAN, *et al.*, 2002) ocorre devido ao mecanismo de ação do fenilpropeno que causa disrupção da membrana plasmática e alteração dos componentes celulares. Além disso, o eugenol também inibe a produção de enzimas essenciais nas bactérias (HELANDER, *et al.*, 1998).

Existem diversos estudos que relatam a incorporação de eugenol em filmes poliméricos para ser utilizado como embalagens, a fim de melhorar a preservação da comida (LIMA, *et al.*, 2017). Além disso, o eugenol é muito utilizado na odontologia como produto

antisséptico de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida (MAZZAFERA, 2003). Entretanto, não há trabalhos na literatura em que o eugenol tenha sido incorporado em filmes de colágeno para a aplicação como curativos.

### 3.4 Material Proposto

O curativo é uma abordagem terapêutica amplamente utilizada na prática clínica e que deve possibilitar o processo de cicatrização da ferida. Para isso, o curativo deve manter a área da ferida limpa, promovendo conforto e higiene ao paciente; apresentar impermeabilidade a bactérias, prevenindo infecções; possibilitar a troca gasosa, promovendo a oxigenação e permitir a manutenção de meio úmido no local da ferida, acelerando a epitelização (ECHER *et al.*, 2013).

A produção de curativos também deve considerar a utilização de matérias-primas abundantes e de menor custo, por meio de processos de fabricação de automatização acessível (IGNACIO, 2009). Além da pesquisa por materiais de menor custo com o intuito de produzir curativos mais acessíveis à população, é de extrema relevância investigar materiais que apresentem propriedades biológicas, mecânicas, e/ou físico-químicas que confirmem características particulares a esses curativos (MACHADO, 2017).

Desta forma, no presente estudo, propõe-se a produção de um filme constituído de colágeno reciclado da indústria do couro com a adição de óleo de cravo. Os filmes serão produzidos pela técnica de evaporação de solvente, um dos processos mais utilizados para produzir filmes a partir de termoplásticos (CAIRES, 2009). Nessa técnica o polímero é disperso em um solvente adequado, a solução resultante é espalhada em uma superfície plana e, após a evaporação do solvente, o filme é formado (JONES e MEDLICOTT, 1995). A evaporação de solvente consiste em uma técnica simples que não exige equipamentos robustos e possibilita a obtenção de filmes de pequena espessura (CAIRES, 2009).

Inicialmente, o óleo de cravo foi analisado por cromatografia gasosa para a verificação de sua composição. Em seguida, os filmes de colágeno com e sem óleo de cravo incorporado foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TG) e ângulo de contato. O perfil de liberação do óleo de cravo foi avaliado por espectroscopia de UV-VIS e a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão em ágar.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais

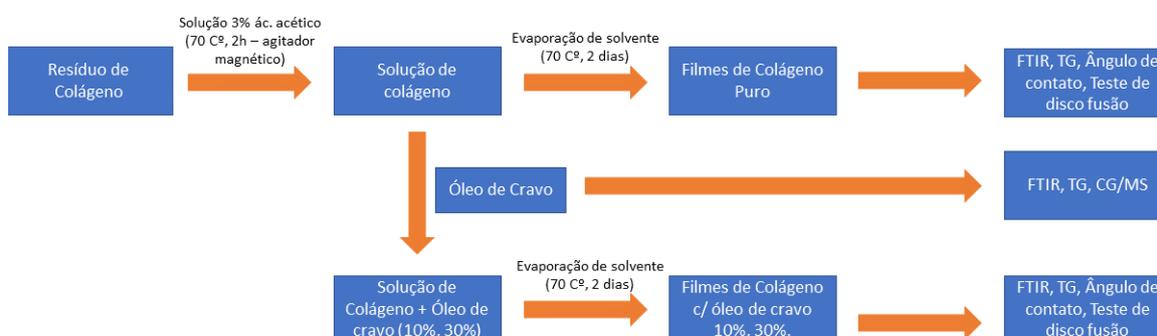
Os materiais e os reagentes empregados para a produção dos filmes de colágeno com e sem óleo de cravo foram:

- Resíduo de colágeno gentilmente cedido pelo Departamento de Química da UFMG em colaboração com professor Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira.
- Óleo de cravo da Laszlo<sup>®</sup> (CG: Eugenol 90-95%).
- Ácido Acético Glacial PA (99,7%) da Synth<sup>®</sup>.
- Água destilada e água ultrapura.
- Antibióticos tetraciclina e ampicilina - CECON<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil.
- Meio Agar Miller-Hilton da Kasvi<sup>®</sup> (Itália).

### 4.2 Delineamento Experimental

As etapas de produção e caracterização dos filmes de colágeno com e sem óleo de cravo estão apresentadas no fluxograma (Figura 2).

**Figura 2 – Fluxograma das etapas de trabalho.**

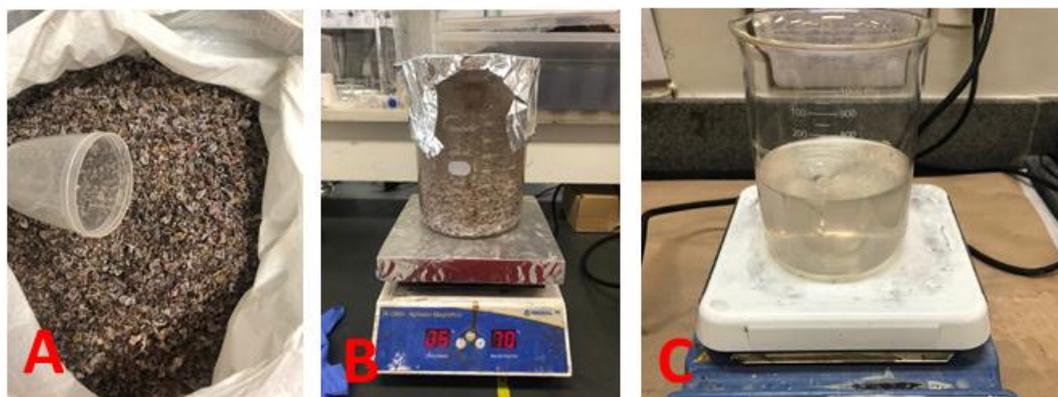


Fonte: Próprio autor.

### 4.3 Preparo da solução de colágeno

O resíduo de colágeno (Figura 3A) foi solubilizado em uma solução de ácido acético 3% (v/v) na concentração de 1% em massa do soluto por volume de solução. O objetivo dessa hidrólise foi a quebra parcial das ligações entre as hélices do colágeno. A solução foi mantida por duas horas à temperatura de 70°C, mediante agitação constante (Figura 3B). Decorrido esse tempo, foi realizado uma filtração, primeiramente, passando a solução em uma peneira e, posteriormente em uma peneira forrada de algodão para remoção de possíveis impurezas provenientes do resíduo de colágeno (Figura 3C). Essa etapa experimental foi feita de acordo com o trabalho anteriormente realizado por GIL e colaboradores (2016).

**Figura 3 – Solubilização do resíduo de colágeno da indústria coureira.**



A) Resíduo de Colágeno, (B) Solubilização do colágeno com solução de ácido acético 3% (v/v), (C) Solução de Colágeno

Fonte: Próprio autor.

### 4.4 Determinação da concentração da solução de colágeno

Para determinação da concentração de colágeno na solução, pesou-se o béquer vazio ( $m_1$ ). Feito isso, adicionou-se 50ml da solução de colágeno nesse béquer e deixou esse sistema secar por 3 dias, na estufa à 70°C. Após completa secagem, pesou-se novamente o béquer ( $m_2$ ). Com isso, determinou-se a massa de colágeno ( $m_c$ ) através da diferença entre  $m_2$  e  $m_1$ . Essa etapa foi realizada em triplicada.

#### 4.5 Produção dos filmes

A produção dos filmes de colágeno por evaporação de solvente foi realizada utilizando a solução de colágeno obtida. Adicionou-se 478ml dessa solução em moldes de polipropileno, tampada com papel alumínio perfurado. O material secou na estufa a 70°C por dois dias. Em seguida, a molde de polipropileno foi retirada da estufa e após resfriamento em temperatura ambiente o filme foi cuidadosamente removido .

Filmes de colágeno incorporados com 10% e 30 % m/m de óleo de cravo também foram produzidos pela técnica de evaporação de solvente. O óleo foi pesado em um béquer, depois de adicionada a solução de colágeno, a mistura foi agitada por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução resultante foi vertida no molde de polipropileno e seguiram-se os mesmos procedimentos utilizados para a produção do filme de colágeno puro.

#### 4.6 Caracterização do Óleo de Cravo

A caracterização do óleo de cravo foi realizada pelas técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS) e Análise Termogravimétrica (TG). A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi realizada no equipamento SHIMADZU IR Prestige-21, com faixa de trabalho 4000cm<sup>-1</sup> a 400cm<sup>-1</sup> em atmosfera inerte. A técnica de GC/MS foi realizada em um cromatógrafo AGILENT TECHNOLOGIES 7890A acoplado a espectrômetro de massa 5975C. O óleo de cravo foi diluído em metanol (1:9) e a análise foi realizada com aquecimento de 50 a 600°C, por 15 min, em coluna de fenilmetilsiloxano HP-5MS a 5%. A análise termogravimétrica foi conduzida no equipamento DTG 60H da SHIMADZU, utilizando 1,25mL de óleo, submetido a uma faixa de temperatura da ambiente até 800 °C, com taxa de aquecimento mantida em 15°C/min e fluxo de nitrogênio de 50ml/min.

#### 4.7 Caracterização dos filmes

Depois de produzidos, os filmes de colágeno com e sem óleo de cravo foram caracterizados pelas seguintes técnicas: FTIR, TG, ângulo de contato, espectroscopia de UV-VIS e ensaio de disco-difusão.

#### **4.7.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier**

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada no equipamento SHIMADZU IR Prestige-21, com faixa de trabalho  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $400\text{cm}^{-1}$  em atmosfera inerte.

#### **4.7.2 Análise Termogravimétrica**

A análise termogravimétrica foi conduzida no equipamento DTG 60H da SHIMADZU, utilizando 50 miligramas dos filmes, submetidos a uma faixa de temperatura, da ambiente até  $600^{\circ}\text{C}$ , com taxa de aquecimento mantida em  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fluxo de nitrogênio de  $50\text{ml}/\text{min}$ .

#### **4.7.3 Ângulo de Contato**

As medições do ângulo de contato foram realizadas no equipamento DSA1 da KRUSS. Para realizar a medição os filmes foram cortados em fragmentos de  $1\text{cm}^2$ . O ensaio foi realizado em triplicata e  $2\mu\text{L}$  de água foram colocados sobre os filmes com auxílio de uma seringa, a velocidade do embolo foi mantida em  $10\text{ mm}/\text{min}$ . O procedimento foi executado em diferentes regiões de cada filme, e o ângulo  $\theta$  final foi calculado como uma média simples dos ângulos encontrados nas medições.

#### **4.7.4 Espectroscopia UV-vis**

O perfil de liberação do óleo de cravo incorporado aos filmes de colágeno foi estimado pela técnica de espectroscopia UV-vis utilizando o espectrofotômetro da PerkinElmer Lambda 1050 e cubeta de quartzo de  $1,0\text{cm}$ . Primeiramente foi construída uma curva de calibração para o óleo de cravo. Para isso, partiu-se da concentração de  $0,01\%$  m/m de óleo de cravo em água ultrapura e realizou-se a leitura da absorbância de  $190\text{nm}$  a  $800\text{nm}$ . A partir da varredura, encontrou-se o comprimento de onda com a máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}} = 279\text{nm}$ ). Após a determinação do comprimento de onda, a curva de calibração foi realizada utilizando as concentrações de  $0,025\%$  a  $0,01\%$  de óleo de cravo totalizando 7 pontos. As leituras foram

realizadas em triplicata. A partir dos valores de absorvância obtidos, determinou-se através do método dos mínimos quadrados, a equação da curva de calibração.

Para o estudo de liberação do óleo de cravo, 0,5g dos filmes (puro, 10% e 30 % de óleo de cravo) foram colocados em um béquer de vidro contendo 40ml de água ultrapura. Uma alíquota de 3ml da amostra foi retirada em intervalos de tempo pré-determinados de 15 minutos até completar 150 minutos de exposição dos filmes na água. Essas alíquotas foram analisadas no comprimento de onda máximo encontrado na curva de calibração ( $\lambda_{\text{máx}} = 279\text{nm}$ ). A quantidade de óleo de cravo liberado com o tempo foi determinada utilizando a curva de calibração feita anteriormente.

#### 4.7.5 Ensaio de disco-difusão

A determinação da atividade antimicrobiana dos filmes de colágeno produzidos com e sem óleo de cravo foi realizada pelo método de disco-difusão. A tabela 1 sumariza os microrganismos, o meio de cultura e os discos de antibióticos utilizados no ensaio.

**Tabela 1 – Microrganismos e materiais utilizados no ensaio de disco-difusão em ágar.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Meio de Cultura</b>	<b>Disco de Antibiótico</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	Ágar Mueller Hinton	Tetraciclina (30 mcg)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Ágar Mueller Hinton	Ampicilina (10 mcg)

Fonte: Próprio autor.

Em placas de petri contendo o meio ágar Mueller Hinton foram espalhados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão microbiana em fase exponencial de crescimento (escala Mac Farland de 0,5). Em seguida, amostras de 5mm de diâmetro dos filmes de colágeno (com e sem óleo de cravo), do óleo de cravo puro, do óleo de cravo diluído em etanol nas mesmas proporções do óleo no filme (10% e 30%) e dos controles (positivo – antibióticos e negativo – solução salina) foram colocadas sob o meio sólido com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram levadas para estufa microbiológica Quimis® modelo Q316M à 37°C durante o período de 24 horas. Após o período de incubação houve a avaliação do halo de inibição (área da placa de cultivo sem

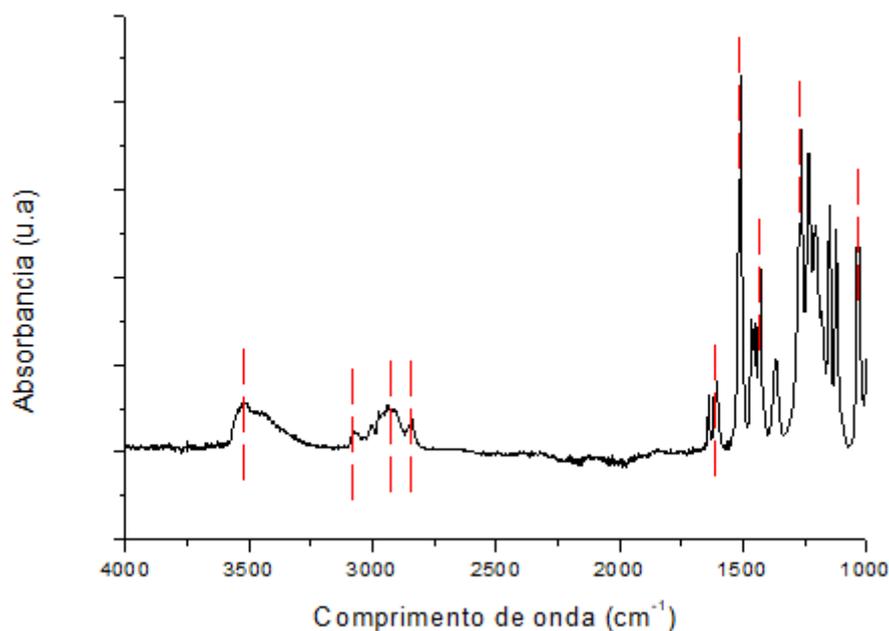
crescimento visível dos microrganismos a olho nu) conforme norma ANVISA M2-A8. O diâmetro de cada halo formado foi medido com paquímetro MITUTOYO (0,05mm) e os resultados encontrados comparados com os valores padrões dos halos inibitórios para os antibióticos. O ensaio foi realizado em duplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização do Óleo de Cravo

As principais bandas de absorção do óleo de cravo obtidas pela técnica de FTIR são apresentadas na figura 4 e identificadas na Tabela 2.

**Figura 4 – FTIR do óleo de cravo**



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 2: Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para o óleo de cravo.**

<b>Comprimento de Onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Associado com</b>
<b>3520</b>	3500 -3350 cm <sup>-1</sup> – O-H
<b>3077</b>	3080 – 3020 cm <sup>-1</sup> – =C-H
<b>2834</b>	2960 - 2850 cm <sup>-1</sup> – C-H alifáticos
<b>1612, 1514</b>	1600 – 1450 cm <sup>-1</sup> – C=C do anel aromático
<b>1261</b>	1275 - 1020 cm <sup>-1</sup> - C-O de éteres
<b>1032, 750</b>	C-H aromático

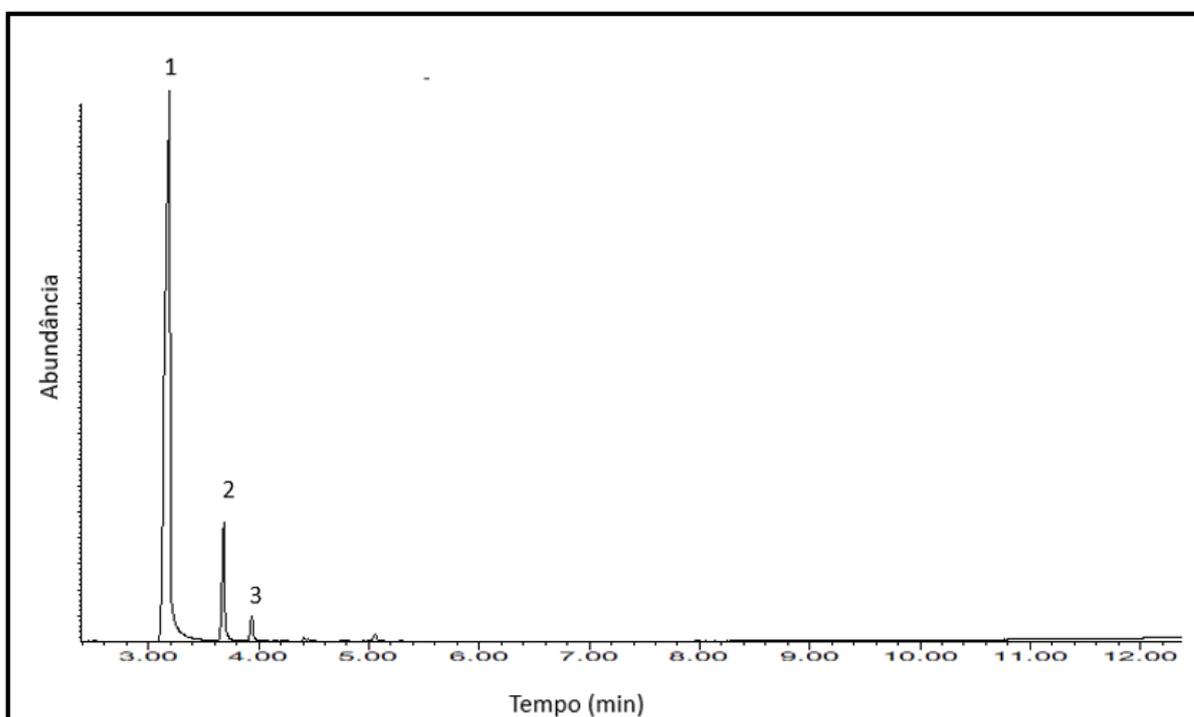
Fonte: Próprio autor.

As bandas de absorção, listadas na tabela, em comprimentos de onda de  $3500\text{ cm}^{-1}$  a  $3350\text{ cm}^{-1}$  que são associadas com vibrações de estiramento O-H. Bandas de absorção em  $3077\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo =C-H, em  $2900\text{ cm}^{-1}$  devido a deformação axial dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , em  $1640\text{ cm}^{-1}$  deformação referente ao grupo C=C, em  $1600\text{ cm}^{-1}$ -  $1514\text{ cm}^{-1}$  deformação axial C=C no anel aromático e em  $1033\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo C-H aromático com deformação angular fora do plano referente. Em um estudo de caracterização do eugenol, Chen *et al.* (2014) e Meneses *et al.* (2018) relatam a presença de bandas semelhantes.

Desta forma, é possível observar que no presente trabalho, o espectro de absorção do óleo de cravo na região do infravermelho contém bandas características do eugenol, confirmando a presença deste composto no óleo de cravo utilizado. Além disso, de acordo com os resultados obtidos, não foram observadas bandas de absorção que pudessem indicar a presença de substâncias contaminantes.

O cromatograma do óleo de cravo obtido pela técnica GC/MS encontra-se representado na figura 5. Os principais constituintes encontrados com os respectivos tempos de retenção e porcentagem de abundância estão representados na tabela 3.

**Figura 5 – Cromatograma GC/MS do óleo de cravo.**



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 3 – Constituintes encontrados no óleo de cravo através da técnica de GC/MS.**

	<b>Constituinte</b>	<b>Tempo</b>	<b>% Abundância</b>
<b>1</b>	Eugenol	3,153 min	85,47 %
<b>2</b>	Cariofileno	3,686 min	12,36%
<b>3</b>	Humuleno	3,944 min	1,46%

Fonte: Próprio Autor

Os resultados encontrados confirmam que o eugenol é o componente majoritário do óleo de cravo utilizado, com uma abundância de 85,47 %, seguido pelo cariofileno com 12,36 %. O percentual encontrado para o eugenol e para o cariofileno é semelhante ao observado em trabalhos anteriores (Marques, 2006; Oliveira *et al.*; 2009; Costa *et al.*, 2011). Além disso, os constituintes presentes em maior proporção no óleo de cravo apresentam interessantes propriedades biológicas, como pode ser observado na tabela 4, justificando a adição desse óleo em biomateriais, especialmente os curativos.

**Tabela 4 – Constituintes com atividades biológicas relatados para o óleo de Cravo.**

<b>Constituinte</b>	<b>Atividade biológica</b>
<b>Eugenol</b>	Antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatória
<b>Cariofileno</b>	Antibacterianas e anti-inflamatórias
<b>Humuleno</b>	Anti-inflamatório

Fonte: Adaptado de SILVESTRI *et al.*, 2010; BONAN *et al.* (2015)

## **5.2 Produção dos filmes de colágeno com e sem óleo de cravo**

O aspecto dos filmes de colágeno com e sem óleo de cravo produzidos pela técnica de evaporação de solvente pode ser observado na figura 6.

**Figura 6 – Filmes de Colágeno produzidos**

A) Filme de Colágeno puro, (B) Filme de Colágeno com 10 % de óleo de cravo, (C) Filme de Colágeno com 30 % de óleo de cravo.

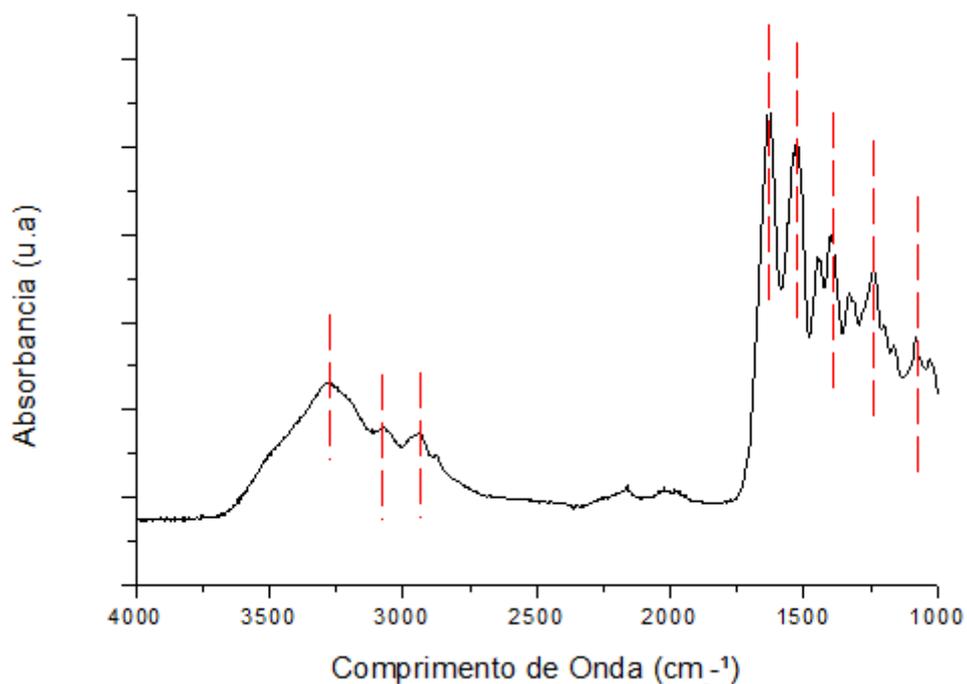
Fonte: Próprio autor.

A técnica utilizada de evaporação de solvente possibilitou a produção de filmes com espessura variada entre 0,03mm a 0,10mm. Apesar da coloração marrom característica do colágeno utilizado, os filmes ainda apresentaram certa transparência, característica importante para a aplicação como curativo. Nos filmes com óleo o odor característico do cravo se manteve. Os filmes produzidos não eram uniformes, apresentando algumas partes mais finas e outras mais espessas; isso pode ter ocorrido devido ao utensílio plástico usado, aos desníveis da estufa utilizada para a secagem do material e também devido a circulação de ar existe na estufa.

### **5.3 Caracterização físico-química dos filmes de colágeno**

#### **5.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier**

O espectro de absorção obtido por FTIR para o filme de colágeno puro encontra-se apresentado na Figura 7 e as principais bandas identificadas na Tabela 5.

**Figura 7 – FTIR do filme de colágeno puro**

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 5– Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para o filme de colágeno puro**

Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Associado com
3280	3400-3200 cm <sup>-1</sup> O-H / 3600-3150 cm <sup>-1</sup> ν(N-H)
3071, 2937, 2877	2800-3000 cm <sup>-1</sup> ν(C-H)
1628	1600-1760 cm <sup>-1</sup> (amida I: ν (C=O))
1530	1540 cm <sup>-1</sup> (amida II: δ N-H + ν C-N + ν C-C)
1448	1450 cm <sup>-1</sup> ν(C-H) do anel pirrolídico
1390	1390 - 1370 cm <sup>-1</sup> - CH <sub>3</sub>
1239	1300 – 1200 cm <sup>-1</sup> - C-O de ác. carboxílicos
1081	1280 - 1180 cm <sup>-1</sup> - C-N de alifáticos

Fonte: Próprio autor.

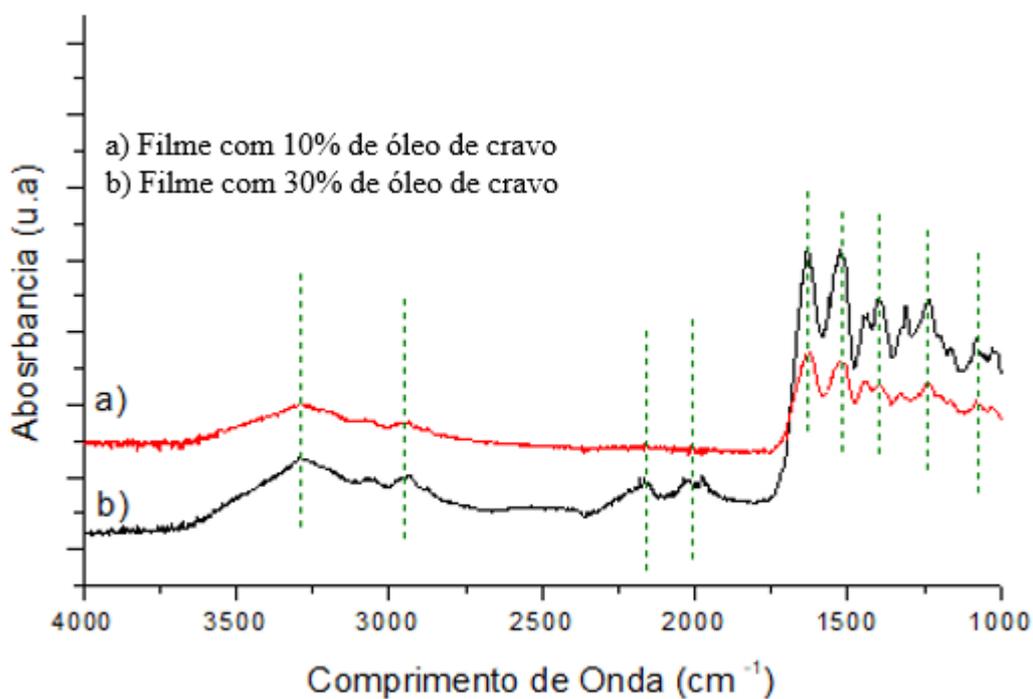
A soma das bandas de absorção encontradas indicam que o filme é composto por colágeno tipo I, conforme anteriormente descrito na literatura (GIL, *et al.*, 2016) Além de confirmar a composição do colágeno pela presença de bandas de absorção características, o

espectro de FTIR também pode ser utilizado para verificar a integridade da estrutura de tripla hélice do colágeno. Esse procedimento é necessário quando o colágeno é submetido a tratamentos na presença de soluções ácidas. Para isso, faz-se a razão entre as intensidades das bandas em  $1235/1450\text{ cm}^{-1}$  que são associadas com os estiramentos e deformações nas ligações presentes no grupo amida III e da ligação C-H do carbono da cadeia principal (GIL, *et al.*, 2016). A razão de 1,0 indica a manutenção da integridade da estrutura de tripla hélice, sendo o menor valor aceitável de 0,5, pois valores menores que este indicam desnaturação da proteína (GORDON, *et al.*, 1974; GIL, *et al.*, 2016). O valor obtido no presente estudo foi de 0,84, indicando que a estrutura do colágeno foi, em grande parte, preservada durante o processamento do filme.

A presença da banda característica do estiramento C-O de ácido carboxílico ( $1239\text{cm}^{-1}$ ) pode ser tanto oriunda das ligações da estrutura do colágeno, como também remanescente do ácido acético utilizado para a produção da solução de colágeno (SADER, 2010, GIL *et al.*, 2016). Todavia, mesmo que o ácido acético esteja presente no material, trabalhos anteriores indicam que esse composto não é citotóxico para as condições testadas (GIL *et al.*, 2016). Neste sentido, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos biológicos do possível ácido acético remanescente no material.

Os filmes de colágeno contendo óleo de cravo também foram caracterizados por FTIR. Os espectros de absorção obtidos estão apresentados na figura 8 e identificados na tabela 6.

**Figura 8: FTIR dos filmes de colágeno incorporados com óleo de cravo.**



Fonte: Próprio autor

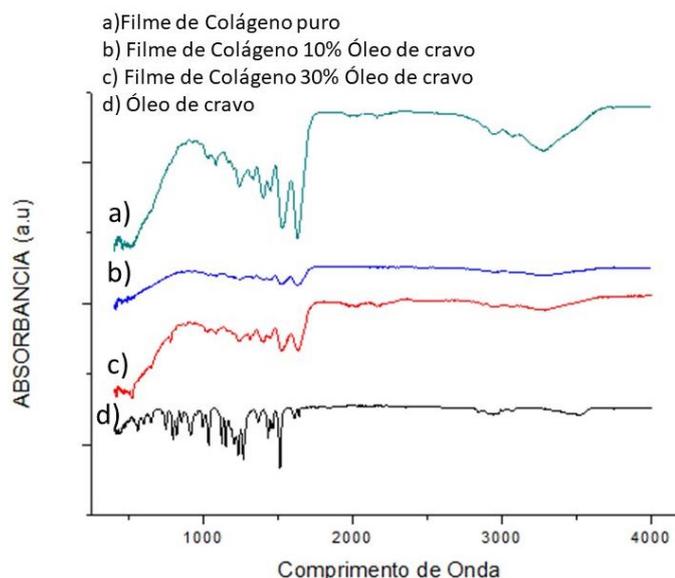
**Tabela 6: Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para os filmes de colágeno incorporados com óleo de cravo.**

Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Associado com	Referente à
<b>3293</b>	3400-3200 cm <sup>-1</sup> O-H / 3600-3150 cm <sup>-1</sup> v(N-H)	Colágeno
<b>3067</b>	3080 – 3020 cm <sup>-1</sup> – =C-H	Eugenol e Colágeno
<b>2926, 2871</b>	2960 - 2850 cm <sup>-1</sup> – C-H alifáticos	Eugenol
<b>1628, 1450</b>	1600 – 1450 cm <sup>-1</sup> – C=C do anel aromático	Eugenol
<b>1307, 1230</b>	1300 – 1200 cm <sup>-1</sup> - C-O de ác. carboxílicos	Colágeno
<b>1078</b>	1280 - 1180 cm <sup>-1</sup> - C-N de alifáticos	Colágeno

Fonte: Próprio autor

O espectro dos filmes de colágeno contendo 10% e 30 % de óleo de cravo apresentaram alterações quando comparados ao espectro do filme de colágeno puro conforme visualizado na figura 9, nas bandas de  $1600 - 1450 \text{ cm}^{-1}$  e  $3293 \text{ cm}^{-1}$ , que correspondem às vibrações das ligações C=C do grupo aromático e da ligação O-H, respectivamente; grupos funcionais presentes no eugenol (SILVERSTEIN *et al*, 2007). Além disso, a absorção entre  $2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento da ligação C-H alifático, também característico do eugenol (SILVERSTEIN *et al*, 2007) Como o eugenol é o constituinte majoritário do óleo de cravo, é possível atribuir a existência dessas bandas à incorporação do óleo de cravo na matriz de colágeno no presente estudo. Adicionalmente, conforme o esperado pode-se perceber que o filme contendo 30% de óleo de cravo apresenta bandas com maior intensidade quando comparado ao filme contendo 10% de óleo.

**Figura 9: FTIR das amostras**



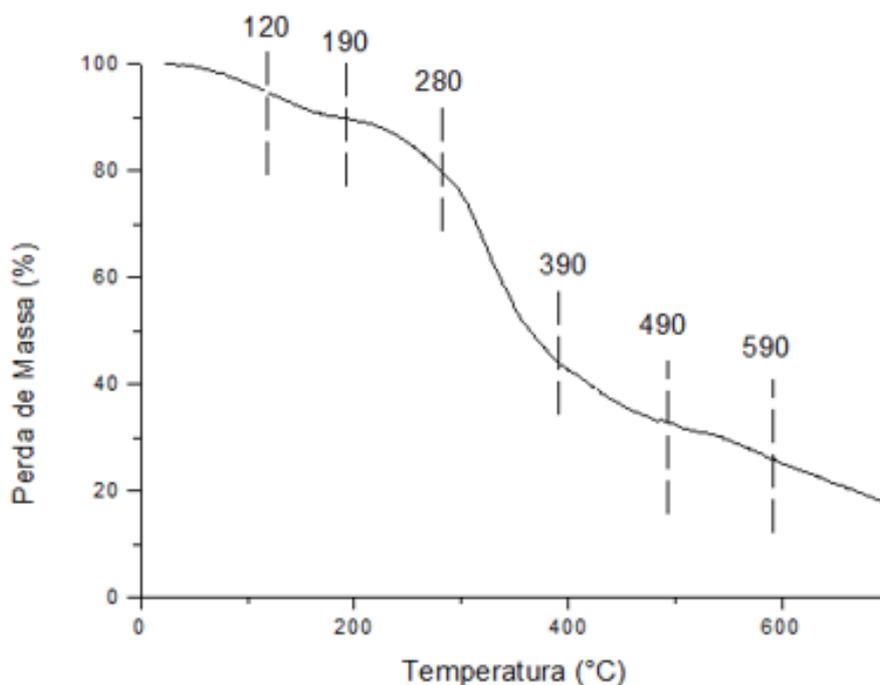
Fonte: Próprio autor.

### 5.3.2 Análise Termogravimétrica

As propriedades térmicas dos filmes de colágeno puro, do óleo de cravo e dos filmes incorporados com óleo de cravo foram obtidas por análise termogravimétrica (TG). A análise da curva termogravimétrica do filme de colágeno puro (Figura 10) mostra que a perda de

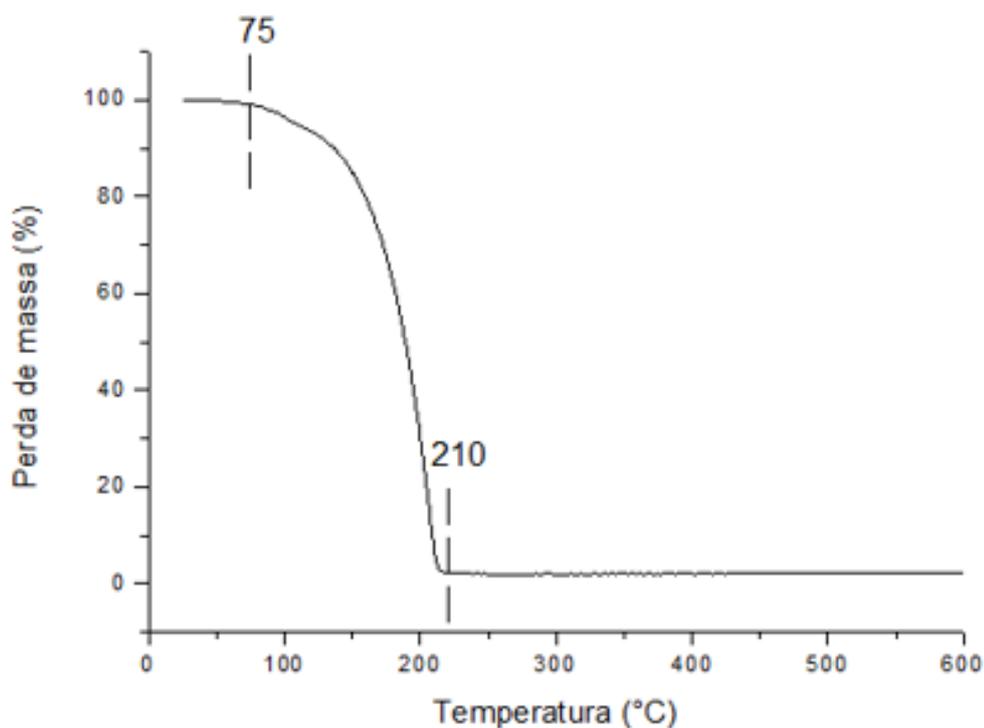
massa ocorre em quatro principais estágios. O primeiro estágio, referente a perda de água de até 100°C, o segundo estágio de 130°C a 190°C pode ser atribuído à perda de água da estrutura do colágeno. O terceiro estágio de 280°C a 390°C pode ser atribuído à degradação térmica do esqueleto da cadeia do colágeno e o quarto estágio entre 490°C e 590°C está relacionado com a carbonização do material, devido a presença de oxigênio no ar (Friess, 1999, Gil, 2013, Rodrigues *et al*, 2017)

**Figura 10 – Análise termogravimétrica do filme de colágeno puro**



Fonte: Próprio autor.

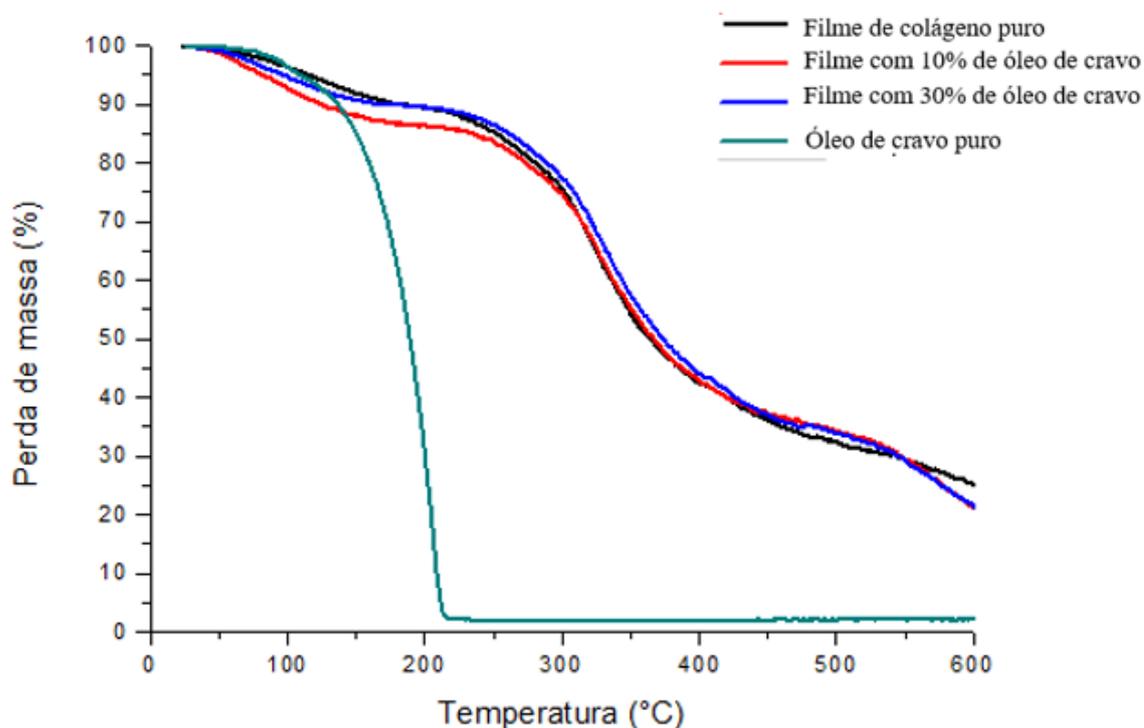
Na análise termogravimétrica do óleo de cravo (Figura 11) observa-se que até 75°C o óleo apresenta estabilidade térmica e há apenas uma etapa de decomposição que inicia-se a partir de 75°C e termina em 210°C. Nesse período tem-se uma perda de massa de aproximadamente 96%. Esse perfil ocorre possivelmente devido à alta volatilidade dos óleos essenciais e reações de decomposição. Em estudos anteriores, Teodoro (2016) observou um comportamento térmico similar para o óleo de cravo. Como no presente trabalho a temperatura máxima utilizada para a produção dos filmes de colágeno incorporados com óleo de cravo foi 70 °C, a baixa resistência térmica deste óleo não constitui um problema para a produção do material.

**Figura 11 – Análise termogravimétrica do óleo de cravo**

Fonte: Próprio autor

Na figura 12 as curvas termogravimétricas do óleo de cravo, do filme de colágeno puro e dos filmes com óleo de cravo incorporados são apresentadas. Na tabela 7 as porcentagens de perda de massa em função da temperatura desses materiais encontram-se detalhadas. O filme contendo 10% de óleo de cravo apresentou perda de massa maior ou igual ao filme de colágeno puro em todas as temperaturas analisadas. Esse comportamento pode ter ocorrido em função da decomposição do óleo que se inicia a partir de 75°C. Todavia, esse padrão não foi observado em todas as temperaturas para o filme contendo 30% de óleo de cravo. Esse resultado pode sugerir que o óleo não tenha sido completamente incorporado ao filme ou tenha sofrido exsudação. Desta forma, estudos futuros para entender o comportamento térmico desses materiais são necessários.

**Figura 12 – Análise termogravimétrica das amostras**



Fonte: Próprio autor

**Tabela 7 – Porcentagem de massa do óleo de cravo e dos filmes de colágeno puro e incorporados com o óleo de cravo, em função da temperatura.**

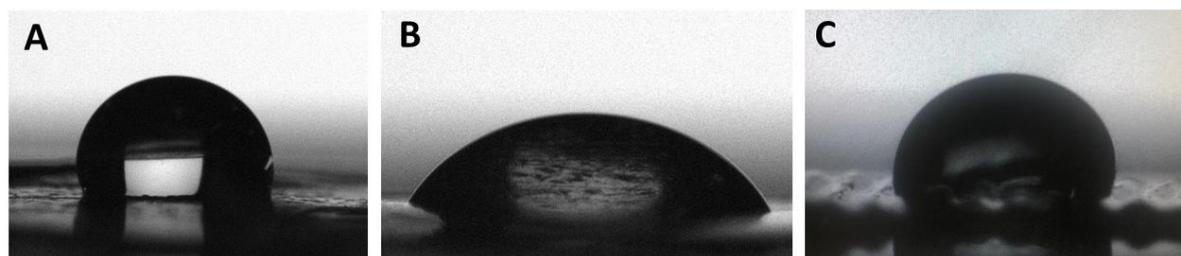
	100 °C	200 °C	300 °C	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Puro</b>	96,3 %	89,3 %	75,3 %	42,18 %	32,1 %	25,1 %
<b>Óleo</b>	95,8 %	30,8 %	2,1 %	2 %	2 %	2 %
<b>10%</b>	94,6 %	85,98 %	74,2 %	42,18 %	32,12 %	21,3 %
<b>30%</b>	94,4 %	89,4 %	77,7 %	44 %	34,12 %	21,3 %

Fonte: Próprio autor

### 5.3.3 Ângulo de contato

A imagem da gota de água em contato com os diferentes filmes de colágeno e os valores médios dos ângulos estão representados na figura 13 e tabela 8, respectivamente.

**Figura 13– Imagem da gota de água na superfície dos filmes**



(A) Filme de Colágeno puro, (B) Filme de Colágeno com 10 % de óleo de cravo, (C) Filme de Colágeno com 30 % de óleo de cravo.

Fonte: Próprio autor

**Tabela 8 – Ângulos de contato dos filmes de colágeno.**

<b>FILMES DE COLÁGENO</b>	<b>ÂNGULO DE CONTATO (Média ± desvio padrão)</b>
Filme Colágeno Puro	95 ° ± 5 °
Filme de Colágeno com 10 % óleo de cravo	52 ° ± 4 °
Filme de Colágeno com 30% óleo de cravo	92 ° ± 3 °

Fonte: Próprio autor

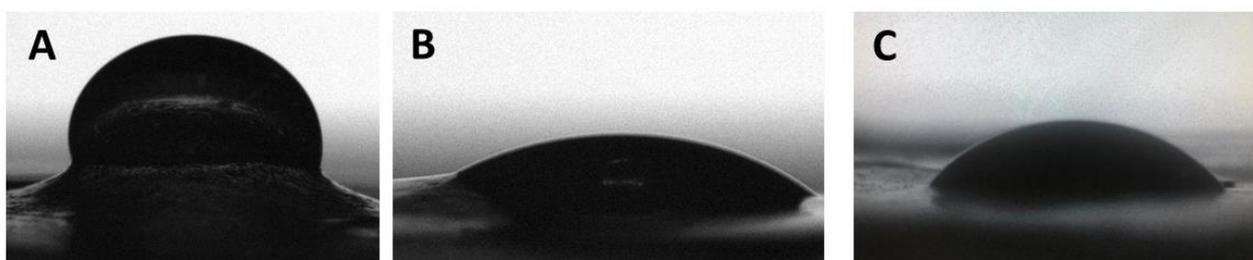
Segundo Barrioni *et al.* (2015) baixos ângulos de contato indicam uma maior interação do material com a água, ou seja, o material é hidrofílico. E o material apresenta caráter hidrofóbico quando os valores de ângulos estiverem acima de 90 °. Considerando o desvio padrão, todos os filmes produzidos podem apresentar valores de ângulos abaixo de 90 °, apresentando, portanto, caráter hidrofílico. Entretanto, os resultados encontrados para os filmes contendo óleo de cravo, especialmente do filme contendo 10%, não foram esperados, uma vez que a adição de um óleo, a princípio, deveria tornar o material mais hidrofóbico.

Sabe-se que a superfície do material interfere em seu caráter hidrofílico. Assim, superfícies com menor rugosidade propiciam maior área de contato entre o material e a água, e por sua vez, foram ângulos menores. Já superfícies mais rugosas levam à menor área de contato, devido à presença de bolhas de ar presas na superfície, gerando ângulos de contato maiores (TIJING *et al.*, 2013). Desta forma, os resultados inesperados encontrados no presente trabalho podem ter ocorrido devido à diferença de rugosidade dos filmes. Outra possibilidade que também deve ser levada em consideração é a falta de homogeneidade do

óleo incorporado aos filmes. Neste sentido, estudos posteriores devem ser realizados para analisar a topografia dos filmes e otimizar o processo de homogeneização do óleo.

Também foi analisado o contato dos filmes com a água após 5 minutos. Como pode ser analisado na figura 14, o material foi gradativamente interagindo e absorvendo a água. Esse mesmo comportamento foi descrito anteriormente por GIL e colaboradores (2016). Isso ocorre porque o colágeno na presença de água forma um hidrogel. Portanto, o colágeno é capaz de sair do estado sólido para se gelificar na presença de água. O colágeno, em sua forma gel primeiro incha ao entrar em contato com a água e depois inicia o processo de degradação .

**Figura 14– Imagem da gota de água na superfície dos filmes após 5 min**



(A) Filme de Colágeno puro, (B) Filme de Colágeno com 10 % de óleo de cravo, (C) Filme de Colágeno com 30 % de óleo de cravo.

Fonte: Próprio autor

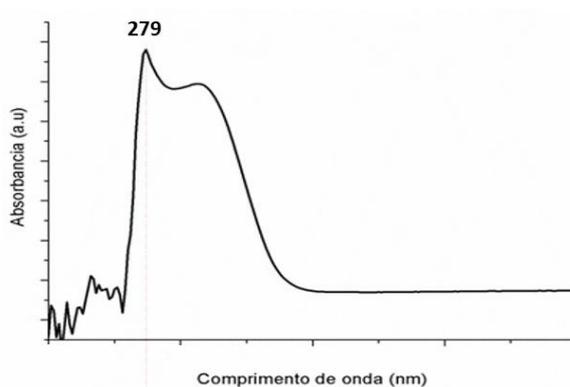
A hidrofiliabilidade é uma propriedade importante no campo biomédico, pois a molhabilidade afeta a interação das células com os materiais em que estão em contato (BARRIONI *et al.*, 2015). Os filmes hidrofílicos empregados como curativo possibilitam a permeabilidade seletiva e a manutenção da umidade da ferida que contribuí para o processo de regeneração das células, além de minimizar as dores devido ao ressecamento de terminações nervosas.

Além disso, o comportamento de formação de hidrogel, e em seguida, degradação do colágeno (GIL *et al.*, 2016) são características interessantes para aplicação como curativos, uma vez que dispensa a remoção do material da pele no momento da colocação de um novo curativo. Esse comportamento favorece o processo de cicatrização tecidual, já que o ato de remover o curativo acaba danificando as células neoformadas e retarda o processo de cura.

### 5.3.4 Ensaio de liberação do óleo de cravo

O perfil de liberação do óleo de cravo incorporado aos filmes de colágeno foi estimado pela técnica de espectroscopia UV-vis. Na figura 15 está representado o espectro UV-vis do óleo de cravo diluído em água ultrapura na concentração de 0,01%.

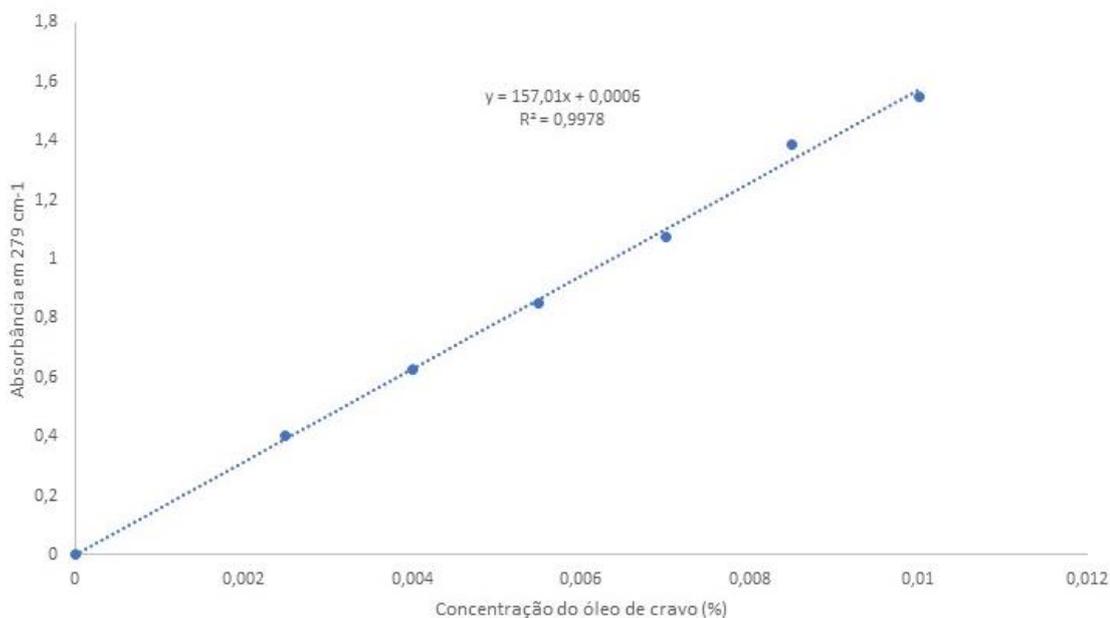
**Figura 15– Espectroscopia UV/vis do óleo de cravo em água ultrapura**



Fonte: Próprio autor

Como pode ser observado, o comprimento de onda em que ocorreu a maior absorbância para o óleo de cravo foi em 279nm, resultados similares foram relatados por Pereira (2007). A partir desse resultado, a curva de calibração do óleo de cravo diluído em água ultrapura foi realizada (Figura 16).

**Figura 16– Curva de calibração do óleo de cravo em água ultrapura**



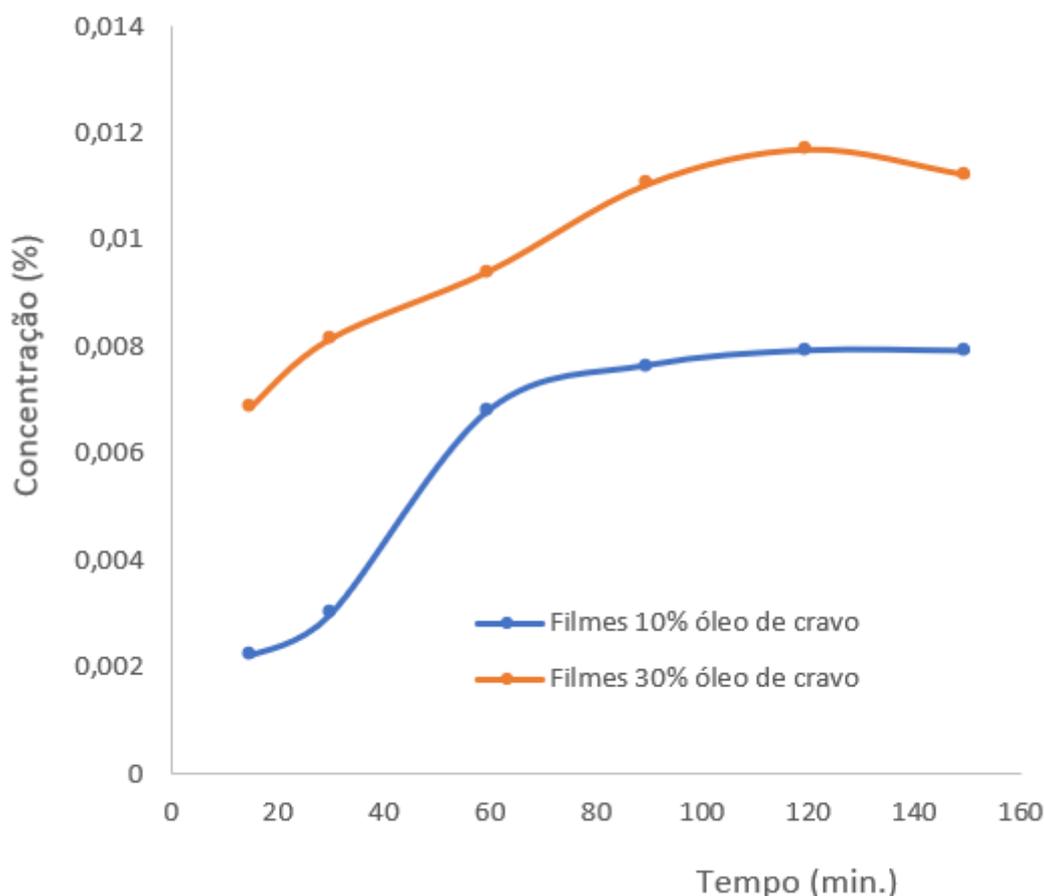
Fonte: Próprio autor

Utilizando a equação da reta obtida pela curva de calibração foi determinada a concentração média de óleo de cravo liberado. A tabela 9 exibe os valores médios das porcentagens de óleo de cravo liberado dos filmes de colágeno em função do tempo. A partir desses valores, foi possível obter os perfis de liberação do óleo (Figura 17).

**Tabela 9 - Valor médio das porcentagens de óleo de cravo liberado em função do tempo.**

Tempo (min)	Concentração Média (%)	
	Filmes com 10 % óleo de cravo	Filmes com 30% de óleo de cravo
<b>15</b>	0,002	0,007
<b>30</b>	0,003	0,008
<b>60</b>	0,007	0,009
<b>90</b>	0,008	0,011
<b>120</b>	0,008	0,012
<b>150</b>	0,008	0,012

Fonte: Próprio autor

**Figura 17- Perfil de liberação do óleo de cravo presente nos filmes de colágeno.**

Fonte: Próprio autor

Após 15 minutos em contato com a água foi observada a liberação do óleo de cravo nos dois tipos de filmes produzidos. Esse comportamento pode ser atribuído à elevada solubilidade do colágeno em meio aquoso (TAKEDA, 2003). Nos filmes contendo 10% de óleo de cravo foi observado um aumento na porcentagem de óleo liberado até 90 minutos, após esse período o óleo continuou a ser liberado em uma concentração constante até o último tempo analisado. Perfil semelhante de liberação foi observado para os filmes de colágeno contendo 30% de óleo de cravo, entretanto, a liberação se manteve constante a partir do tempo de 120 minutos. Além disso, conforme esperado, a porcentagem de liberação do óleo de cravo foi maior nos filmes que continham 30% do óleo em relação aos filmes que continham 10% do óleo em todos os tempos observados.

No presente trabalho, a cinética de liberação do óleo de cravo incorporado aos filmes de colágeno foi avaliada até o tempo de 150 minutos. Como neste tempo a porcentagem de

liberação do óleo se manteve constante nos dois tipos de filmes produzidos, estudos futuros com tempos de liberação maiores devem ser realizados. Todavia, é importante ressaltar que materiais cuja cinética de liberação é constante ao longo do tempo, isto é, materiais em que o princípio ativo não seja liberado após um breve contato com o tecido, constituem uma alternativa promissora para a utilização como curativos.

### 5.3.5 Ensaio de disco-difusão

A atividade antimicrobiana do óleo de cravo e dos filmes de colágeno contendo 10% e 30% de óleo foi analisada pelo ensaio de disco-difusão. Na tabela 10 estão apresentados os valores padrões dos halos inibitórios de antibióticos utilizados no ensaio de disco-difusão. Desta forma, a avaliação da sensibilidade de cada microrganismo foi realizada de acordo com o diâmetro do halo formado (sensível, intermediário ou resistente ao agente antimicrobiano analisado).

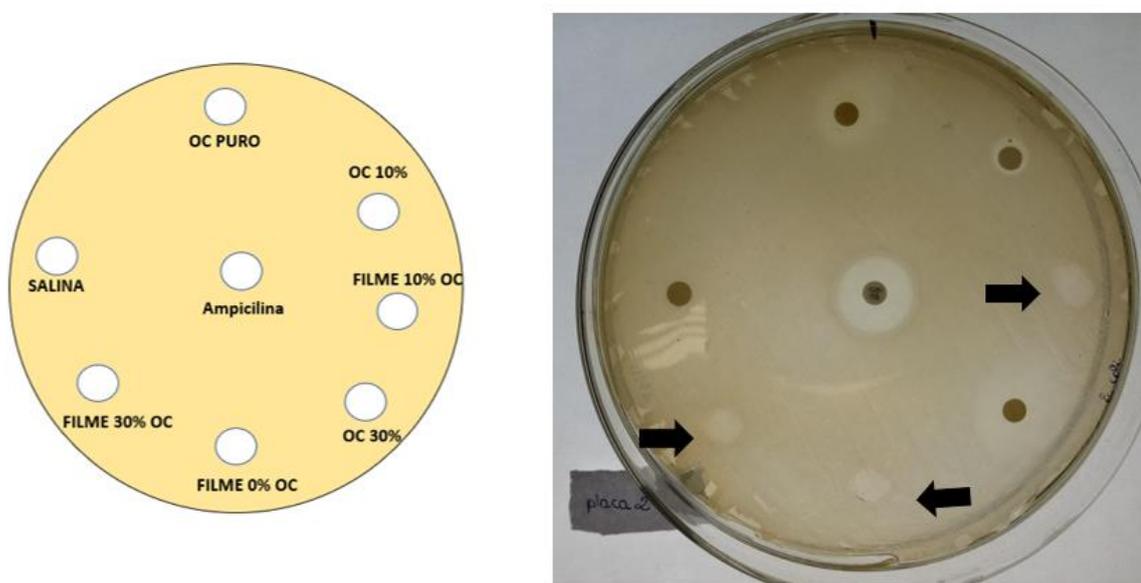
**Tabela 10 – Valores padrões de halos inibitórios utilizados no ensaio de disco-difusão.**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Sensível</b>
<b>Ampicilina</b>	11 mm	12 – 13 mm	14 mm
<b>Tetraciclina</b>	14 mm	15 – 18 mm	19 mm

Fonte: PEDROSO, *et al.*, 2014; Laia, A. 2015.

A figura 18 representa da placa de petri em que as bactérias *E. coli* foram previamente espalhadas, e em seguida, os diferentes materiais foram adicionados.

**Figura 18 – Placa de *E. coli* contendo as amostras após 24h de incubação**



OC: óleo de cravo. Setas: filmes de colágeno com e sem óleo de cravo dissolvidos na placa de petri.

Fonte: Próprio autor

Após a incubação da placa em estufa por 24 horas (figura 18 e tabela 11), observou-se que o disco de antibiótico (controle positivo) formou um halo de inibição de 20mm, e, portanto, a bactéria *E. coli* apresenta sensibilidade à ampicilina, conforme esperado e descrito na Tabela 11. O controle negativo (papel embebido em solução salina) não gerou halo inibitório. O óleo de cravo puro e com a concentração de 30% apresentou halo de inibição de 15,5mm e 15,0 mm, respectivamente. Dessa maneira, é possível inferir que as bactérias *E. coli* são sensíveis ao óleo de cravo, ou seja, o óleo apresenta propriedade antimicrobiana. Entretanto, o óleo de cravo na concentração de 10% apresentou halo de inibição de 9,0mm, indicando que nessa concentração o óleo não apresenta efeito antimicrobiano significativo.

**Tabela 11 – Halos de inibição e sensibilidade para a bactéria *E. coli***

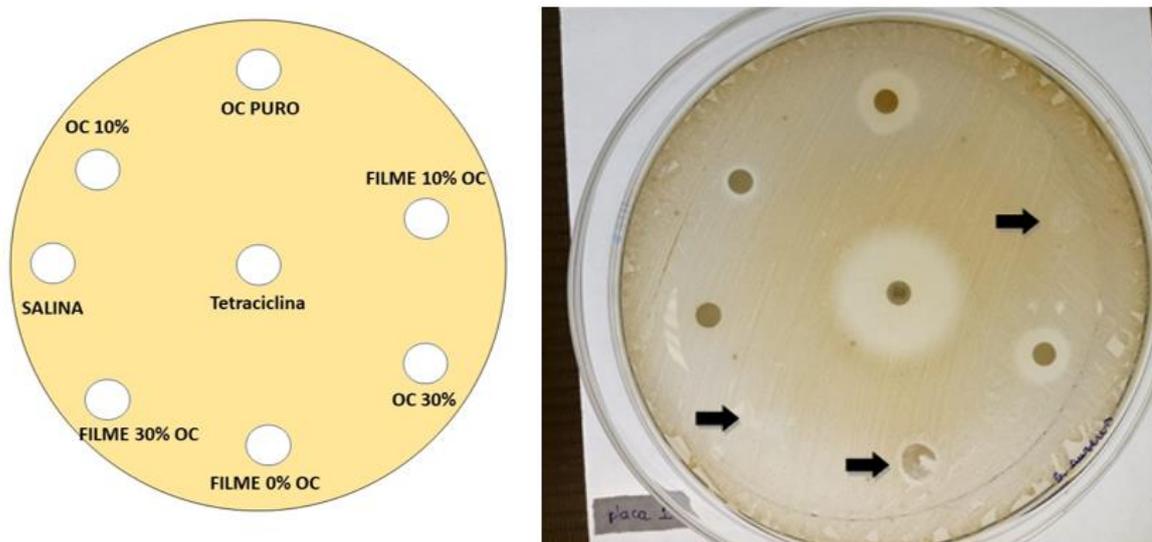
Amostras	Halo de Inibição (mm)	Interpretação
Controle <sup>+</sup> (ampicilina)	20,0 ± 2,8	Sensível
Óleo de Cravo 100% (puro)	15,5 ± 0,7	Sensível
Óleo de Cravo 30%	15,0 ± 1,4	Sensível
Óleo de Cravo 10%	9,0 ± 0,0	Insuficiente

Fonte: Próprio autor

Os filmes de colágeno com e sem óleo de cravo dissolveram-se no ágar, impossibilitando concluir se a mancha clara ocorreu devido à formação do halo de inibição ou à degradação do filme na placa. Sendo assim, tornam-se necessários outros ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes. Em estudos futuros, poderia ser realizado, por exemplo, o teste de macro diluição para fazer o ensaio com o sobrenadante e, dessa maneira, avaliar sua atividade.

Ensaio similar foi realizado com a bactéria *S. aureus* conforme pode ser observado na placa apresentado na figura 19. Neste ensaio o controle positivo foi o antibiótico tetraciclina.

**Figura 19 –Placa de *S. aureus* contendo as amostras após 24h de incubação**



OC: óleo de cravo. Setas: filmes de colágeno com e sem óleo de cravo dissolvidos na placa de petri

Fonte: Próprio autor.

Após 24 horas de incubação da placa em estufa foi verificado que o disco de tetraciclina gerou um halo de inibição de 29mm, e, portanto, a bactéria *S. aureus* apresenta sensibilidade à tetraciclina, conforme esperado e descrito na Tabela 12. O óleo de cravo puro e com a concentração de 30% apresentou halo de inibição de 19,0mm e 15,0mm, respectivamente. Assim, pode-se inferir que as bactérias *S. aureus* são sensíveis ao óleo de cravo, ou seja, o óleo apresenta propriedade antimicrobiana contra esse microrganismo. Entretanto, o óleo de cravo na concentração de 1 % apresentou halo de inibição de 8,7mm, indicando que nessa concentração o óleo não apresenta efeito antimicrobiano significativo.

**Tabela 12 – Halos de inibição e sensibilidade para a bactéria *S. aureus***

<b>Amostras</b>	<b>Halo de Inibição (mm)</b>	<b>Interpretação</b>
<b>Controle<sup>+</sup> (Tetraciclina)</b>	29,0 ± 1,4	Sensível
<b>Óleo de Cravo 100% (puro)</b>	19,0 ± 1,4	Sensível
<b>Óleo de Cravo 30%</b>	15,0 ± 1,4	Intermediário
<b>Óleo de Cravo 10%</b>	8,7 ± 1,1	Insuficiente

Fonte: Próprio autor

De maneira similar aos ensaios realizados com *E. coli*, os filmes de colágeno com e sem óleo de cravo em contato com o ágar e as bactérias *S. aureus* se dissolveram total ou parcialmente. Desta forma, diferentes ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana desse material são necessários.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram produzidos e caracterizados filmes de colágeno, proveniente de resíduos da indústria coureira, contendo 10% e 30 % m/m de óleo de cravo. O óleo de cravo utilizado é constituído majoritariamente por eugenol, substância com comprovada atividade antibacteriana, antifúngica e analgésica. A presença do óleo nos filmes foi confirmada pelas técnicas de FTIR e TG. A liberação do óleo em meio aquoso ocorreu de forma sustentada até 150 minutos. Apesar do óleo de cravo puro e diluído apresentar atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, essa atividade não pode ser confirmada pelo ensaio de disco-difusão nos filmes contendo óleo de cravo. Desta forma, os resultados preliminares sugerem que o filme de colágeno derivado da indústria coureira e incorporado com óleo de cravo apresenta potencial aplicação como curativo.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes perspectivas podem ser elencadas:

- analisar a topografia dos filmes de colágeno produzidos;
- otimizar o processo de incorporação do óleo de cravo nos filmes de colágeno;
- quantificar a quantidade de óleo de cravo efetivamente incorporada nos filmes;
- estudar o comportamento térmico dos filmes produzidos utilizando outras técnicas, como por exemplo, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- realizar o ensaio de liberação por períodos mais longos, chegando a 3 dias, tempo médio de utilização de um curativo;
- realizar o ensaio de macro-diluição nos filmes produzidos para verificar a propriedade antimicrobiana;
- realizar ensaios de viabilidade celular utilizando células epiteliais de mamíferos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **M2-A7: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão – Norma aprovada, 8a edição.**

ASCENÇÃO, V. L; FILHO, M,E,V. **Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial Syzygium aromaticum (CRAVO DA ÍNDIA).** 137 Cad. Pesq., São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

BAO, L, et al **Agar/collagen membrane as skin dressing for wounds,** 2008 Biomed. Mater. 3 044108

BAREIL, P,R; GAUVIN, R; BERTHOD, F. **Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications.** J. Materials, 2010.

BARNEA, Y; WEISS, J, GUR, E. **A review of the applications of the hydrofiber dressing with silver (Aquacel Ag) in wound care,** 2010. Ther Clin Risk Manag. 6:21–27

BARRIONI, B. R. *et al.* **Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications.** Materials Science and Engineering C 52, p. 22–30, 2015.

CAIRES, F.C. **Apostila 2 - Tecnologia dos Polímeros.** Apostila 3º Módulo, Centro Universitário Padre Anchieta - Curso Técnico de Química, 2009.

CASSANO, A. et al. **Membrane treatment by nanofiltration of exhausted vegetable tannin liquors from the leather industry.** Water Research, v. 37, n.10, p. 2426-2434, May 2003.

CHATTERJEE, D; BHATTACHARJEE, P **Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf life and frying stability of soybean oil.** Journal of Food Engineering, 117, 545–550, 2013

CHEN, P,J; CHANG, Y,G; CHEN, K,J. **Electrospun Collagen/Chitosan nanofibrous membrane as wound dressing.** Colloids and Surfaces A: Physicochen Eng. Aspects, 2008.

CHUANG, H,Y; CHEN, H, W; CHEN, T; LIN, I. **Bioactive componentes analysis of two various gingers (Zingiber officinale Roscoe) and antioxidante effect of ginger extracts.** LWT -Food Science and Technology, 2014.

COSTA, A.R.T et al. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos.** Rev. Bras. Plantas Med. 2011, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

COSTA, M. R; GOMES, F. V. L; MARIANO L. A. A. **Avaliação e tratamento de feridas, manual de curativos.** Goiânia: Santa Casa de Misericórdia, 2005, 33p.

CRAVEIRO, A. A.; Queiroz, D. C. **Óleos essenciais e química fina.** Quim. Nova, 1993. p. 16-224.

DI, Y. HEATH, R. **Collagen stabilization and modification using a polyepoxide, triglycidyl isocyanurate.** J. Polym. Degrad. Stab, 2009

DORMAN, H,J,D; DEANS, S,G Dorman HJD, Deans SG. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** Journal of Applied Microbiology 2000; 88: 308–316, 2000

ECHER, I. C. *et al.* **Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde.** Porto Alegre: Hospital de Clínicas, 2010, 44p.

EUGENOL (COMPOUND), National Center for Biotechnology Information, 2019 Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/eugenol>>. Acesso em: 3 nov. 2019.

EUGENOL – MÓLECULA DA SEMANA - FCIências. Disponível em: <<https://www.fciencias.com/2014/02/06/eugenol-molecula-da-semana>>. Acesso em: 13 out. 2019.

FAJARDO, G. *et al.* **Comparative study of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill).** J. Essent. Oil Res., v. 9. n. 2, p. 181-185, 1997

FARRUGIA, B.L; MI, Y; KIM, HN; WHITELOCK, JM; BAKER, S; WIESMANN, WP, et al. **Chitosan-based heparan sulfate mimetics promote epidermal formation in a human organotypic skin model.** Adv Funct Mater. 2018

FLECK, A.C; SIMMAN, R. **Modern Collagen Wound Dressing: Function and Purpose.** Journal of the American College of Certified Wound Specialist, v2, 2010

FRIEDMAN, M; HENIKA;P;R; MANDRELL RE. **Bacterial activity of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*.** Journal of Food Protection, 65: 1545–1560, 2002.

FRIESS, W. **Collagen – biomaterial for drug delivery**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, V. 45, p. 113-36, 1998

GIL, M.H.; FERREIRA, P. **Polissacarídeos como biomateriais. Grupo Glúcidos - Química**, V.100, p.72-4, 2006.

GIL, S, B,V. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de colágeno com uso na liberação controlada de sulfadiazina de prata**. 2013. 42F (Monografia). Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas.

GIL, S.B.C *et al.* **Recycled collagen films as biomaterials for controlled drug delivery**. The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique New J. Chem., 2016, 40, 8502—8510, 2016.

GIRARDI, R.C.G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. 2005. 101p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

GOISSIS, A. P. A. **Análise Estrutural do Colágeno Tipo 1. Correlação Estrutura: Atividade Biológica**. São Carlos: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia: 2007. 112p (Dissertação, Mestrado em Bioengenharia).

GOÑI, M, L; GAÑÁN, N, A; STRUMIA, M, C; MARTINI, R, E. **Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation**. Journal of Supercritical Fluids, 111, 28 –35, 2016

GORDON, P,L. HUANG, R, C; LORD; YANNAS, I, V. **Macromolecules**, 1974, 7, 954–956  
GUAN, Y; WU, J; ZHONG, Q. **Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with b-carotene**. Food Chemistry, 194, 787–796, 2016.

HELANDER, IM; ALAKOMI, HL; LATVA-KALA, K et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry v.46, 1998

IGNACIO. C. **Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo**. 2009. 129f (Doutorado). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais.

JONES, D.S.; MEDLICOTT, N.J. **Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation**. Int. J. of Pharm. v.114, p. 257-261, 1995.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013

KESSLER, M. R.; SOTTOS, N. R.; WHITE, S. R. Self-healing structural composite materials. *Composites Part a-Applied Science and Manufacturing*, v. 34, n. 8, p. 743-753, 2003.

KFURI, C. R. **Revestimento gastro-resistente em comprimidos de diclofenaco sódico pelo processo de leito de jorro fluidizado**. 2003. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

LAIA, A. G. S. **Estudo de filmes e hidrogéis a base de alginato e goma gelana visando aplicações na regeneração de discos intervertebrais**. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2015.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. **Biomedical applications of collagen**. *International Journal of Pharmaceutics*, V. 221, p.1-22, 2001.

LIMA, M,S,D; CARVALHO, D; MALTA, H,S, S; CAETANO, F,S; VINHAS, G.M. **Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de cravo em filmes de poli (cloreto de vinila)**. *Revista Brasileira de Agrotecnologia* v. 7, n. 2 (2017) paginas 294 - 298.

LYRA, M.A.M. *et al.* Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, V.5, p.784-93, 2007.

MACHADO, R. R. L. **Produção e caracterização de filme de poliuretano termoplástico com óleo de copaíba para potencial aplicação como curativos**. 2017. 100f. (Monografia). Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

MARQUES, G. **Relatório extração do óleo de cravo**. Niterói, 2006. 10 f. Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense.

MAZZAFERA, P. **Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol**. *Revista Brasileira Botânica: Campinas*, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MINABE, M.; TAAKEUCHI, K.; TOMOMATSU, E.; HORI, T.; UMEMOTO, T. **Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline**. *J. Clin. Periodontol.*, v. 16, p. 291-294, 1989.

MIYATA, T. **Collagen skin dressing**. US Patent, 1981.

MOUCHREK FILHO, V.E. **Introdução à química de óleos essenciais**. São Luís, 2000

MURRAY, ZR; WEST, EZ; COWIN, JÁ; FARRUGIA, LB. **Development and use of biomaterials as wound healing therapies.** Burns & Trauma , 2019

NASCIMENTO, GGF, LOCATELLI J & Freitas PC (2000) **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria.** Brazilian Journal of Microbiology, 31:247256.

NUNES, P.S. **Desenvolvimento, caracterização físico - química e avaliação de filmes de colágeno contendo ácido úsnico no processo de reparo cicatricial em roedores.** 2009. 169p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Sergipe, Aracajú.

OLIVEIRA, R. A. et al. **Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OMS. Apoia estudo com plantas medicinais. Disponível em: <[http://www.drashi/fitoterapia\\_oms\\_apoia\\_estudos\\_com\\_plantas\\_medicinais.html](http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.html)>. Acesso em: 10 maio de 2012.

PEDROSO, R. S. *et al.* **Sensibilidade de isolados de *Candida spp.* a antifúngicos por Disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo.** Biosci. J., Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 304-311, Jan/Feb, 2014.

PRAMOD, K; SHAHID, H,A; ALI, J. **Eugenol: A Natural Compound with Versatile Pharmacological Actions** Natural Product Communications. v.5, 2010.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.** Press, London, UK, 2nd edition, 497f, 2004.

REZENDE, A, C; LUCHESE, C; BARBO, P,L,M; DUEK, R,A,E. **Membranas de Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) como Curativos para Pele: Degradação In Vitro e In Vivo.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15, n° 3, p. 232-238, 2005.

RODRIGUES, A, P, H, et al. **Biobased nanocomposites based on collagen, cellulose nanocrystals, and plasticizers.** *Journal of Applied Polymer*, 2017

RODRIGUES, V. **Análise dos Efeitos do Colágeno Bovino e Derivados na Proliferação Celular e Biossíntese de Colágeno em Fibroblastos Humanos.** São Paulo: Universidade de São Paulo, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia: 2009. 74p (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia).

ROGNONI, E; WATT, FM. **Skin cell heterogeneity in development, wound healing, and cancer.** *Trends Cell Biol*, 2018.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Review**, V.55, p.1595–611, 2003.

SAHRARO, M. *et al.* **Guanidine hydrochloride embedded polyurethanes as antimicrobial and absorptive wound dressing membranes with promising cytocompatibility.** *Materials Science and Engineering C* 59, p. 1025–1037, 2016.

SAVASSI-ROCHA, P. R; FONSECA, F. P. **Cirurgia ambulatorial.** 3° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SENA, L. Á. D. **Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais: 2004. 107p (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais).

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. **Collagen Structure and Stability.** *The Annual Review of Biochemistry*, v. 78, p. 929-958, 2009., W. Collagen: biomaterial for drug delivery (review article). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, p. 113-136, 1998.

SILVA. T.F, PENNA, B.AL; **Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais.** Rev Inst Adolfo Lutz. 2012. <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v71n3/v71n3a14.pdf>>

SILVESTRI. J. D. *at al.* **Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravoda-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)** Rev. Ceres vol.57 no.5 Viçosa Sept./Oct, 2010.

SIONKOWSKA, A. **Polymer Degradation And Stability.** Elsevier Journal, V.67, p.79-83, 2000.

SMANIOTTO P. H. S; FERREIRA M.C; ISAAC C. Sistematização de curativos para o tratamento clínico de feridas. **Revista brasileira de cirurgia plástica.** São Paulo, v.27, n.4, p.623-626, 2012.

TAKEDA, K.; TANAHASHI, M.; UNNO, H. **Self-repairing mechanism of plastics.** *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 4, n. 5, p. 435- 444, 2003

TEODORO, R. A, R, T. **Microencapsulação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) por secagem por atomização.** 2016. 104f. (Monografia). Universidade Federal de Lavras.

TIJING, L. D. *et al.* **Characterization and mechanical performance comparison of multiwalled carbon nanotube/polyurethane composites fabricated by electrospinning and solution casting.** *Composites: Part B* 44 (2013) 613–619.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essential oils.** England: Micelle Press, 1996. 334p.  
WORANUCH, S; YOKSAN, R. **Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging.** *Carbohydrate Polymers*, 96, 586–592., 2013

WU, D. Y.; MEURE, S.; SOLOMON, D. Self-healing polymeric materials: A review of recent developments. *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 5, p. 479-522, 2008.

YU, S.H. *et al.* **J. Appl. Polym. Sci.** V.98, p.538–49, 2005.

ZHOURI, M. R. **Desenvolvimento e caracterização de filmes bicamada de poliuretano e N-isopropilacrilamida para potencial aplicação no tratamento de feridas.** 2016. 72f. (Monografia). Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.