

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALDINO DO NASCIMENTO PORTO NETO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DE ESPONJAS DE ALGINATO-GELATINA-ÁCIDO
ÚSNICO SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM RATOS

ARACAJU

2012

ALDINO DO NASCIMENTO PORTO NETO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DE ESPONJAS DE ALGINATO-GELATINA-ÁCIDO-
ÚSNICO SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM RATOS

2012

ALDINO DO NASCIMENTO PORTO NETO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ESPONJAS DE
ALGINATO-GELATINA-ÁCIDO ÚSNICO SOBRE A
CICATRIZAÇÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Francilene Amaral da Silva

ARACAJU

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde
Universidade Federal de Sergipe

P853c Porto Neto, Aldino do Nascimento
Caracterização físico-química e avaliação do efeito de esponjas de alginato-gelatina-ácido úsnico sobre a cicatrização em ratos / Aldino do Nascimento Porto Neto. -- Aracaju, 2013.
66 f. : il.

Orientador (a): Profa. Dra. Francilene Amaral da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. Biomateriais 2. Esponjas 3. Cicatrização 4. Ácido úsnico - Propriedades físico-químicas 5. Farmacologia I. Título.

CDU 615.011

ALDINO DO NASCIMENTO PORTO NETO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ESPONJAS DE ALGINATO-GELATINA-ÁCIDO ÚSNICO SOBRE A CICATRIZAÇÃO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof^a Dr^a. Francilene Amaral da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Juliana Cordeiro Cardoso

PARECER

[illegible]

DEDICATÓRIA

À todos que me incentivaram, nos momentos difíceis, dessa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Como não agradecer àqueles que estiveram ao meu lado, me incentivando todos os dias, para que mais uma etapa da minha vida, em busca do conhecimento, fosse concluída?

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de todas as minhas energias, Pai celestial, que me abençoa e coloca pessoas extraordinárias no meu caminho.

Aos meus pais, Jorge e Gal agradeço por todos os ensinamentos e incentivos, o que eu sou hoje e que ainda serei eu devo à vocês. Sei que posso contar para o que der e vier, são minha fortaleza e meus verdadeiros mestres.

À minha esposa, companheira, confidente e amiga, Danielle, que esteve comigo por toda essa caminhada, sou muito grato por me presentear com o seu amor. Estar ao seu lado me dá forças para continuar superar os obstáculos da vida. Te amo!

Aos meus irmãos, Danillo e Yasmin, vocês me deram um importante auxílio na elaboração desse trabalho, obrigado por tudo.

À Profa. Francilene, pela orientação, conselhos e paciência, numa fase difícil dessa jornada.

Ao Prof. Adriano Antunes, pelo grande suporte científico e co-orientação nesse trabalho.

À Carla Francisca, pela imensa contribuição, empenho e dedicação, por tudo que fez (o possível e o impossível) para realização desse trabalho. Você pode contar comigo no que precisar!

Aos colegas do LeFT e à Charlene Regina, que por várias vezes se dispôs em ajudar nos ensaios físico-químicos.

Ao Prof. Ricardo Albuquerque, pela colaboração essencial na realização desse trabalho.

Aos Profs. Lucindo Quintans e Juliana Cardoso, pelo apoio científico prestado.

Aos amigos que puderam proporcionar momentos de descontração, os quais foram essenciais para liberar o *stress*.

A todos que fazem parte do NPGME e do DFS/UFS, pela convivência. Obrigado!

RESUMO

Caracterização físico-química e avaliação do efeito de esponjas de alginato-gelatina-ácido úsnico sobre a cicatrização em ratos. Aldino do Nascimento Porto Neto – Dissertação de Mestrado – NPGME. Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2012.

Existe um interesse na área farmacêutica no uso de esponjas, produzidas com biopolímeros, como matrizes para a liberação controlada de fármacos. Os biopolímeros para aplicações farmacêuticas devem possuir propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas, além de serem biocompatíveis. O alginato é um biopolímero, obtido a partir do ácido algínico, que tem sido largamente estudado devido a sua capacidade de incorporar compostos e promover a liberação controlada de fármacos. A gelatina é uma proteína obtida pela hidrólise do colágeno e vem sendo empregada na obtenção de hidrogéis e esponjas com propriedades terapêuticas. O ácido úsnico (AU) é o metabólito mais abundante do líquen *Cladonia substellata* e possui comprovada atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente e avaliar o efeito de esponjas de alginato-gelatina, contendo ácido úsnico sob a cicatrização em ratos. As esponjas foram preparadas a partir do alginato e gelatina, incorporadas com ácido úsnico, nas concentrações de 1 e 5% (m/v) e liofilizadas. Para caracterização do material foram utilizadas a análise termogravimétrica/termogravimétrica derivada (TG/DTG), a calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e testes de propriedades mecânicas. O ensaio biológico foi realizado com 36 ratos divididos em três grupos: sem tratamento (CTR); tratados com esponja inerte (ALG/GEL); e tratados com esponja contendo ácido úsnico a 5% (AU 5%). Após 7 e 14 dias, seis animais de cada grupo foram eutanasiados para análise histológica. O teor médio de ácido úsnico foi de 60,03 e 97,38% nas esponjas de 1 e 5%, respectivamente. Os resultados da análise de DSC mostram a ausência do pico endotérmico referente ao AU puro, indicando que o fármaco foi incorporado ao sistema polimérico. As curvas TG/DTG corroboram com os dados do DSC e mostraram que a incorporação do ácido úsnico não alterou o perfil geral da decomposição térmica das esponjas. Os espectros FTIR das esponjas mostraram um somatório de eventos correspondentes às bandas do ácido úsnico, alginato e gelatina, indicando a presença dos referidos compostos no sistema. A análise por MEV mostrou, que a incorporação de diferentes concentrações de AU, nas esponjas promove alterações na estrutura microscópica, resultando em diferentes comportamentos mecânicos. Os ensaios biológicos em 7 dias, mostram uma reação inflamatória nas porções centrais e marginais da ferida, porém os grupos ALG/GEL e AU 5%, promoveram uma aceleração na formação de tecido de granulação mais maduro. Em 14 dias, no grupo AU 5%, foi nítida a redução do componente inflamatório mesmo na porção central da ferida. Adicionalmente, observou-se uma marcante redução na rede vascular, quando comparado ao grupo CTR, acompanhada de um padrão homogêneo de collagenização tipo III em toda a extensão da cicatriz. Em conclusão, a incorporação do ácido úsnico não alterou a estabilidade térmica das esponjas e, além disso, o uso de esponja de alginato e gelatina favorece a cicatrização de feridas e a incorporação do fármaco facilita a contração da ferida e uma deposição homogênea de colágeno, evitando a formação de cicatrizes antiestéticas.

Descritores: Biomateriais; esponjas; ácido úsnico; caracterização físico-química; cicatrização.

ABSTRACT

Physicochemical characterization and evaluation of the effect of alginate-gelatin-usnic acid sponges of wound healing in rats. Aldino do Nascimento Porto Neto – Dissertação de Mestrado – NPGME. Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2012.

There is interest in the pharmaceutical area in the use of sponges, produced with biopolymers, as matrices for the controlled release of drugs. The biopolymers for pharmaceutical applications must have physicochemical and appropriate mechanical and biocompatibility. Alginate is a biopolymer, obtained from the alginic acid, which has been largely studied due to its ability to incorporate and promote the controlled release of drugs. Gelatin is a protein obtained by hydrolysis of collagen and has been used in obtaining produce hydrogels and sponges with therapeutic properties. Usnic acid (UA) is the most abundant metabolite of the lichen *Cladonia substellata* has proven antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic and healing activities. In this context, the aim of this work was to physicochemical characterization and evaluate the effect of alginate-gelatin sponges, containing usnic acid on wound healing in rats. The sponges were prepared from gelatin, alginate and incorporated with usnic acid in concentrations of 1 and 5% (m/v) and freeze dried. For material characterization were used thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG), differential scanning calorimetry (DSC), infrared absorption spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and mechanical properties tests. The biological assay was performed with 36 rats divided into three groups: without treatment (CTR); treated with inert sponge (ALG/GEL); and treated with the sponge containing usnic acid 5% (AU 5%). After 7 and 14 days, six animals from each group were submitted to euthanasia for histological analysis. The average content of usnic acid was 60.03 and 97.38% for sponges in 1 and 5%, respectively. DSC analysis results show the absence of endothermic peak of UA pure, indicating that the drug was incorporated into the polymer system. TG/DTG curves corroborate with the DSC data and showed that the incorporation of usnic acid has not changed the thermal behavior of sponges. The FTIR spectra of sponges showed a sum corresponding to the event of usnic acid, alginate and gelatin bands, indicating the presence of these compounds in the system. The analysis by SEM showed that the incorporation of different concentrations of UA, in sponges promotes changes in microscopic structure, resulting in different mechanical behaviors. The biological assays in 7 days, showed an inflammatory reaction in the marginal and central portions of the wound, but ALG/ GEL and AU 5% groups, promoted an acceleration in the formation of granulation tissue. In 14 days, in the AU 5% group, was a clear reduction of the inflammatory component even in the central portion of the wound. Additionally, there was a marked reduction in vascular component, when compared to the CTR group with a homogeneous pattern of collagenization type III in the entire length of the scar. In conclusion, the incorporation of usnic acid has not changed the thermal stability of sponges and, in addition, the use of alginate-gelatin sponge and promotes the wound healing and the incorporation of the drug eases wound contraction and a homogeneous deposition of collagen, avoiding the formation of hipertrophic scars.

Key-words: Biomaterials; sponges; usnic acid; physicochemical characterization; wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do alginato de sódio.....	19
Figura 2. Esquema das interações entre o alginato e gelatina (adaptado de LI <i>et al.</i> , 2011). .	21
Figura 3. Estrutura do (+)-(9b-R)- e (-)-(9b-S)-ácido úsnico (adaptado de INGÓLFSDÓTTIR, 2002).	24
Figura 4. Procedimento de preparação as esponjas	33
Figura 5. Etapas da técnica operatória. (A) Anestesia; (B) Realização da ferida; (C) Ferida; (D) Aplicação da esponja.	38
Figura 6. Aspecto macroscópico das esponjas sem o fármaco (A), com ácido úsnico 1 (B) e 5% (C).	41
Figura 7. Curvas DSC do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL), obtidas na razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂	42
Figura 8. Curvas TG (A) e DTG (B) do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL), obtidas na razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂	43
Figura 9. Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com fármaco a 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL).	44
Figura 10. Fotomicrografia, obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das esponjas sem ácido úsnico (A e D), com ácido úsnico 1% (B e E), 5% (C e F). (Barra A, B, C = 500µm; D, E, F = 50µm).....	46
Figura 11. Secções histológicas coradas com hematoxilina-eosina. Sete dias: (Ia) Formação de rede vascular, composta por capilares hiperemiados e regularmente distribuídos no grupo CTR. (Ib) Reação de granulação com presença de células ovaladas e fusiformes, deposição de malha colagênica delgada e padrão vascular inconspícuo no grupo ALG/GEL. (Ic) Componente vascular distribuído de forma homogênea na extensão da ferida no grupo AU 5%. 14 dias: (IIa e IIb) Reação de granulação de moderada a intensa na porção central da	

ferida apresentada nos grupos CTR e ALG/GEL, respectivamente. (IIc) Redução do componente inflamatório e vascular no grupo AU 5% **49**

Figura 12. Percentual médio de epitelização da superfície da ferida em 7 dias. (CTR – controle; ALG/GEL – esponja sem ácido úsnico; AU 5% – esponja com ácido úsnico a 5%). **51**

Figura 13. Percentual médio de epitelização da superfície da ferida em 14 dias. ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p=0,000$). **51**

Figura 14. Secções histológicas coradas com hematoxilina-eosina: 14 dias. Epitélio neoformado apresentando pequenos brotamentos (setas pretas) e rudimentos de anexos dérmicos (seta branca) (A e C) ALG/GEL; (B e D) AU 5%..... **52**

Figura 15. Análise quantitativa da contagem de colágeno em 7 dias. (CTR – controle; ALG/GEL – esponja sem ácido úsnico; AU 5% – esponja com ácido úsnico a 5%). *** Diferença significativa para o grupo CTR ($p<0,001$); ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p<0,01$). **54**

Figura 16. Análise quantitativa da contagem de colágeno em 14 dias. ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p<0,01$); * Diferença significativa para o grupo CTR ($p<0,05$). **54**

Figura 17. Deposição feixes delgados de colágeno tipo I em arranjo reticular em sete (A, B e C) e paralela em 14 dias (D, E e F). Notar hipocolagenização (setas cheias) no centro das feridas em CTR (A/D) e ALG/GEL (B/E), e disposição homogênea do colágeno (setas pontilhadas) em AU 5% (C/F). (Picrossírius/polarização. Barra = 250 μ m). **55**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das soluções poliméricas que constituem as esponjas.	33
Tabela 2. Teor de ácido úsnico presente nas esponjas de alginato e gelatina.	41
Tabela 3. Faixas de temperatura e percentuais de perda de massa, nas etapas da análise termogravimétrica, das esponjas de alginato e gelatina sem o fármaco (ALG/GEL), incorporadas com o fármaco a 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%).	43
Tabela 4. Propriedades mecânicas das esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e com 1 (AU 1%) e 5% do fármaco (AU 5%).	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALG	Alginato de sódio puro
ALG/GEL	Esponjas de alginato e gelatina sem ácido úsnico
ASTM	<i>American Standard Testing Method</i>
AU	Ácido úsnico puro
Au	Ouro metálico
AU 1%	Esponjas de alginato e gelatina com ácido úsnico a 1%
AU 5%	Esponjas de alginato e gelatina com ácido úsnico a 5%
Ca²⁺	Cálcio elementar
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTG	Termogravimetria derivada
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
g	Grama
GEL	Gelatina pura
K⁺	Potássio elementar
KBr	Brometo de potássio
kV	Quilovolts
mA	Miliamperes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
N₂	Nitrogênio gasoso
Na⁺	Sódio elementar
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Grau Celsius
TG	Termogravimetria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Lesões cutâneas e o processo de cicatrização	16
2.2 Biomateriais	17
2.3 Esponjas	20
2.4 Compostos isolados de líquens.....	22
2.5 Caracterização termoanalítica	24
2.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	25
2.5.2 Análise termogravimétrica e termogravimétrica derivada (TG/DTG).....	26
2.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	27
2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
2.8 Propriedades Mecânicas	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Obtenção e Caracterização Físico-química e Mecânica de esponjas contendo Ácido Úsnico	32
4.1.1 Material.....	32
4.1.2 Preparação das esponjas	32
4.1.3 Análise Quantitativa das Esponjas	33
4.1.3.1 Solução padrão de ácido úsnico	33
4.1.3.2 Extração e doseamento do ácido úsnico a partir das Esponjas	34
4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34

4.1.5 Análise Termogravimétrica e Termogravimétrica Derivada (TG/DTG)	35
4.1.6 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR).....	35
4.1.7 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.1.8 Avaliação das Propriedades Mecânicas	36
4.2 Avaliação do processo de cicatrização de esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico, em modelo animal	36
4.2.1 Animais	37
4.2.2 Realização da ferida e formação dos grupos.....	37
4.2.3 Procedimento histológico.....	38
4.2.3.1 Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da ferida	39
4.2.3.2 Avaliação da deposição de colágeno.....	39
4.3 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Obtenção e caracterização de esponjas contendo ácido úsnico	41
5.2 Avaliação do processo de cicatrização de esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico, em modelo animal.....	48
5.2.1 Análise da reação de granulação	48
5.2.2 Análise do índice percentual de epitelização da superfície da ferida.....	50
5.2.3 Análise da deposição de colágeno.....	53
6 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais	68
ANEXO II - Artigo submetido ao periódico Current Applied Physics	70
ANEXO III - Comprovante de submissão do artigo ao periódico Current Applied Physics.....	90
ANEXO IV - Normas para publicação do periódico Current Applied Physics.....	92

1. INTRODUÇÃO

Os avanços na tecnologia vêm proporcionando a idealização de novas formas farmacêuticas, favorecendo o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

As formas farmacêuticas tradicionais são caracterizadas por apresentarem a liberação imediata do fármaco, podendo necessitar de várias administrações durante o período de tratamento, podendo levar à toxicidade, efeitos colaterais indesejáveis e descontinuidade do tratamento terapêutico.

Por outro lado, o sistema de liberação controlada ~~de fármacos~~ é um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, o que possibilita regular e otimizar a duração da ação terapêutica e o desempenho farmacológico do agente, e ainda, reduzir possível toxicidade, efeitos indesejáveis e a necessidade de novas administrações, facilitando ao paciente a adesão ao tratamento e proporcionando vantagens terapêuticas e econômicas.

A introdução de biomateriais na obtenção de sistemas de liberação de fármacos têm se mostrado promissora, devido capacidade de bioadesão e bioreabsorção de seus constituintes. Os tratamentos na área da saúde, utilizando esses materiais, estão ganhando destaque pelo sucesso obtido nas respostas terapêuticas, evidenciando, a melhoria na qualidade de vida das pessoas.

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância ou uma combinação de substâncias, que podem ser de origem natural ou sintética, agindo de forma transitória ou permanente no hospedeiro, destinados a possuir uma interação com os sistemas biológicos para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Biopolímeros representam uma classe de biomateriais mais versáteis disponíveis para aplicações em diversas áreas, inclusive a farmacêutica, sendo utilizados na formulação de cosméticos e medicamentos de liberação convencional e de liberação modificada, onde neste último, atuam como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos em locais específicos no organismo.

Dentre os biopolímeros está o alginato, o qual é obtido a partir do ácido algínico e pode ser associado a íons Na^+ , denominado alginato de sódio, o que confere grande solubilidade em água, além de induzir a formação de géis (hidrogel) em soluções aquosas, sendo utilizado, por exemplo, na liberação controlada de fatores de crescimento, como o fator

de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de transformação de crescimento (TGF α), para aceleração do processo cicatricial, na produção de microesferas com liberação controlada de metformina e para cultura de células-tronco, entre outros (CENSI *et al.*, 2012; SWAMY *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2012)

Villanova *et al.* (2010) descreveram o alginato e a gelatina, como os principais polímeros naturais utilizados em matrizes inovadoras para liberação de fármacos, proporcionando um eficiente desempenho terapêutico.

A necessidade de desenvolvimento de novos sistemas de liberação biodegradáveis que proporcionem estabilidade físico-química ao produto, que garanta a aceitabilidade do paciente e promovam qualquer outro atributo relacionado à segurança e efetividade do tratamento tem se intensificado devido a falta de condições seletivas de terapias que algumas doenças e traumas físicos requerem.

Em vista disso, trabalhos envolvendo o preparo de esponjas com a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) tem sido alvo para a busca de alternativas terapêuticas para diversas enfermidades (DAI, *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010; SEO *et al.*, 2012).

O interesse em compostos de origem natural tem aumentado consideravelmente, graças à diversidade da ocorrência na natureza. Uma vasta gama de compostos naturais, produtos de metabolismo primário e secundário é biologicamente ativa.

O ácido úsnico é um dos metabólitos mais abundantes e comuns do líquen *Cladonia substellata* Vainio, cuja espécie é de grande ocorrência na região nordeste, principalmente, no estado de Sergipe.

As principais atividades do ácido úsnico estão relacionadas com efeito anti-inflamatório (HUANG *et al.*, 2011) e analgésico (VINJAYAKUMAR *et al.*, 2000), antimicrobiano (WECKESSER *et al.*, 2007), antiviral (CAMPANELLA *et al.*, 2002), antiparasitário (CARVALHO *et al.*, 2005; FOURNET *et al.*, 2007), gastroprotetor e antioxidante (ODABASOGLU *et al.*, 2006; RABELO *et al.*, 2012) e cicatrizante (NUNES, 2009; NUNES *et al.*, 2011).

As propriedades anti-inflamatória e cicatrizante apresentadas pelo ácido úsnico aliada à possibilidade de utilização de esponjas para a liberação controlada de fármacos motivaram o presente estudo, que tem como objetivo caracterizar físico-quimicamente esponjas de alginato-gelatina incorporadas com ácido úsnico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesões cutâneas e o processo de cicatrização

A pele, considerado o maior órgão do corpo, funciona como uma barreira natural do organismo, que protege os tecidos subjacentes, controla o fluxo sanguíneo, regula a temperatura somática, além de promover a reserva de nutrientes e funções sensoriais (NUNES, 2009).

Processos traumáticos que resultam em alterações da integridade da pele decorrem na formação de uma ferida que podem acontecer como parte de um processo de doença ou ter uma etiologia acidental ou intencional.

As feridas geralmente levam a um aumento da perda de líquidos, hipotermia, comprometimento da imunidade e alterações na estética corporal, devido ao aparecimento de cicatrizes (WILD *et al.*, 2010).

O aumento da incidência de lesões cutâneas na população brasileira é um fato conhecido pelos profissionais de saúde e tem proporcionado discussões sobre o assunto, devido esse tipo de lesão ser de igual frequência na população mundial, pois além de possuir caráter recidivo, apresenta morbidade significativa.

As feridas acometem a população brasileira de forma geral, independente de idade, sexo ou etnia, sendo responsável por um alto índice de casos relacionados às alterações na integridade cutânea, constituindo-se, portanto, um importante problema na saúde pública (ALBUQUERQUE; ALVES, 2011).

O processo de cicatrização tecidual envolve uma série de processos biológicos complexos que visa à recuperação de elementos estruturais celulares, tais como alterações vasculares e celulares, proliferação epitelial, proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, produção de elastina e proteoglicanos, revascularização, contração da ferida e remodelação (BUSNARDO, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2009).

A cicatrização de feridas pode ser beneficiada quando os principais eventos que a possibilitam são estimulados, como por exemplo, nutrição, proliferação celular e controle do processo inflamatório (BUSNARDO, 2010; WILD *et al.*, 2010).

As lesões cutâneas crônicas repercutem em custos financeiros elevados e profundas consequências sociais sobre os portadores, os quais com frequência desenvolvem sequelas

que podem levar à perda de membros e de suas funções, com consequente afastamento do trabalho e de suas atividades normais.

O impacto social e econômico das lesões crônicas e suas consequências, devido à infecção local ou sistêmica, tem sido alvo de grande preocupação por parte dos profissionais, fazendo com que a utilização indiscriminada de antissépticos e dos mais variados tipos de agentes antimicrobianos, ocasionem repercussões extremamente danosas (ALBUQUERQUE; ALVES, 2011). Com estudos do efeito desses diversos agentes sobre os tecidos, pôde-se constatar que a maioria provocava mais danos do que benefícios, e sua utilização tem-se tornado cada vez mais restrita.

Por mais que existam recursos e tecnologias em excesso no mercado, no campo da cicatrização e dos curativos, o aperfeiçoamento de tais recursos é necessário para torná-los acessíveis a maior número de pessoas, mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples, eficientes e facilmente reproduzíveis. O elevado custo dos recursos tecnológicos, na produção de curativos, é um desafio para a indústria, já que são em sua maioria importados e patenteados por empresas multinacionais (ALBUQUERQUE; ALVES, 2011).

O uso de biomateriais na terapia de regeneração tissular se mostrou eficaz, pois esses materiais proporcionam a proliferação e diferenciação celular, além de formarem matrizes porosas tridimensionais, favorecendo a infiltração celular, mantendo o fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários para as células que atuam na reparação tecidual (TABATA, 2009).

Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais através de terapias tópicas adequadas para viabilizar o processo fisiológico. Entretanto, os biomateriais surgem como uma alternativa para produção de curativos bioativos, os quais podem possuir fármacos incorporados, acelerando o processo de reparação tecidual (VILLANOVA *et al.*, 2010)

2.2 Biomateriais

O aumento da expectativa e da qualidade de vida junto com os avanços da medicina atual tem possibilitado o desenvolvimento de novos materiais a serem utilizados como dispositivos temporários ou permanentes para implantes no corpo humano.

Os biomateriais são produtos aptos para serem utilizados em humanos, com a finalidade de tratamento ou alívio de uma enfermidade ou lesão, e também para a substituição e modificação de sua anatomia ou de um processo fisiológico. Incluem qualquer produto

natural, sintético e natural modificado que pode ser utilizado como um dispositivo médico ou parte dele (ALMEIDA, 2010).

A escolha dos biomateriais para o desenvolvimento de matrizes envolve uma pesquisa detalhada, uma vez que as matrizes devem preencher certos requisitos, tais como:

- ser biocompatível e atóxica, de modo que provoque uma resposta inflamatória ou tóxica;
- ser biodegradável, com uma taxa de degradação que permita acompanhar o crescimento celular;
- ter propriedades mecânicas similares às do tecido onde vai ser implantado;
- formar uma estrutura porosa tridimensional, onde exista conexão entre os poros para a vascularização, crescimento das células, passagem de nutrientes e oxigênio (SANTOS, 2010).

O uso de produtos de origem natural como carreadores de fármacos apresenta-se como uma das mais atraentes e promissoras alternativas tecnológicas atuais, devido a maior biocompatibilidade destas substâncias em comparação aos materiais sintéticos (DORNELAS *et al.*, 2008).

Os polímeros têm sido a classe de materiais mais versátil na medicina, em biotecnologia e nas indústrias de cosméticos e alimentos. Podem ser usados, por exemplo, como implantes permanentes para reparar, restaurar ou reconstituir tecidos, em aplicações de substituição total ou parcial de órgãos ou tecidos danificados e em composições biodegradáveis adequadas para substituição temporária (KO *et al.*, 2010).

A biodegradabilidade e a bioadesão dos polímeros são características exploradas na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo possa aderir ao sítio de ação e desaparecer depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada (VILLANOVA *et al.*, 2010).

A biodegradabilidade dos polímeros é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo desapareça depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada. Os produtos de degradação formados são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (SEVERINO *et al.*, 2011)

O mecanismo que descreve a bioadesão de polímeros à mucosa ainda não foi totalmente esclarecido. Acredita-se que os seguintes eventos estejam envolvidos: adsorção, espalhamento do material bioadesivo sobre a mucosa e interpenetração entre cadeias do polímero e da mucosa.

De modo geral, as características que favorecem a bioadesividade são: elevada massa molar; capacidade de dispersão em água; presença de grande número de grupos carboxila e/ou hidroxila; habilidade de formar ligações de hidrogênio; flexibilidade da cadeia polimérica; e, presença de superfície negativamente carregada, embora alguns polímeros catiônicos sejam bioadesivos (SEVERINO *et al.*, 2011; VILLANOVA *et al.*, 2010).

Tais propriedades facilitam a interpenetração das cadeias poliméricas pela mucina, principal proteína do muco, permitindo o estabelecimento de interações físicas e mecânicas (WANG *et al.*, 2010).

O alginato é um biopolímero obtido a partir do ácido algínico, um polímero linear, o qual é formado por monômeros de resíduos de ácido α -L-gulurônico e β -D-manurônico presentes em proporções e sequência variáveis na parede celular e espaço intercelular de algas marrons (KO *et al.*, 2010).

Este biopolímero apresenta afinidade para vários cátions metálicos tais como Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} . Quando associado a íons Na^{+} recebe o nome de alginato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$) (Figura 1), o qual apresenta grande solubilidade em soluções aquosas, favorecendo a formação de hidrogéis (CENSI *et al.*, 2012).

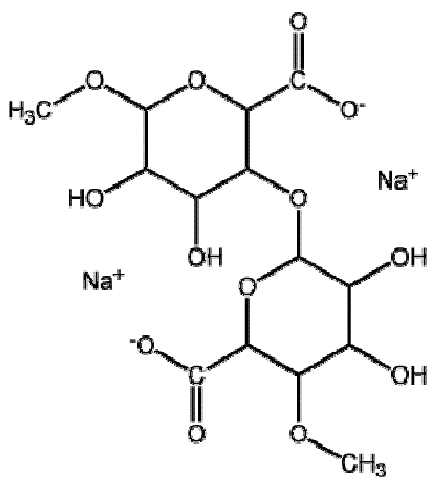


Figura 1. Estrutura do alginato de sódio.

O hidrogel, composto de alginato de sódio, por ser biodegradável e atóxico, é adequado para diversas aplicações, tais como, estabilizantes e emulsionantes farmacêuticos, adsorvente de íons, filmes e curativos, além de poder ser utilizado como um potencial sistema de liberação de agentes bioativos (BILGAINYA *et al.*, 2010).

Outro biomaterial empregado em sistemas carreadores de fármacos é a gelatina, a qual em combinação com outros biopolímeros, em blendas e compósitos, adquire propriedades adequadas à utilização como sistema de liberação.

A gelatina é uma proteína presente na pele, ossos e tecidos, obtida pela hidrólise do colágeno, em que as ligações moleculares naturais entre fibras separadas de colágeno são quebradas, permitindo o seu rearranjo. A gelatina contém principalmente resíduos de três aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina. A força de tensão de matrizes a base de gelatina é devido à presença de hélices triplas. Quanto maior o teor de hélice tripla, maior é a força da matriz (CONDE, 2011).

Esta proteína vem sendo empregada na obtenção de materiais como, filmes antimicrobianos (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2011) e nanopartículas carreadoras de fármacos (SARAOGI *et al.*, 2010). Estudos demonstram que a gelatina possui efeito ativador de macrófagos (ZENG; CHEN, 2010) é altamente hemostático (CHARLESWORTH *et al.*, 2012) e consequentemente a gelatina tem sido usada para a obtenção de curativos (WANG, *et al.*, 2012). Pesquisas relatam que a obtenção de matrizes de alginato associadas à gelatina pode conferir liberação controlada de fármacos (WANG *et al.*, 2010; KOTAGALE *et al.*, 2010).

Desse modo, a utilização de matrizes de alginato e gelatina na forma de esponjas, se apresentam como um promissor sistema de liberação de fármacos e revestimento cutâneo.

2.3 Esponjas

Existe um considerável interesse no uso de esponjas dentro da área farmacêutica e biomédica, particularmente como matrizes para a liberação controlada de fármacos, como curativos e como matrizes para crescimento celular dentro do campo da engenharia de tecidos.

As esponjas são desenvolvidas a partir do hidrogel, passando posteriormente por um processo denominado *freeze-drying* (liofilização). Este método permite obter uma estrutura tridimensional extremamente porosa. A solução polimérica (hidrogel) é submetida a baixas temperaturas, inferiores a -20°C, de maneira a congelar a solução e manter todas as moléculas no estado sólido (SEO, *et al.*, 2012).

As amostras são então liofilizadas sob pressão reduzida, ou seja, o solvente é sublimado passando diretamente do estado sólido para o gasoso. Portanto os poros que aparecem na matriz pertencem aos espaços anteriormente ocupados pelo solvente (SANTOS, 2010).

Esponjas de alginato têm atraído um particular interesse como matrizes para engenharia de tecidos, como por exemplo, na cicatrização de feridas (DAI *et al.*, 2009), na cultura de células-tronco derivadas de osso (SUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010) e como curativo hemostático em feridas hemorrágicas (GROENWOLD *et al.*, 2011).

A partir do desenvolvimento de matrizes porosas tridimensionais obtidas a partir da associação de biopolímeros, o alginato e gelatina vêm sendo investigadas devido à baixa toxicidade, propriedades mecânicas favoráveis e capacidade para bioreabsorção dos materiais constituintes (HWANG *et al.*, 2010; ZHU; MARCHANT, 2011).

Quando associados na matriz polimérica, a interação entre o alginato e a gelatina se deve aos grupos ionizáveis amino e carboxilatos, formando interações iônicas, e também pelas ligações de hidrogênio, formada pelo grupamento funcional carboxílico e hidroxila presentes na estrutura dos biopolímeros (Fig.2) (LI *et al.*, 2011).

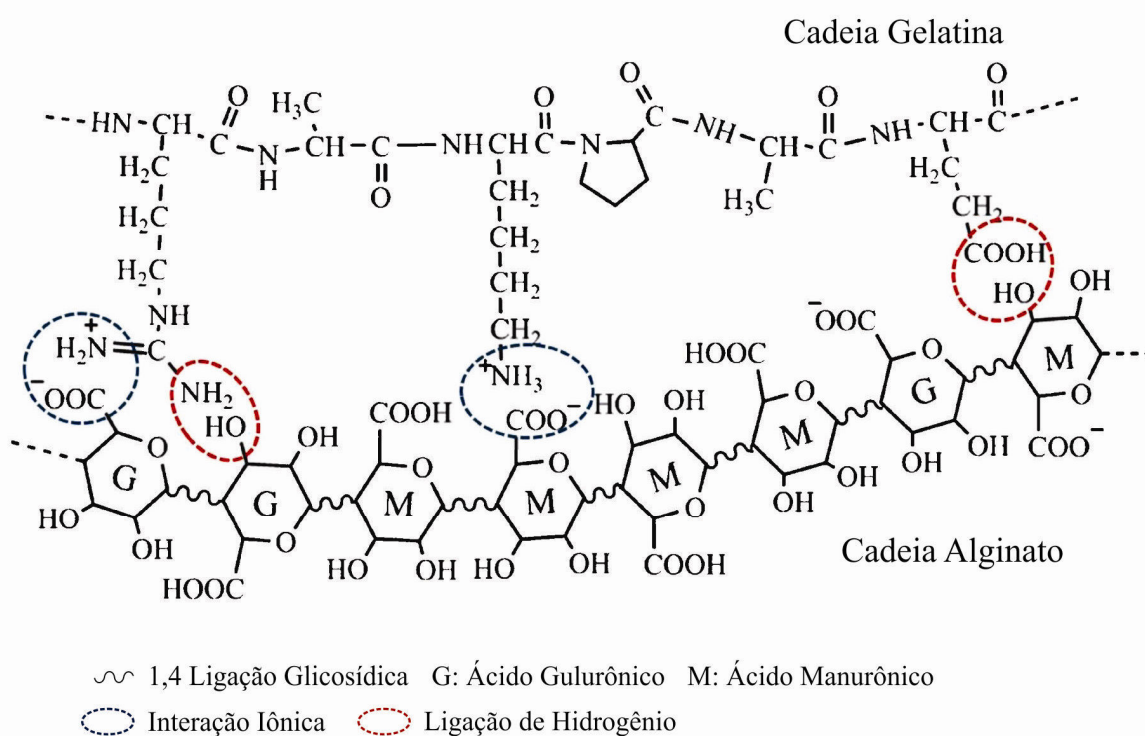


Figura 2. Esquema das interações entre o alginato e gelatina (adaptado de LI *et al.*, 2011).

Para desenvolver esponjas efetivas para aplicações biomédicas e farmacêuticas é essencial considerar suas propriedades no contexto de sua aplicação. Matrizes de engenharia de tecidos devem manter o crescimento celular, apresentar resistência adequada ao trauma

mecânico associado com a aplicação *in vivo*, além de ser capaz de incorporar e liberar fatores de crescimento em uma taxa adequada (ELBERT, 2011).

De forma similar, curativos devem apresentar flexibilidade suficiente para permitir aderência no tecido a ser tratado em um período continuado, permitindo ao mesmo tempo maximizar o conforto e a comodidade do paciente. Nesse contexto, a utilização da esponja de alginato-gelatina, como uma forma farmacêutica tecnológica simples, eficiente e reprodutível, torna-se viável no campo de aplicação da engenharia de tecidos, em especial no processo de reparação de lesões cutâneas.

Pesquisas realizadas com compostos naturais, voltadas ao desenvolvimento e estudos pré-clínicos de novos medicamentos para o tratamento lesões cutâneas e, direcionados para as necessidades de saúde da população, vêm ganhando destaque no Sistema Único de Saúde (SUS).

A possibilidade de disponibilização das esponjas como um produto inovador no tratamento de feridas tem estimulado o interesse de futura comercialização desse sistema potencialmente promissor no mercado farmacêutico.

Em busca realizada no *site* do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), Banco Americano (*United States Patent and Trademark Office*) e Banco Mundial (*World Intellectual Property Organization*) não há depósito ou registro de patentes expedidas para esponjas ou qualquer outro tipo de matriz que contenham alginato de sódio e gelatina, incorporado com um composto liquênico bioativo.

2.4 Compostos isolados de líquens

Os líquens são estruturas resultantes da associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte), fazem parte de um grupo extremamente diverso, apresentando desde formas muito simples até estruturas morfológicas e anatômicas muito complexas (KÄFFER *et al.*, 2010).

Taxonomicamente, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os líquens participam do Reino Fungi, uma vez que, praticamente, 95% dos líquens são constituídos pelo organismo micobionte (LEGAZ, 2006).

São considerados os primeiros colonizadores de habitats terrestres na terra. Cerca de 25.000 espécies de líquens habitam mais de 10% da superfície terrestre, do Ártico as regiões tropicais, das planícies às montanhas mais altas. São ricos em metabólitos protetores contra fatores extrínsecos físicos e biológicos. Ocorrem em condições extremas de existência,

possuem crescimento lento e de longa duração (pode chegar a vários milhares de anos) (MITROVIĆ, *et al.*, 2011).

Geralmente, os metabólitos dos líquens podem ser divididos em dois grupos: primários e secundários. Os metabólitos primários são proteínas, lipídios, carboidratos e outros compostos orgânicos envolvidos no metabolismo e na estrutura do líquen. Já os metabólitos secundários, conhecidos como compostos liquênicos, são principalmente moléculas pequenas, porém complexas. A quantidade pode variar de 0,1 a 10%, chegando a 30% do peso do talo seco. São insolúveis na água, mas podem ser extraídos com solventes orgânicos. Mais de 1.050 compostos liquênicos diferentes já foram relatados (MITROVIĆ *et al.*, 2011).

Há relatos de uso terapêutico dos líquens desde a antiguidade. As pesquisas sobre a produção das substâncias liquênicas ou ácidos liquênicos, começaram com os alemães HESSE (1898); ZOPF (1905) e FISCHER (1913), entre outros, mas recebeu maior atenção dos japoneses Asahina e Shibata (1954) que iniciaram um estudo no qual desenvolveram métodos mais simplificados e específicos de extração destes metabólitos, que desde então, vêm sendo fonte de diversos trabalhos publicados na literatura.

Vários ácidos liquênicos têm sido estudados do ponto de vista farmacológico. Tais ácidos são na maioria compostos fenólicos, dentre eles ácidos alifáticos, depsídeos, depsidonas, benzil ésteres, antraquinonas, terpenóides e derivados do ácido pulvínico.

De todos os metabólitos secundários, o ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandiona; $C_{18}H_{16}O_7$] é o mais estudado, apresentando diversas atividades biológicas (NUNES *et al.*, 2010).

É praticamente insolúvel em água (0,01 g/100 mL a 25°C, Merck Index, 1995) e solúvel em solventes orgânicos, tais como: dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, metanol, acetato de etila e diclorometano (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Por apresentar baixa solubilidade em água, suas propriedades físico-químicas tornam-se desfavoráveis para aplicações terapêuticas, pois por apresentar caráter hidrofóbico a dispersão do fármaco se dará em solventes orgânicos, os quais apresentam um grau de toxicidade no organismo. Isso poderá ser melhorado incorporando o ácido úsnico em lipossomas, realizando complexos de inclusão em carboidratos, como por exemplo, a ciclodextrina ou retirando o solvente por meio da evaporação ou sublimação.

O ácido úsnico apresenta-se como um pigmento cortical amarelo e ocorre em duas formas enantioméricas, dependendo da projeção do grupo metílico angular na posição 9b-quiral (Figura 3).

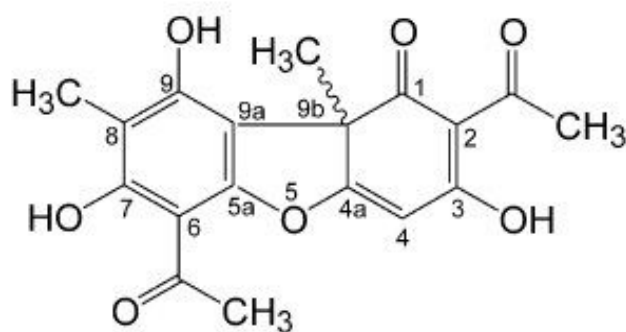


Figura 3. Estrutura do (+)-(9b-R)- e (-)-(9b-S)-ácido úsnico (adaptado de INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Sabe-se, que este ácido atua como agente cicatrizante, é um agente antitumoral potente, apresenta também atividade antibiótica, anti-histamínica, antiviral.

O estudo desenvolvido com filmes de colágeno contendo lipossomas de ácido úsnico demonstrou que o uso dos filmes é muito vantajoso, em relação aos filmes sem o fármaco, favorecendo a cicatrização de queimaduras, sendo esse benefício relacionado com a modulação de alguns dos eventos biológicos envolvidos neste processo cicatricial, como a resposta inflamatória, fase de epitelização e formação do colágeno (NUNES *et al.*, 2011).

Diante das atividades terapêuticas apresentadas pelo ácido úsnico, tornam-se imprescindíveis as análises das características físico-químicas e morfológicas das esponjas, para que o sistema de revestimento cutâneo e liberação proposto possa ser testado “*in vivo*”.

2.5 Caracterização termooanalítica

As técnicas termooanalíticas começaram a ser inventadas e estudadas a partir do início do século passado. Os trabalhos iniciais foram resultado do esforço isolado de alguns grupos de pesquisadores que empregavam uma instrumentação rudimentar idealizada e construída em seus próprios laboratórios.

A instrumentação termooanalítica evoluiu extraordinariamente em virtude de vários fatores, dentre os quais se destacam como os mais importantes: de um lado os progressos globais da ciência e da tecnologia que permitiram o aperfeiçoamento contínuo da instrumentação básica, de outro, a redescoberta das potencialidades de aplicação desses métodos nos mais variados setores científicos, tecnológicos e de produção de bens de consumo (CONDE, 2011).

O elevado grau de sofisticação da instrumentação termooanalítica, popularizou-se em função de uma aplicação prática crescente e vem sendo encarada como importante ferramenta

de trabalho em todos os setores de vanguarda que se dedicam à pesquisa, ao desenvolvimento de novos produtos e ao controle de qualidade da produção.

Nos sistemas termoanalíticos a amostra é colocada em um ambiente cuja temperatura é controlada por um dispositivo programador e suas alterações são monitoradas através de um transdutor adequado que produz um sinal elétrico de saída análogo à transformação ocorrida.

A definição aceita de Análise Térmica, como dada pela Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) é: “Um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura”.

Esta definição implica que uma técnica térmica para que possa ser considerada como termoanalítica, três critérios devem ser satisfeitos: uma propriedade física tem que ser medida; a medida deve ser expressa (direta ou indiretamente) como função da temperatura; a medida tem que ser feita sob um programa controlado de temperatura.

Dentre as técnicas difundidas e utilizadas neste estudo estão: termogravimetria, termogravimetria derivada (TG/DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Estas técnicas permitem obter informações com respeito à: variação de massa, estabilidade térmica; água livre e; água ligada; pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, calores específicos, diagramas de fase, cinética da reação, estudos de catalisadores, transições vítreas, entre outros (IONASHIRO, 2004)

2.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual mensura-se a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, em função da temperatura enquanto a substância e o material referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (IONASHIRO, 2004).

No método DSC por fluxo de calor, as amostras são aquecidas por uma fonte de calor (forno) e o que se mede é a diferença de calor entre a amostra e a referência. Sendo esta diferença de calor proporcional a diferença de temperatura entre os materiais, e a partir daí obtêm-se indiretamente o fluxo de calor entre eles (em J/s ou W e mJ/s ou mW).

Neste método as amostras (de referência e em análise) são colocadas no forno e como neste o fornecimento de calor é uniforme, os ruídos devidos as flutuações de temperatura e a variações de convecção são muito pequenos, o que contribui para a estabilidade da linha de base e elevada sensibilidade de medição.

No método DSC por compensação de potência usam-se dois microaquecedores na parte inferior dos termopares para fornecer calor individualmente a amostra em análise e a amostra de referência, controlando a variação de temperatura (dT/dt) e o fornecimento de potência elétrica aos microaquecedores de modo que a diferença de temperatura entre aqueles materiais seja sempre nula.

Quando ocorre uma reação endotérmica na amostra aplica-se energia ao microaquecedor da amostra em análise e se ocorre uma reação exotérmica aplica-se energia ao microaquecedor da amostra de referência. Esta diferença de potência elétrica ($1W = 1 J/s$) fornecida aos microaquecedores para equilibrar a diferença de temperatura entre os materiais que é medida e registrada (CONDE, 2011).

Neste método, as capacidades caloríficas do bloco das amostras e dos microaquecedores são pequenas, a resistência calorífica entre o aquecedor e a amostra é pequena e o sistema de controle de temperatura é muito eficiente, obtendo-se curvas térmicas com picos incisivos e de maior resolução que os produzidos com o sistema anterior.

Através dessas técnicas, podem-se acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de oxidação-redução, etc. capazes de causar variações de calor.

Em geral transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos.

2.5.2 Análise termogravimétrica e termogravimétrica derivada (TG/DTG)

Datam de muitos anos as tentativas para se chegar a um conhecimento detalhado sobre as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, a fim de se poder estabelecer a faixa de temperatura em que se começa a decompôr, bem como para se seguir o andamento de reações de desidratação, oxidação, decomposição, entre outros (IONASHIRO, 2004).

Neste sentido, inúmeros pesquisadores se empenharam na laboriosa construção, ponto a ponto, das curvas de perda de massa em função da temperatura, aquecendo as amostras até uma dada temperatura e a seguir, após o resfriamento, pesando-as em balanças analíticas.

Na termogravimetria, a massa da amostra (m), é continuamente registrada como função da temperatura (T) ou tempo (t): $M = f(T \text{ ou } t)$. Portanto, nas curvas TG, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra e permitem obter dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas (CONDE, 2011).

Na termogravimetria derivada são obtidas curvas que correspondem à derivada primeira da curva TG e nos quais as inflexões da curva são substituídas por picos que delimitam áreas proporcionais às alterações de massa sofridas pela amostra.

Nesse sistema a balança suspende duas amostras idênticas sobre dois fornos idênticos, aquecidos linearmente, mas um deles sendo mantido cerca de 5°C mais quente que o outro. Estabelece-se um diferencial de massa que é proporcional à razão de aquecimento dos fornos. Dentre as aplicações da análise termogravimétrica e termogravimétrica derivada estão:

- a) Estudo da decomposição térmica de substâncias orgânicas, inorgânicas e dos mais variados tipos de materiais como: minerais, minérios, carvão, petróleo, madeira, polímeros, alimentos, materiais explosivos etc.
- b) Estudos sobre corrosão de metais em atmosferas controladas, em faixas muito amplas de temperatura.
- c) Estudos sobre a velocidade de destilação e evaporação de líquidos, e de sublimação de sólidos.

2.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A técnica da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas na identificação dos diferentes grupos constituintes de um material.

Este tipo de análise baseia-se na propriedade dos materiais, devido às ligações químicas possuírem frequências de vibração e de elongação específicas, às quais correspondem níveis energéticos específicos da molécula. As frequências das vibrações dependem do comprimento da ligação (maior para ligações simples e menor para ligações triplas) e da massa dos átomos (os átomos mais leves têm maior frequência de vibração que os mais pesados).

Existem alguns modos de vibração, mas os mais conhecidos são o alongamento, caracterizado pela mudança no comprimento da ligação, e a deformação, que acontece quando há uma variação do ângulo da ligação. Estas vibrações podem ser simétricas ou assimétricas (SANTOS, 2010).

Deste modo, quando a radiação incide sobre o material e o atravessa, a molécula absorve-a. No entanto, como cada grupo funcional apresenta valores diferentes e característicos para vibração, alongação e rotação, a leitura do espectro, e as suas bandas, permite a verificação dos tipos de grupos que constituem cada composto (MORRINSON; BOYD, 2009).

O espectrofotômetro usado em espectroscopia FTIR, tem um interferômetro incorporado, por onde é guiado o feixe de luz infravermelha (IV) com todos os comprimentos de onda. O sinal obtido é depois tratado por um método matemático, a transformada de Fourier, resultando num espectro idêntico ao de espectroscopia de infravermelho convencional: absorbância (%) em função de número de onda (cm^{-1}).

Na interpretação do espectro obtido, é importante admitir o número de onda (que é proporcional à frequência) para o qual a absorbância é significativa. Para esses valores de número de onda, deve ser consultada a literatura para saber a que ligações químicas correspondem.

A técnica de FTIR pode ainda ser complementada com o ATR (*Attenuated Total Reflection*), para uma análise superficial dos compostos químicos. O objetivo do ATR é então detectar os desvios no trajeto do feixe de luz infravermelha, que acontecem em um cristal com um elevado índice de refração. O uso deste acessório faz diminuir o tempo de amostragem, minimizar as variações espectrais de analisador para analisador e obter uma melhor qualidade espectral para uma precisão maior no estudo das amostras (SANTOS, 2010).

2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica tornou-se a técnica mais importante na caracterização da morfologia de materiais. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (em inglês, *scanning electron microscopy*) produz imagens de elevada ampliação (de até 300.000x) e resolução da superfície de uma amostra.

As imagens de MEV tem uma aparência tridimensional, e deste modo, são bastante úteis para a análise da estrutura da superfície da amostra.

O MEV permite observar e caracterizar materiais orgânicos e inorgânicos em escala nanométrica (nm) e micrométrica (μm). Por meio desta técnica podem-se obter imagens de superfícies de um grande número de materiais (LOPES, 2009).

Quanto aos seus componentes, o MEV caracteriza-se por uma coluna óptico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de redução do feixe de elétrons), por uma unidade de varredura, por uma câmara (onde se situa o porta-amostra), por um sistema de detectores e por um sistema de visualização de imagem. Ao serem captadas, estas partículas fornecem várias informações sobre as características da amostra, tais como: a morfologia da superfície, a composição, a estrutura cristalográfica, entre outros.

Na técnica de MEV os sinais de maior relevância para a formação da imagem são os elétrons secundários e os elétrons retrodifundidos. Os primeiros fornecem a imagem morfológica da superfície da amostra, sendo estes responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, enquanto os segundos fornecem a imagem característica da variação da composição da amostra, fornecendo informação sobre os diferentes elementos presentes nela (LOPES, 2009).

Os elétrons secundários resultam da transferência de energia entre os elétrons bombardeados e os elétrons das camadas exteriores. O elétron do átomo vai sair deste com uma energia relativamente mais baixa, cerca de 50 eV.

Estes elétrons são provenientes de uma interação inelástica. Esta interação ocorre na superfície e a sua intensidade é muito influenciada pela morfologia da amostra, o que faz com que os elétrons secundários sejam úteis para a obtenção da morfologia da amostra (CONDE, 2011).

Os elétrons retro difundidos têm origem em interações elásticas onde o elétron sofre um grande desvio angular (cerca de 180°). Estes elétrons possuem uma energia próxima da do feixe incidente e são originários da superfície da amostra. Se dividirmos o número de elétrons retrodifundidos pelo número de elétrons incidentes obtemos o coeficiente de retrodifusão. Este valor aumenta com o número atômico médio do material e o ângulo de incidência. Assim, por serem provocados por interação com os átomos da amostra, fornecem dados sobre o contraste baseado no número atômico dos átomos presentes no material, bem como, sobre as variações microscópicas da composição química da amostra e sobre a sua morfologia.

O MEV constitui-se também de uma ferramenta que ajuda a elucidar o comportamento mecânico de sistemas poliméricos, quando esses são submetidos a forças de tração e compressão.

2.8 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais são avaliadas a partir de uma solicitação, na forma de uma deformação ou na aplicação de uma tensão, com o monitoramento da resposta do material. Estes experimentos são destrutivos, já que uma de suas finalidades é a determinação de propriedades limite do material.

O comportamento mecânico ou dinâmico-mecânico de um material será comandado por sua viscoelasticidade, que será função do tipo de ensaio e de solicitação aplicados. Dependendo da resposta ao estímulo mecânico, o material pode ser classificado como elástico ou viscoso.

Para um sólido perfeitamente elástico ou Hookiano a deformação é proporcional à tensão aplicada e vice-versa, segundo a lei de Hooke. Materiais poliméricos apresentam comportamento mecânico intermediário ao elástico e ao viscoso, sendo denominados viscoelásticos (CASSU; FELISBERTI, 2005).

A fim de desenvolver esponjas eficazes para aplicações biomédicas, é essencial considerar suas propriedades mecânicas no contexto da sua aplicação. Matrizes de engenharia de tecidos devem não só manter o crescimento das células, mas também ser adequadamente robustos e flexíveis de modo a suportar o trauma mecânico associado com aplicação *in vivo* e permitir a aderência ao tecido em questão por um período sustentado de tempo, conferindo conforto e comodidade para o paciente (LAI *et al.*, 2003).

A elasticidade é a qualidade de um material que permite que ele retorne à sua forma original após a deformação. Duas medidas são utilizadas para quantificar elasticidade. O módulo de elasticidade (E) é a rigidez de um material e é calculado como a inclinação da seção linear de cada parcela (LOUDEN *et al.*, 2007). O módulo de resiliência (E_r) é a energia absorvida por um material quando esticada até ao limite elástico e, assim, a energia libertada pelo material quando retornar a partir do seu limite elástico à sua forma original (ASKELAND; PHULÉ, 2006). O módulo de resiliência é calculado como a área sob a região elástica da curva de tensão-deformação.

A resistência à tração é determinada como o maior nível de tensão aplicada à amostra antes de ser destruída (LOUDEN *et al.*, 2007). O limite elástico (σ) é medida como a tensão máxima aplicada antes do dano permanente ocorre, ou seja, a tensão em que a curva de tensão-deformação segue uma relação linear (HIBBELER, 2003). Deformação elástica (ϵ) é a máxima tensão (ou estiramento) aplicada à esponja antes que ocorra um dano permanente e é calculada como a tensão correspondente com o limite elástico (LOUDEN *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Caracterizar e avaliar o efeito de esponjas de alginato-gelatina incorporadas com ácido úsnico sobre o processo de reparo cicatricial utilizando modelo animal

3.2 Específicos

- Obter esponjas a partir de uma proporção fixa de alginato/gelatina (1:1) não-incorporadas e incorporadas com ácido úsnico nas concentrações de 1 e 5% (m/v);
- Caracterizar as esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico obtidas por meio de curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica/termogravimétrica derivada (TG/DTG), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e propriedades mecânicas.
- Avaliar em ratos o processo de reparo cicatricial de animais tratados com esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção e caracterização físico-química de esponjas contendo ácido úsnico

4.1.1 Material

Para preparação das esponjas, foi utilizado (+) ácido úsnico (98%, lote 329967, Sigma), alginato de sódio (lote W201502), e gelatina (lote G2500), proveniente de pele suína, adquiridos na Sigma-Aldrich. Para a solubilização do ácido úsnico, foi utilizado 1,4-dioxano ($C_4H_8O_2$), anidro (99,8%, lote 296309), também adquirido na Sigma-Aldrich.

4.1.2 Preparação das esponjas

Foram desenvolvidos três tipos de esponjas: uma esponja, como controle, onde foi constituída apenas por alginato e gelatina (ALG/GEL), e duas esponjas, como teste, constituída de alginato e gelatina incorporados com ácido úsnico nas concentrações de 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%).

Inicialmente, foi preparada uma solução polimérica para obtenção das esponjas, onde foram dissolvidos, o alginato e gelatina (1:1) em pó, (1% m/v) em 100 mL de água destilada a 40°C por 4h mediante agitação magnética (Figura 4; A). Separadamente, o ácido úsnico nas concentrações de 1 e 5% (em relação a massa dos polímeros, ver Tabela 1), foi dissolvido em 10 mL de dioxano, sendo posteriormente adicionado a 50 mL da solução polimérica, mantendo a mistura sob agitação e temperatura de 50°C por 24 h (Figura 4; B).

As soluções (1 e 5%) resultantes foram colocadas em moldes de polietileno retangulares e congeladas a -20°C em *freezer* durante 24 h (Figura 4; C). Em seguida, as soluções poliméricas congeladas foram liofilizadas a -80°C por 24 h (Figura 4; D). Após o período da liofilização, as esponjas (Figura 4; E) permaneceram no dessecador sob pressão reduzida, até a utilização nas análises.

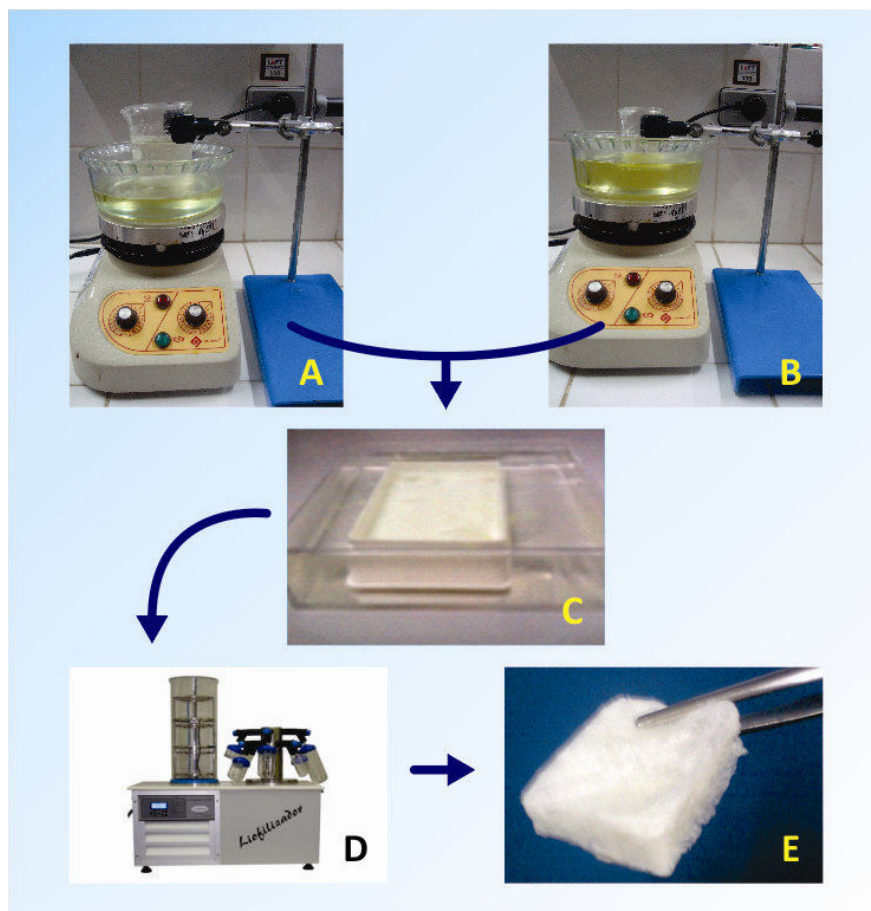


Figura 4. Procedimento de preparação as esponjas

Tabela 1. Composição das soluções poliméricas que constituem as esponjas.

Amostras	m _{alginato} (g)	m _{gelatina} (g)	m _{ácido úsnico} (g)
ALG/GEL	0,5	0,5	0
AU 1%	0,5	0,5	0,01
AU 5%	0,5	0,5	0,05

ALG/GEL= esponjas de alginato e gelatina sem ácido úsnico; AU 1% = esponjas de alginato e gelatina incorporadas com ácido úsnico a 1%; AU 5% = esponjas de alginato e gelatina incorporadas com ácido úsnico a 5%.

4.1.3 Análise quantitativa das esponjas

4.1.3.1 Solução padrão de ácido úsnico

A curva de calibração e doseamento seguiram a metodologia descrita por Nunes *et al.* (2009).

A solução estoque padrão foi obtida pesando 5 mg de ácido úsnico, que foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, utilizando o metanol como solvente e submetendo a sonicação por 5 minutos. Esta solução foi aquecida em banho-maria a 40°C até completa solubilização do fármaco. A concentração final de ácido úsnico foi de 0,05 mg/mL.

Diluições apropriadas da solução estoque padrão foram efetuadas com metanol para execução da curva de calibração perfazendo concentrações de 2, 4, 8 e 12 µg/mL.

4.1.3.2 Extração e doseamento do ácido úsnico a partir das esponjas

Para a extração as esponjas foram cortadas em unidades de 1 mm³. Após o corte as esponjas foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 20 mL de metanol. Cada tubo foi submetido à agitação em Vortex durante cinco minutos e, em seguida, submetido à sonicação durante cinco minutos para liberar o conteúdo do ácido úsnico incorporado. Ao final da agitação, para a esponja a 1%, a solução resultante constitui-se na amostra.

Para a esponja a 5% foi realizada uma diluição adicional, retirando-se 5 mL da solução mãe e diluindo-se para um balão de 10 mL com metanol. As amostras obtidas foram, então, analisadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 290 nm. Todas as amostras foram realizadas em triplicata para cada esponja.

A análise de doseamento foi realizada no Laboratório de Ensaaios Farmacêuticos e Toxicidade (LEFT) da Universidade Federal de Sergipe.

4.1.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas da calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 550°C, utilizando-se célula calorimétrica modelo DSC-50 da marca Shimadzu[®], sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando cápsula de alumínio parcialmente fechada contendo aproximadamente 2,5 mg de amostra.

A célula foi calibrada e verificada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6^{\circ}\text{C}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5^{\circ}\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99%. Para o fluxo de calor foi empregado o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio metálico (28,7 J.g⁻¹). Foram analisadas as curvas DSC das amostras de ácido úsnico (AU), alginato (ALG), gelatina (GEL), esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e esponjas incorporadas com o fármaco nas

concentrações de 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%). A análise DSC foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal de Sergipe.

4.1.5 Análise termogravimétrica e termogravimétrica derivada (TG/DTG)

As curvas da análise termogravimétrica e termogravimétrica derivada (TG/DTG) das esponjas, foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 900°C, utilizando a termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu[®], sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando porta amostra de alumina contendo massa de amostra em torno de 2,5 mg. Antes dos ensaios foi verificada a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado conforme norma ASTM (1582 – 93). A análise dos resultados foi realizada a partir da aplicação do *software* TasyS-50 (Shimadzu[®]).

Foram analisadas, quanto ao perfil termoanalítico, as amostras de ácido úsnico (AU), alginato (ALG), gelatina (GEL), esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e esponjas incorporadas com o fármaco nas concentrações de 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%). As análises TG/DTG foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal de Sergipe.

4.1.6 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) foram obtidos em equipamento PerkinElmer[®], no comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, diluindo-se as amostras em KBr sob a forma de pastilha.

Foram analisados os espectros FTIR das amostras de ácido úsnico (AU), alginato (ALG), gelatina (GEL), esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e esponjas incorporadas com o fármaco nas concentrações de 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%). As análises foram realizadas no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.7 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram coletadas por deposição em alumínio revestido com carbono, usando um microscópio eletrônico de

varredura Shimadzu® SS-550 trabalhando a 12 kV. As amostras foram cobertas com aproximadamente 20 nm de Au por 2 minutos de banho entre 5 e 6 mA. Foram analisadas as imagens das esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e esponjas incorporadas com o fármaco nas concentrações de 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%), nas escalas de 50 e 500 μm . A análise foi realizada no departamento de Química da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.8 Avaliação das propriedades mecânicas

Os ensaios mecânicos de alongamento e compressão foram realizados, no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes, utilizando um analisador de textura (TA-XT2 - Stable Micro Systems, Leatherhead, Grã-Bretanha).

A resistência à tração (TS), alongamento (E) e módulo de Young (YM) foram determinados utilizando amostras de esponjas de 25 mm x 10 mm em conformidade com a norma ASTM D882 (ASTM, 1995). A velocidade de tração foi de 1,00 mm.s^{-1} e a distância inicial foi de 10 mm.

A TS foi calculada usando a força máxima na ruptura dividida pela área de corte transversal da esponja. O E foi expresso em percentagem em relação ao comprimento original da esponja, e YM foi calculado como a relação entre TS e E .

A avaliação da compressão foi realizada por meio da mensuração da rigidez da esponja que consistiu em colocar a esponja cortada em 1 cm^2 , sob um cilindro de alumínio, de 1 cm de diâmetro, o qual realizava o ciclo de compressão da amostra a distância de 2,5 mm (aproximadamente metade da espessura da esponja), com velocidade de 0,05 mm.s^{-1} . Para o cálculo da rigidez foi utilizado a fórmula: $k = P_{\text{máx}}/d_{\text{comp}}$, onde ;

k = rigidez;

$P_{\text{máx}}$ = força máxima do pico de compressão aplicada a esponja (N);

d_{comp} = distância de compressão (mm).

4.2. Avaliação do processo de cicatrização de esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico, em modelo animal

Para a avaliação do processo de cicatrização, foram selecionadas as esponjas incorporadas com 5% de fármaco, pois obtiveram o melhor resultado na análise quantitativa de ácido úsnico.

4.2.1 Animais

Para realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados ratos adultos machos, linhagem Wistar, pesando 250-300 g. Os ratos foram alojados em gaiolas de propileno, com o fundo recoberto com maravalha, mantidos na temperatura de 25°C e umidade controlada em 75%.

Os animais foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais e procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (Protocolo nº 81/10).

4.2.2 Realização da ferida e formação dos grupos

Um total de trinta e seis animais foram anestesiados, com quetamina e xilazina, via intraperitoneal (dose de 100 mg/Kg: 5 mg/Kg) (Figura 5; A). Após atingir o plano anestésico, foi realizada tricotomia manual da região média dorsal e antisepsia com solução de iodo-povidona tópica a 7,5% (POVIDINE®).

A técnica operatória seguiu a mesma padronização para os animais de todos os grupos que consistiu na excisão total da pele e hipoderme, na região 1 cm abaixo da região óssea escapular, realizada com um *punch* metálico para biópsia (RICHTER®) com diâmetro de 8 mm (Figura 5; B). As feridas não foram suturadas e a hemostasia foi feita por compressão digital com gaze (Figura 5; C).

Esses animais foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos denominados: CTR (grupo controle negativo, o qual não recebeu tratamento); ALG/GEL (grupo controle positivo, tratado com esponja sem ácido úsnico) e AU 5% (grupo teste, tratado com esponja incorporada com ácido 5%).

Para os animais tratados, a área lesada foi lavada com soro fisiológico, em seguida as esponjas foram cuidadosamente aplicadas sobre o ferimento, não realizando bandagem (Figura 5; D). Após 7 e 14 dias, antes da eutanásia, os animais foram avaliados macroscopicamente para avaliação pré-clínica do processo de reparo tecidual. Assim, as feridas foram fotografadas e o diâmetro médio foi determinado no eixo crânio-caudal e latero-lateral com uso de paquímetro digital Digimess®. Em seguida os animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia de acordo com procedimento aprovado pelo Comitê de Ética.

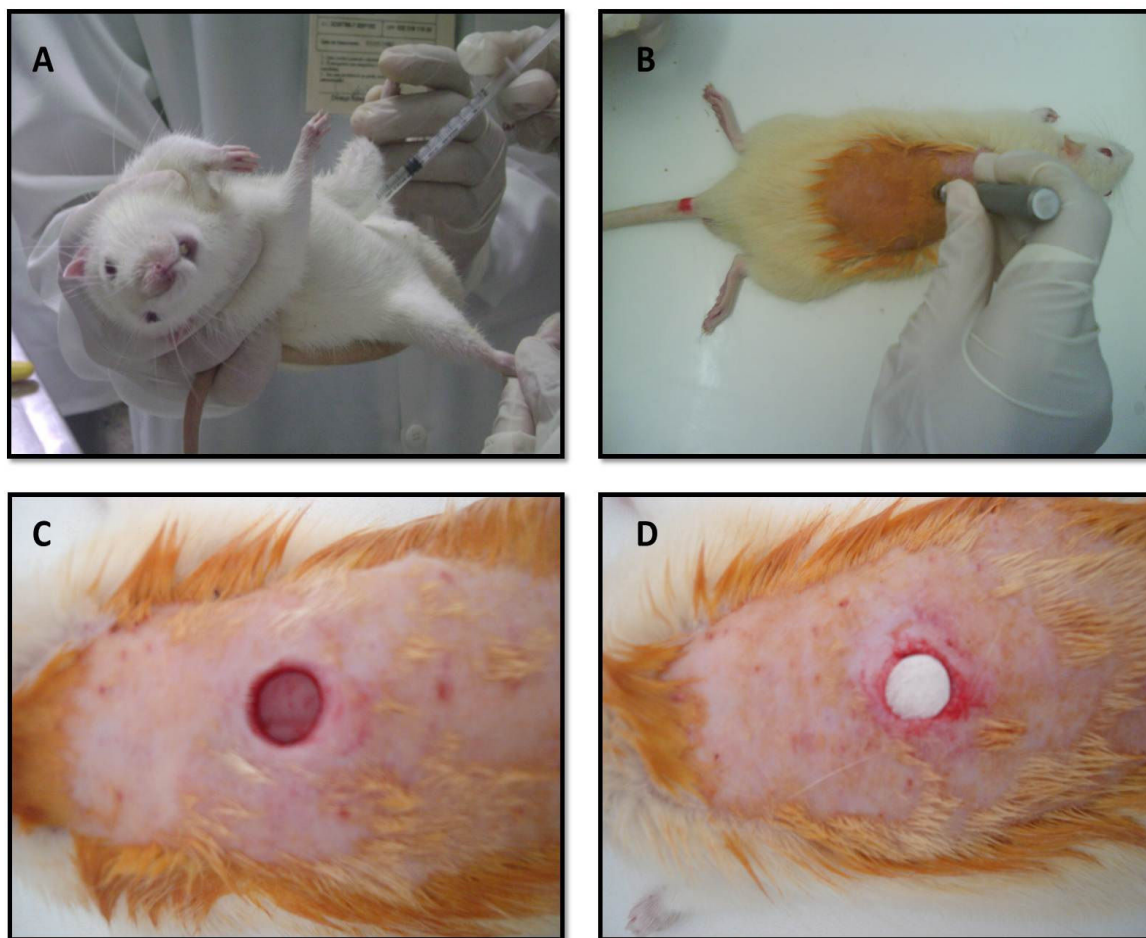


Figura 5. Etapas da técnica operatória. (A) Anestesia; (B) Realização da ferida; (C) Ferida; (D) Aplicação da esponja.

4.2.3 Procedimento histológico

Após o procedimento, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial com margem de 0,5 cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a primeira camada muscular. Cada peça foi fixada com o auxílio de alfinetes em EVA e colocada em recipiente plástico com solução de formol tamponado a 10% e pH 7,4 para a fixação.

Posteriormente as peças foram hemisseccionadas, desidratadas em soluções crescentes de etanol a 70, 95 e 100° GL, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (técnica histológica convencional). Secções histológicas de 5 μ m foram obtidas a partir das amostras emblocadas em parafina e posteriormente submetidas à coloração de Hematoxilina/Eosina (HE) e Picrossírius.

4.2.3.1 Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da ferida

O índice de epitelização da superfície da ferida foi avaliado observando-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado, na região correspondente, a superfície da ferida cirúrgica. Para obtenção deste índice, foram selecionadas quatro imagens previamente fotomicrografadas de cada secção histológica.

Estas foram processadas em um software específico para morfometria Image Tool®, onde foi determinado o número de pixels correspondente a área de extensão ocupada pela faixa de epitelização na superfície da ferida e a extensão total da superfície da ferida.

Posteriormente foi determinado o percentual de epitelização (Ep) em cada caso, calculando-se a razão entre a extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado (Eex) e a extensão total do ferimento (ET), multiplicado por 100, de acordo com a seguinte fórmula:

$Ep = (Eex / ET) \times 100$, onde:

Ep – Percentual de epitelização;

Eex – extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado;

ET – extensão total do ferimento.

4.2.3.2 Avaliação da deposição de colágeno

Sessões histológicas coradas com Picrossírius foram realizadas para análise descritiva, utilizando luz polarizada, da deposição colagênica. Fibras de colágeno foram analisadas de acordo com seu padrão de birrefringência (verde/amarelo-esverdeado, laranja ou laranja-avermelhado); morfologia das fibras (onduladas ou retas, finas ou espessas, curtas ou longas) e disposição das fibras (arranjo reticulado ou entrelaçado).

A análise quantitativa da área preenchida por fibras de colágeno foi determinada pela densidade óptica de um sistema de análise de imagens de campos selecionados aleatoriamente. O sistema utilizado consiste em uma câmara CCD Sony DXC-101, acoplada a um microscópio Olympus CX3, através do qual as imagens foram emitidas para um monitor. Por meio de um sistema de digitalização (Olympus 77 C-7070 WIDEZOOM) as imagens foram inseridas em um computador, e processadas no software (ImageLab®).

Um total de dez campos aleatórios foram analisados com uma ampliação de 100x. A área ocupada pelas fibras de colágeno foi determinada por reconhecimento densitométrico digital, pelo ajuste dos níveis de mensuração da diferença da densidade das cores das fibras de

colágeno. A área ocupada pelas fibras foi dividida pela área total do campo. Os resultados foram expressos em porcentagem da área da lesão que apresentava fibras de colágeno.

4.3 Análise estatística

Para análise estatística, de comparação entre as médias, dos resultados das propriedades mecânicas, avaliação da reação de granulação, índice percentual de epitelização da superfície da ferida e deposição de colágeno, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para os ensaios biológicos, cada tempo de estudo (7 e 14 dias) foi comparado separadamente. Foi utilizado um nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e caracterização de esponjas contendo ácido úsnico

Macroscopicamente, as esponjas apresentaram, após a secagem, variações na coloração em função da concentração de ácido úsnico. A esponja preparada apenas com os biopolímeros mostrou-se branca, biopolímero-ácido úsnico 1% foi levemente amarelada e a de 5% tem uma cor amarela (Figura 6).



Figura 6. Aspecto macroscópico das esponjas sem o fármaco (A), com ácido úsnico 1 (B) e 5% (C).

Após a obtenção das esponjas foi realizado o doseamento, segundo Nunes *et al.* (2009). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Teor de ácido úsnico presente nas esponjas de alginato e gelatina.

Concentração de ácido úsnico (µg/mL)			
AU%	Teórica	Experimental (DP)	Teor (%)
1,0	8,0	4,8 (0,401)	60,03
5,0	11,78	11,48 (0,140)	97,38

DP.= desvio-padrão

A Figura 7 mostra a curva DSC do ácido úsnico (AU), que apresentou dois eventos envolvendo variação de entalpia, um primeiro evento endotérmico entre a faixa de temperatura de 192-210°C, com pico agudo bem definido em 201°C, característico da fusão

do fármaco, seguido de um evento exotérmico, com pico na temperatura de 273°C, característico de decomposição do composto (NUNES *et al.*, 2010).

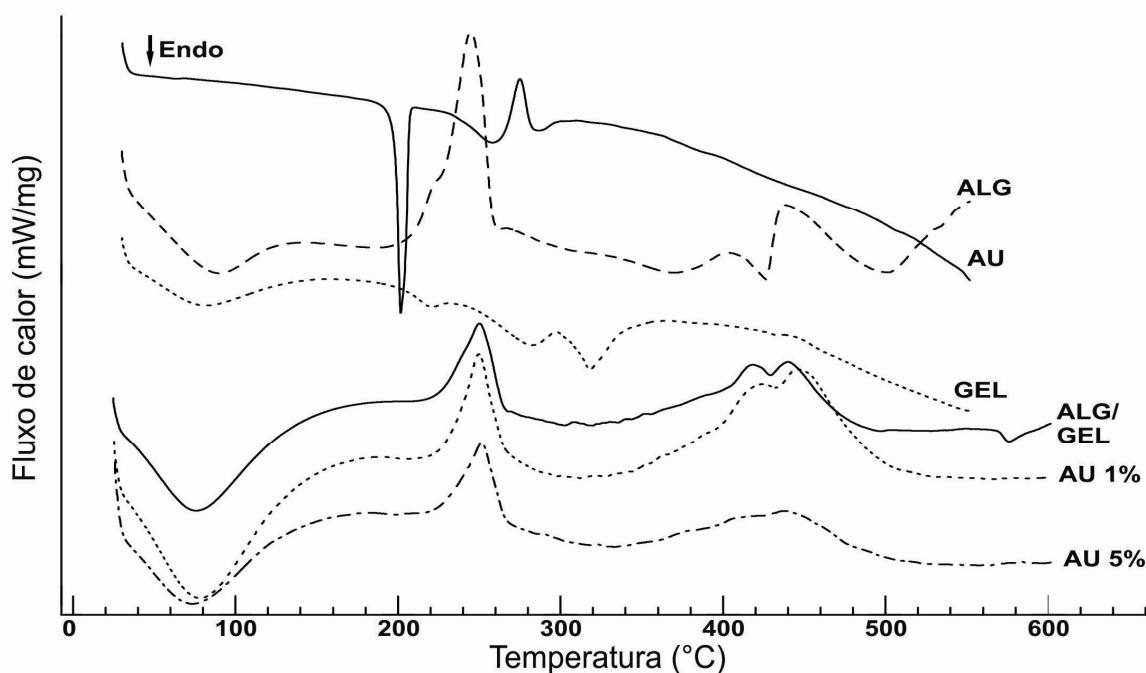


Figura 7. Curvas DSC do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL), obtidas na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂.

Na Figura 7 são apresentadas também as curvas do alginato e da gelatina isoladas. A curva DSC da esponja inerte (ALG/GEL) mostrou quatro eventos envolvendo variação de entalpia, sendo o primeiro endotérmico, entre 36-145°C, correspondente a desidratação (umidade de superfície), e os subsequentes exotérmicos, característicos de decomposição e eliminação de material carbonáceo.

No entanto, este evento pode ser visualizado na curva TG (Figura 8), onde a perda de umidade foi de aproximadamente 12%. A esponja inerte apresentou estabilidade térmica entre 145 e 196°C e em seguida foi observado três eventos com perda de massa, o primeiro em 196-270°C e o segundo em 270-515°C, com variação de 18.7% e 31.8%, respectivamente (Tabela 3).

As curvas DSC das esponjas nas concentrações de 1 e 5% (Figura 7) mostraram também quatro eventos, onde foram observados um primeiro evento endotérmico, seguido de dois eventos exotérmicos característicos de decomposição e o último de eliminação de derivados do carbono. Adicionalmente, essas curvas mostram ainda a ausência do pico de fusão do ácido úsnico em 201°C, indicando que o mesmo não encontra-se livre nas preparações, sugerindo a incorporação efetiva do fármaco.

A curva TG (Figura 8) corroboram com esses dados, onde o primeiro evento está relacionado com a desidratação da matriz polimérica, com perda de massa de 13,2% para esponja com 1% e 7,8% para esponja com 5% de fármaco, seguido de dois eventos de decomposição, e um último de eliminação de material carbonáceo, com perda de massa e faixas de temperatura descritos na Tabela 3.

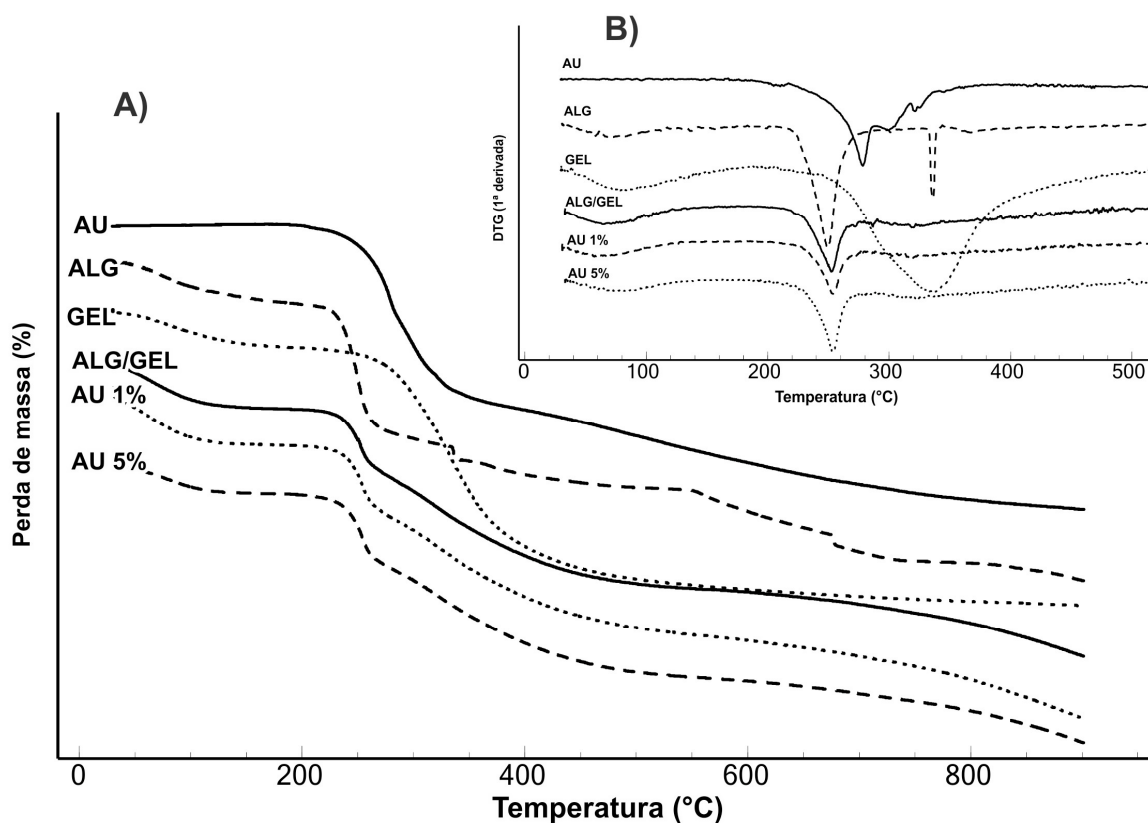


Figura 8. Curvas TG (A) e DTG (B) do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL), obtidas na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂.

As curvas TG/DTG das esponjas inertes e com ácido úsnico a 1 e 5% são visualizadas com um comportamento térmico e percentuais de perda de massa similares, sugerindo que a incorporação do fármaco não afetou a estabilidade das esponjas.

Tabela 3. Faixas de temperatura e percentuais de perda de massa, nas etapas da análise termogravimétrica, das esponjas de alginato e gelatina sem o fármaco (ALG/GEL), incorporadas com o fármaco a 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%).

	1ª etapa (%)	T _{faixa} (°C)	2ª etapa (%)	T _{faixa} (°C)	3ª etapa (%)	T _{faixa} (°C)	4ª etapa (%)	T _{faixa} (°C)
ALG/GEL	12.0	36-145	18.7	196-270	31.8	270-515	18.2	515-900
AU 1%	13.2	36-140	19.6	213-271	33.6	271-480	22.6	480-900
AU 5%	7.8	38-180	20.2	240-275	31.2	275-518	17.6	518-900

A Figura 9 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho do ácido úsnico (AU), alginato (ALG), gelatina (GEL), e das esponjas com fármaco, obtidas nas concentrações de 1 (AU 1%) e 5% (AU 5%), e sem ácido úsnico (ALG/GEL).

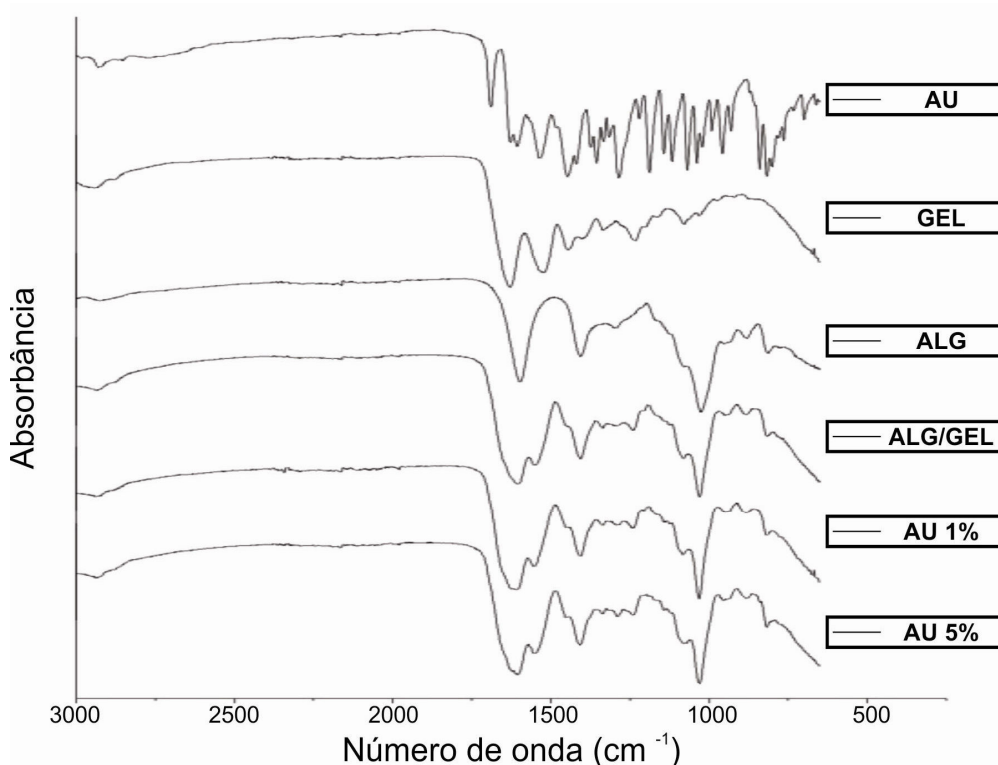


Figura 9. Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) do ácido úsnico (AU), gelatina (GEL), alginato (ALG) e das esponjas com fármaco a 1% (AU 1%) e 5% (AU 5%) e sem ácido úsnico (ALG/GEL).

O espectro no infravermelho do ácido úsnico (Figura 9) mostrou uma banda em 1690 cm^{-1} correspondente ao grupo cetônico conjugado. Bandas no número de onda em 1715 e

1678 cm^{-1} foram assinaladas para os grupos (C=O) grupos cetônicos não-conjugados e cetona não-aromática, respectivamente. A banda em 1628 cm^{-1} refere-se a grupos conjugados e grupos doadores de elétrons em anéis aromáticos. Também foi possível verificar bandas simétricas referentes ao grupo (C-O-C) aquil-éter em 1283 e 1072 cm^{-1} (NUNES *et al.*, 2010).

O espectro de absorção no infravermelho da gelatina é caracterizado pela presença das bandas fortes em 1637 e 1554 cm^{-1} , características de grupos carboxamidas (C=O e C-N) e vibração de flexão de grupamentos (-NH). As bandas de absorção características, em 1593 e 1411 cm^{-1} , observadas no espectro do alginato, correspondem, respectivamente, ao grupo carboxila (-COO⁻) assimétrico e simétrico presente em sua estrutura (LI *et al.*, 2011).

De acordo com esses espectros, pode-se observar que as esponjas mostraram um somatório de eventos correspondentes às bandas do ácido úsnico, alginato e gelatina, sugerindo a presença dos referidos componentes na amostra.

A caracterização de superfície das esponjas usando MEV é útil na compreensão da morfologia e como as substâncias foram incorporadas (SZYNKOWSKA *et al.*, 2008).

Em geral, a porosidade, o tamanho médio dos poros e a orientação da matriz porosa são elementos indispensáveis para a atividade biológica de biomateriais. O processo de liofilização foi utilizado para o preparo das esponjas, onde as soluções inicialmente preparadas foram congeladas a -20°C em um congelador convencional (em vez de nitrogênio líquido, T_{cong} -70°C). Neste processo, comparado ao de nitrogênio líquido a taxa de resfriamento é lenta e é produzindo uma grande quantidade de pequenos cristais de gelo, resultando em morfologia altamente porosa e homogênea (CHOI *et al.*, 1999).

Na Figura 10 são apresentadas as fotomicrografias obtidas por MEV para as esponjas inertes e com ácido úsnico na concentração de 1 e 5%. A morfologia das esponjas preparadas somente com os biopolímeros, alginato e gelatina, e esponjas incorporadas com ácido úsnico 1 e 5% exibiram estruturas altamente porosas com poros interligados, conforme o esperado para este tipo de estrutura.

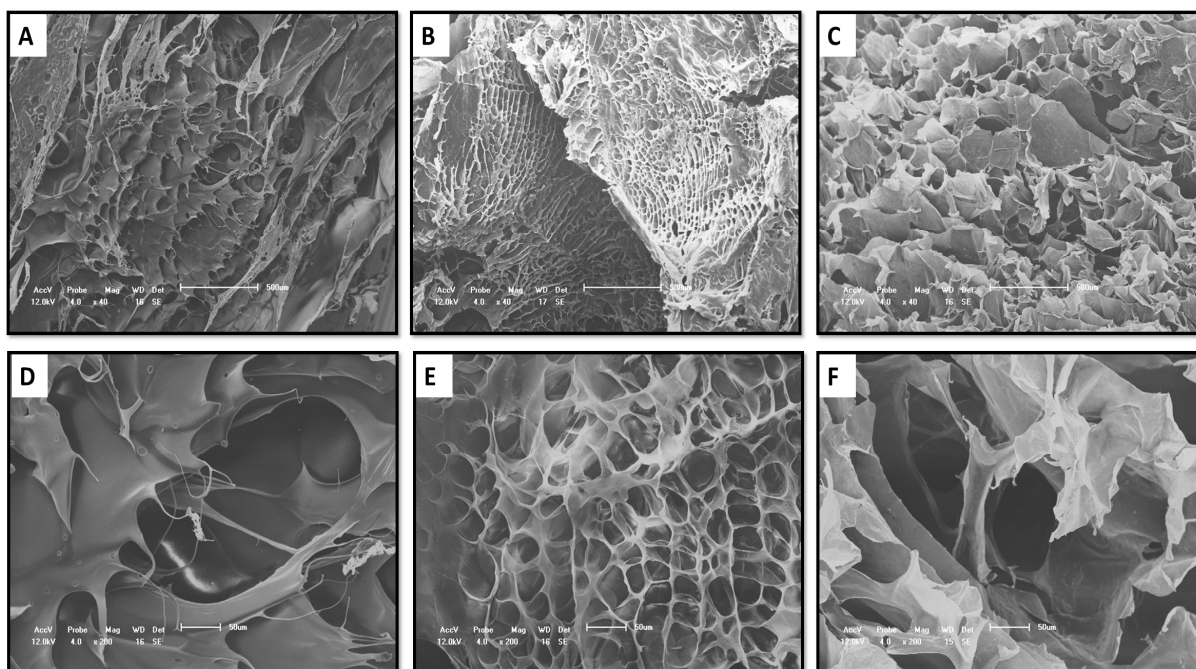


Figura 10. Fotomicrografia, obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das esponjas sem ácido úsnico (A e D), com ácido úsnico 1% (B e E), 5% (C e F). (Barra A, B, C = 500µm; D, E, F = 50µm)

De acordo, com a comparação das microscopias, as amostras de biopolímeros sem ácido úsnico (Figura 10; A e D), parecem apresentar com o maior diâmetro dos poros e uma disposição das fibras poliméricas mais heterogêneas, enquanto, as amostras incorporadas com ácido úsnico 1% (Figura 10; B e E) apresentam-se folheadas, com poros menores e mais definidos e disposições mais homogêneas das fibras poliméricas por todo material. Em contrapartida a fotomicrografia das esponjas com ácido úsnico 5% (Figura 10; C e F), exibiram maior adensamento da estrutura fibrilar com aumento regular no tamanho dos poros.

Pode-se destacar ainda que o diâmetro dos poros pode estar relacionado por outros fatores, por exemplo, a variação na velocidade de congelamento e viscosidade nos hidrogéis de biopolímero. Visivelmente, à medida que foi incorporado uma maior concentração de ácido úsnico, houve um aumento perceptível na viscosidade, fazendo com que os poros microscopicamente se apresentem mais abertos (RUBIRA *et al.*, 2009).

A fim de desenvolver esponjas eficazes para aplicações biomédicas, é essencial considerar suas propriedades mecânicas no contexto da sua aplicação. Matrizes utilizadas na engenharia de tecidos devem não só manter o crescimento das células, como também ser adequadamente robustas e flexíveis, de modo a suportar o trauma mecânico, associado à aplicação *in vivo* e permitir a aderência ao tecido em questão, conferindo conforto e comodidade para o paciente (LAI *et al.*, 2003).

Na Tabela 4 são apresentados os valores referentes às propriedades mecânicas mensurados nas esponjas. Os ensaios mecânicos de alongamento compreenderam a determinação do Módulo de Young, tensão e deformação.

As esponjas incorporadas com ácido úsnico apresentaram variações no comportamento mecânico à tração. A esponja incorporada com ácido úsnico 1% obteve a resposta inicial de caráter elástico (Módulo de Young = 2,3) antes da ruptura a uma deformação de 13%, ao passo que com a adição do fármaco a 5% foi observado uma maior força (tensão) necessária para uma menor deformação, modificando a resposta mecânica para o caráter plástico. Este efeito parece estar associado ao maior teor de sólidos presentes na solução polimérica (BILGAINYA, *et al.*, 2010; NANDAGIRI, *et al.*, 2011).

A adição de ácido úsnico não proporcionou diferença significativa ($p > 0,05$) na rigidez, quando as esponjas são submetidas a uma força de compressão, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades mecânicas das esponjas sem ácido úsnico (ALG/GEL) e com 1% (AU 1%) e 5% do fármaco (AU 5%).

	ALG/GEL	AU 1%	AU 5%
Módulo de Young (Mpa)	$6,7 \pm 2,8^a$	$2,3 \pm 1,1^a$	$21,1 \pm 6,0^b$
Tensão (Mpa)	$0,94 \pm 0,47^a$	$0,29 \pm 0,11^b$	$1,54 \pm 0,6^a$
Deformação (%)	$15,6 \pm 6,9^a$	$13 \pm 2,7^a$	$7,1 \pm 1,7^b$
Espessura (mm)	$0,507 \pm 0,04^a$	$0,651 \pm 0,175^a$	$0,625 \pm 0,07^a$
Rigidez à compressão (N/mm)	$0,100 \pm 0,02^a$	$0,223 \pm 0,13^a$	$0,221 \pm 0,13^a$
Densidade (g/cm³)	$0,0147 \pm 0,001^a$	$0,0134 \pm 0,001^b$	$0,0175 \pm 0,001^c$

Letras iguais na mesma linha não apresenta diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Estes dados estão de acordo ao observado nas imagens obtidas por MEV, onde as esponjas incorporadas com ácido úsnico apresentam uma rede de malha bem definida e homogênea, quando comparados às esponjas de biopolímeros.

A incorporação de ácido úsnico a 1% levou a obtenção de estruturas homogêneas com diâmetro de poros menor quando comparadas àquelas incorporadas com ácido úsnico a 5%, sugerindo a tendência ao comportamento elástico (BILGAINYA, *et al.*, 2010).

Em contrapartida, as esponjas incorporadas com ácido úsnico a 5% apresentaram estrutura fibrilar densa, porém mais heterogênea resultando em diminuição da resistência mecânica, devido a presença de zonas fracas na arquitetura fibrilar, o que pode permitir a ruptura (LAI *et al.*, 2003).

A densidade das esponjas (n=10), mostrou que a esponja à 1% apresentou uma densidade média menor que a esponja sem ácido úsnico e à 5% de AU. As interações entre as cadeias de polímeros e a superfície do fármaco em baixa concentração podem ter perturbado a rede de ligações de hidrogênio o que acarretou em redução da viscosidade, aumento do volume e consequentemente diminuição na densidade. (BILGAINYA *et al.*, 2010).

5.2. Avaliação do processo de cicatrização de esponjas de alginato/gelatina/ácido úsnico, em modelo animal

5.2.1 Análise da reação de granulação

Em sete dias, no grupo CTR (Figura 11; Ia) observou-se uma maior densidade na infiltração de leucócitos, predominantemente linfócitos, em toda extensão da ferida, associada a formação de uma moderada rede vascular, formada por capilares hiperemiados e regularmente distribuídos. De permeio, foi evidenciado leve a moderada proliferação de células ovaladas e fusiformes volumosas, interpretadas como fibroblastos ativos e/ou células endoteliais.

Ao mesmo tempo experimental, ambos os grupos ALG/GEL (Figura 11; Ib) e AU 5% (Figura 11; Ic) apresentaram reação de granulação caracterizada por maciça proliferação de células ovaladas e fusiformes, associadas à deposição de uma delgada e delicada malha colagênica, que parecia suportar uma rica rede vascular composta por capilares hiperemiados.

No presente estudo, a identificação de um componente fibrocelular mais evidente e de uma rede vascular mais desenvolvida nos grupos ALG/GEL e AU 5%, sugere que utilização de esponjas de alginato de sódio e gelatina em feridas abertas acelerou a formação de tecido de granulação mais maduro em sete dias.

De especial interesse, foi a observação de que o componente vascular da reação de granulação foi homogeneamente distribuído ao longo da ferida no grupo AU 5%, enquanto que no grupo ALG/GEL, a porção mais central e superior da ferida exibiu um padrão de neoformação vascular ainda inconspícuo.

Estudos anteriores demonstraram que soluções de baixa viscosidade de alginato de sódio são capazes de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da resposta imunológica, como a interleucina 6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), leucotrieno B4 (LTB4) e prostaglandina E2 (PGE2) (RAZAVI *et al.*, 2008).

Corroborando estes dados, relatos recentes indicaram que esponja de alginato de sódio, utilizada na cultura de macrófagos de origem murina, promoveu a redução dos níveis de IL-1 β e IL-6, liberadas por estes durante a avaliação *in vitro* dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, estimulada por lipopolissacarídeos (SEO *et al.*, 2012).

Desta forma, é possível sugerir que o uso deste polímero pode ser útil no controle da resposta imune, facilitando a instalação de fenômenos proliferativos que caracterizam a reação de granulação, a fase pós-inflamatória do reparo.

Em catorze dias, os grupos CTR (Figura 11; IIa) e ALG/GEL (Figura 11; IIb), ainda exibiam reação de granulação de moderada a intensa nas porções mais centrais da ferida, em detrimento de uma maior collagenização e menor infiltração inflamatória evidenciada nas margens cicatriciais. Contudo deve ser destacado que no grupo ALG/GEL o componente inflamatório se mostrou menos expressivo, ao passo que, o componente colagênico se apresentou mais aparente e disposto em fascículos paralelos em relação à superfície da ferida.

No grupo AU 5% (Figura 11; IIc), foi nítida a redução do componente inflamatório mesmo na porção central da ferida. Adicionalmente, observou-se uma marcante redução na rede vascular, especialmente quando comparado ao grupo CTR, acompanhada de um padrão homogêneo de collagenização em toda a extensão da cicatriz.

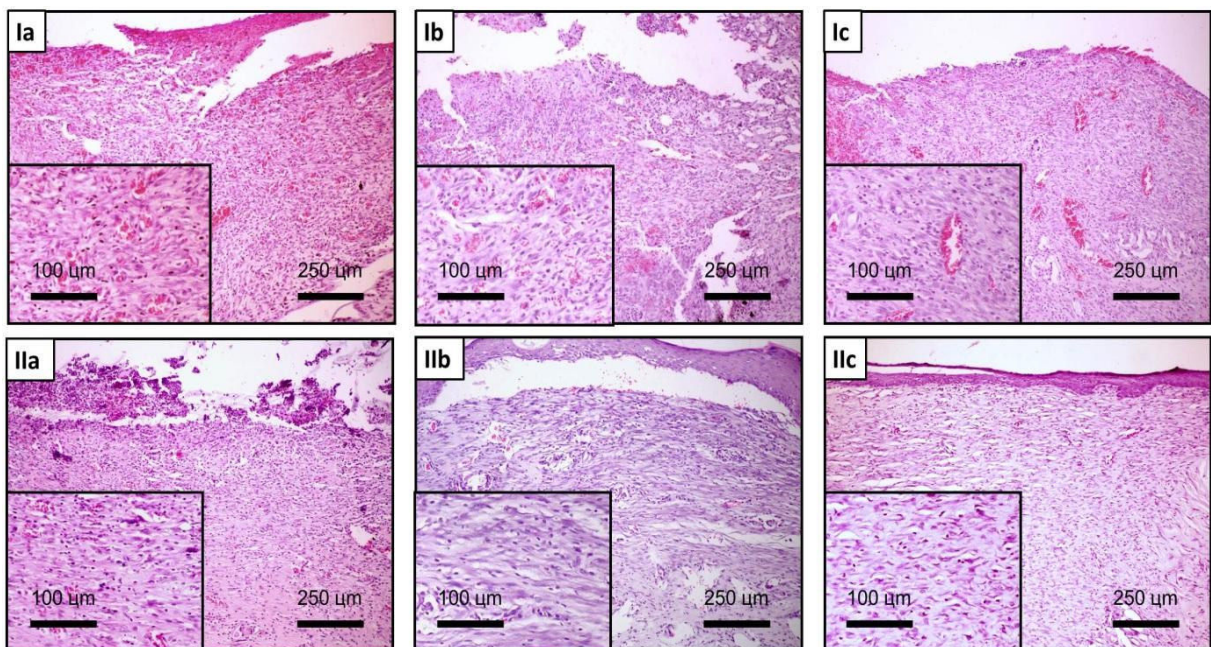


Figura 11. Secções histológicas coradas com hematoxilina-eosina. Sete dias: (Ia) Formação de rede vascular, composta por capilares hiperemiados e regularmente distribuídos no grupo CTR. (Ib) Reação de granulação com presença de células ovaladas e fusiformes, deposição de malha colagênica delgada e padrão vascular inconspícuo no grupo ALG/GEL. (Ic) Componente vascular distribuído de forma homogênea na extensão da ferida no grupo AU 5%. 14 dias: (IIa e IIb) Reação de granulação de moderada a intensa na porção central da ferida apresentada nos grupos CTR e ALG/GEL, respectivamente. (IIc) Redução do componente inflamatório e vascular no grupo AU 5%.

Foi evidenciado também um maior contingente inflamatório no grupo controle quando comparado aos grupos tratados com esponja (ASADA *et al.*, 1997). Suportando estes achados, um importante efeito inibitório do alginato de sódio sobre a degranulação de mastócitos, um fenômeno bioquímico intimamente associado ao recrutamento de leucócitos durante o reparo.

Neste estudo, o componente vascular da reação de granulação mostrou-se mais desenvolvido no grupo AU 5% que nos demais. Este parece ser o primeiro relato trazendo evidências de uma possível atividade angiogênica do ácido úsnico (AU). Contudo, é necessário enfatizar que este efeito biológico poderia não resultar de uma ação estimulatória direta do AU sobre células endoteliais, mas de um efeito indireto sobre outras etapas do reparo que favoreceriam o desenvolvimento do componente vascular da reação de granulação.

Suportando estes achados, Nunes *et al.* (2011) observaram que a utilização de filmes contendo ácido úsnico como curativos para queimaduras dérmicas, em modelo murino, acelerou a deposição e maturação do colágeno tipo III, uma molécula responsável pela orientação da migração de células endoteliais durante a fase de granulação.

Além disso, Francolini *et al.* (2004) demonstraram que o ácido úsnico foi capaz de impedir a formação de biofilmes bacterianos sobre superfícies poliméricas. Desta forma, a menor carga microbiana poderia reduzir o recrutamento quimiotático de leucócitos, permitindo a instalação precoce da reação de granulação.

A evidente redução do componente vascular e melhor organização da cicatriz fibrosa observados em AU 5% em 14 dias parecem suportar a teoria de que o AU tem uma ação mais efetiva sobre fibroblastos do que sobre o endotélio. Corroborando estes achados, Nunes *et al.* (2011) observaram nítida involução do contingente vascular e melhor resolução fibrosa da reação de granulação em animais tratados com ácido úsnico.

5.2.2 Análise do índice percentual de epitelização da superfície da ferida

Em sete dias, o índice de epitelização se mostrou ainda bastante heterogêneo em todos os grupos analisados. Embora, os grupos ALG/GEL e AU 5%, tenham exibidos valores percentuais médios de epitelização um pouco mais elevados que o grupo controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 12).

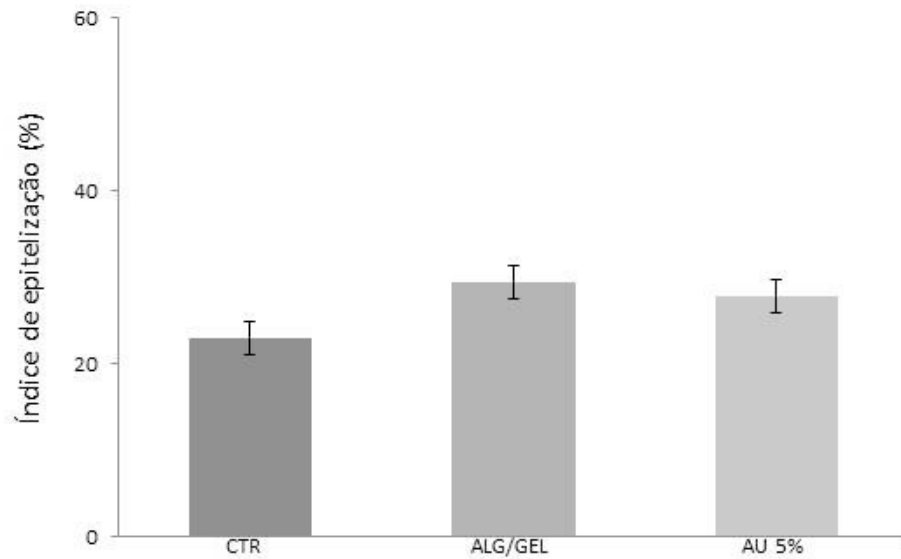


Figura 12. Percentual médio de epitelação da superfície da ferida em 7 dias. (CTR – controle; ALG/GEL – esponja sem ácido úsnico; AU 5% – esponja com ácido úsnico a 5%).

Já em catorze dias (Figura 13), o percentual médio de epitelação da superfície ferida foi significativamente menor no grupo controle que nos grupos ALG/GEL e AU 5% ($p < 0,01$), embora não tenha sido evidenciada diferença estatisticamente significativa entre esses dois últimos grupos ($p > 0,05$).

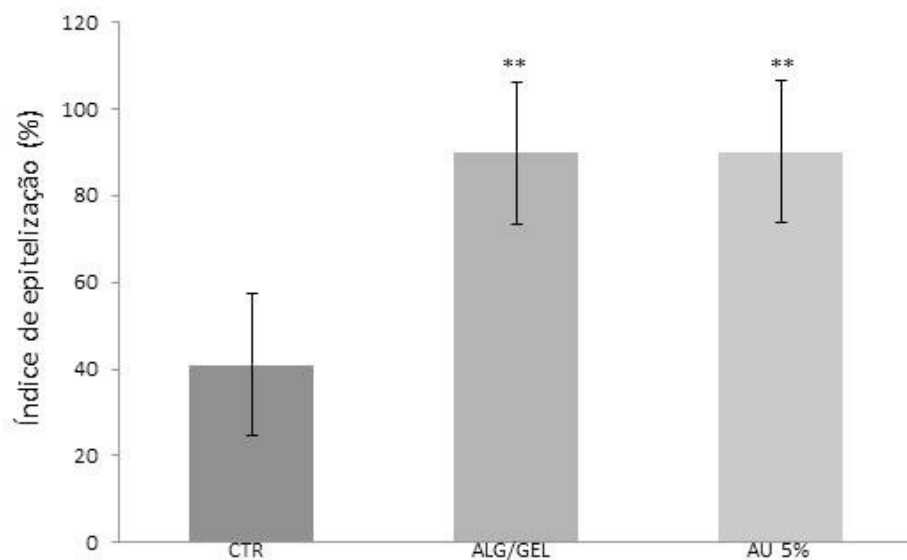


Figura 13. Percentual médio de epitelação da superfície da ferida em 14 dias. ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p = 0,000$).

Deve ser destacado, que em catorze dias, nos grupos tratados com a esponja, a espessura tanto da epiderme neoformada quanto da camada córnea se apresentou bastante variada, ora o epitélio se mostrando delgado e exibindo interface plana com tecido conjuntivo,

ora mais espesso e com pequenos brotamentos para o interior do conjuntivo, que mimetizavam rudimentos de anexos dérmicos (Figura 14).

Os dados obtidos na análise da epitelização da superfície da ferida sugerem que o tratamento com esponja de alginato e gelatina acelerou o processo de proliferação de ceratinócitos e reconstituição do revestimento epitelial dérmico. De fato, o papel do alginato como cofator para a produção de fator de crescimento epidérmico e consequente estímulo à proliferação de ceratinócitos (células epiteliais epidérmicas) já está bem definido desde a década passada (KAWADA *et al.*, 1997).

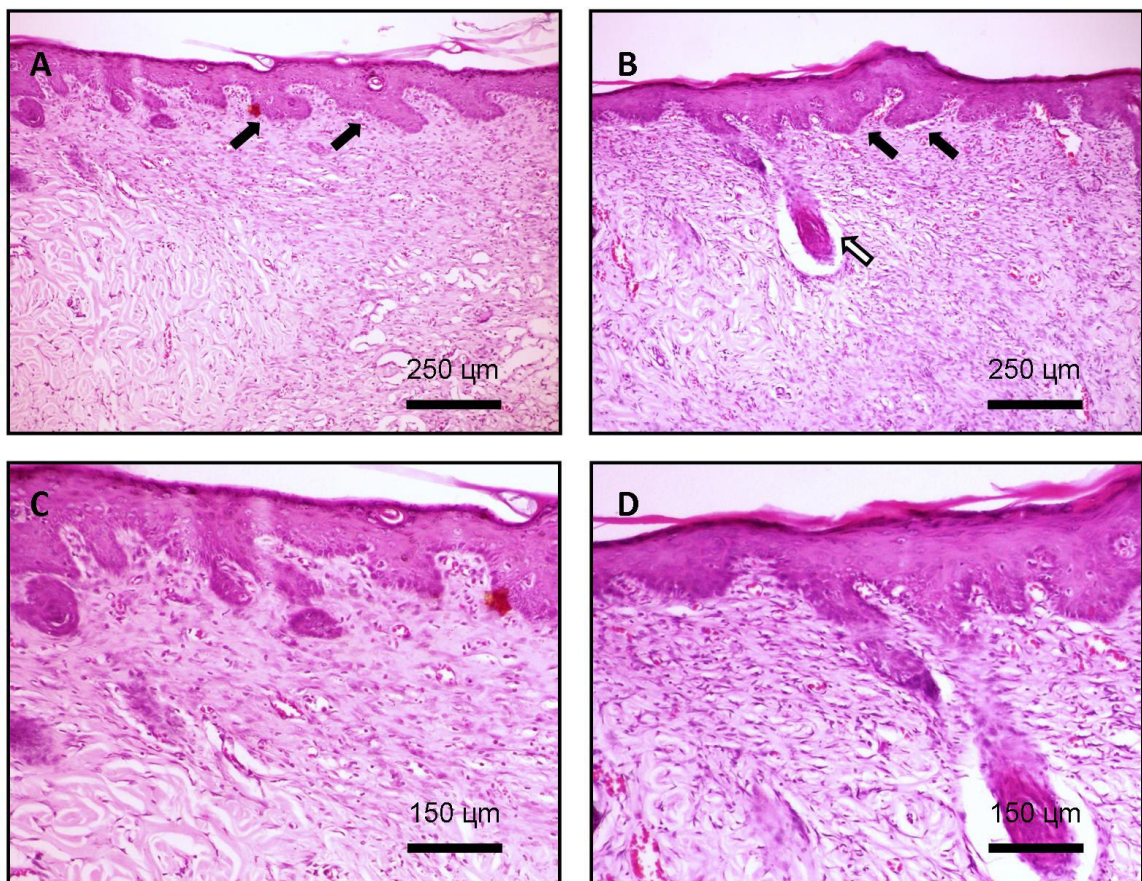


Figura 14. Secções histológicas coradas com hematoxilina-eosina: 14 dias. Epitélio neoformado apresentando pequenos brotamentos (setas pretas) e rudimentos de anexos dérmicos (seta branca) (A e C) ALG/GEL; (B e D) AU 5%.

Contudo, a incorporação do AU as esponjas não pareceu promover alterações substanciais no padrão de epitelização, corroborando relatos prévios de Nunes *et al.* (2011), realizados com filmes de colágeno contendo AU incorporados em lipossomas.

Estes dados parecem se contrapor àqueles publicados por Burlando *et al.* (2009), que verificaram um potente efeito estimulatório do AU sobre o fechamento de feridas, incluindo a recuperação do revestimento epitelial dérmico.

Este aparente paradoxo poderia estar relacionado ao fato de que, tanto no presente estudo quanto naquele relatado por Nunes *et al.* (2011), as moléculas de ácido úsnico provavelmente foram liberadas durante as primeiras 24 a 48h do processo cicatricial, na medida em que as formas farmacêuticas eram reabsorvidas.

Desse modo, ao ter início a fase de epitelização, não teria havido ação direta deste metabólito liquênico sobre os ceratinócitos a fim de estimular diretamente sua proliferação. No entanto, tais achados não devem ser interpretados de maneira negativa, uma vez que, sendo os ceratinócitos potenciais fontes de citocinas envolvidas na degradação e neossíntese do colágeno, um processo demasiadamente acelerado de epitelização poderia comprometer a dinâmica da remodelação fibrosa e resultar em cicatrizes antiestéticas.

5.2.3 Análise da deposição de colágeno

Em sete dias, conforme observado na Figura 15, a análise quantitativa da deposição de colágeno, revelou que o conteúdo de fibras colágenas foi significativamente menor no grupo CTR do que nos grupos ALG/GEL ($p < 0,001$) e AU 5% ($p < 0,01$), posto que não tenha sido evidenciada diferença estatisticamente significativa entre esses dois últimos grupos ($p > 0,05$).

O mesmo padrão quantitativo de collagenização se repetiu no tempo de catorze dias (Figura 16), embora os grupos ALG/GEL ($p < 0,05$) e AU 5% ($p < 0,01$) apresentassem uma quantidade de colágeno significativamente maior que o grupo CTR, novamente não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com a esponja.

No sétimo dia, em todos os grupos apresentaram predominância de fibras de colágeno exibindo marcante birrefringência alaranjada (colágeno tipo I), organizadas em um padrão arquitetural reticular, associadas à grande quantidade de espaços interfibrilares. Individualmente, as fibras se apresentavam delgadas e delicadas, levemente onduladas, e exibiam comprimento variável.

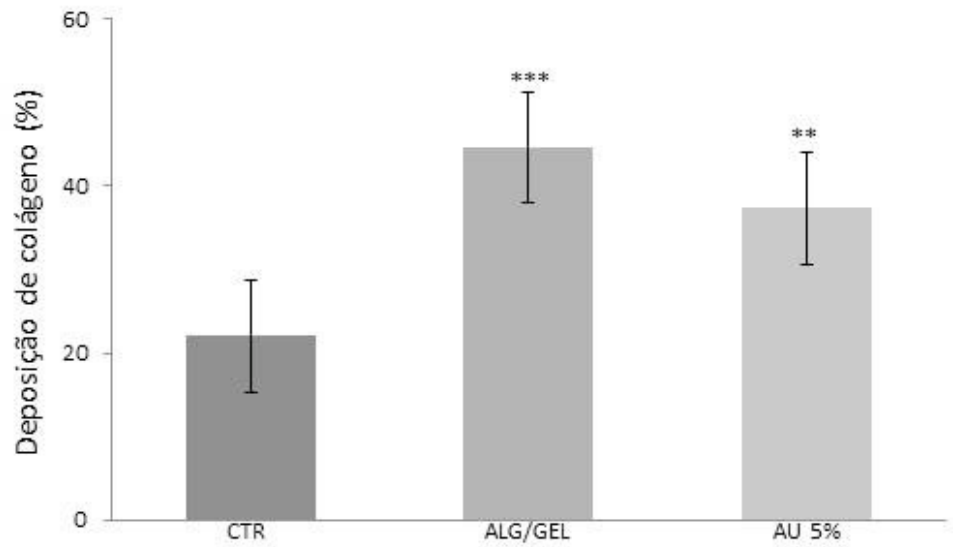


Figura 15. Análise quantitativa da contagem de colágeno em 7 dias. (CTR – controle; ALG/GEL – esponja sem ácido úsnico; AU 5% – esponja com ácido úsnico a 5%). *** Diferença significativa para o grupo CTR ($p < 0,001$); ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p < 0,01$).

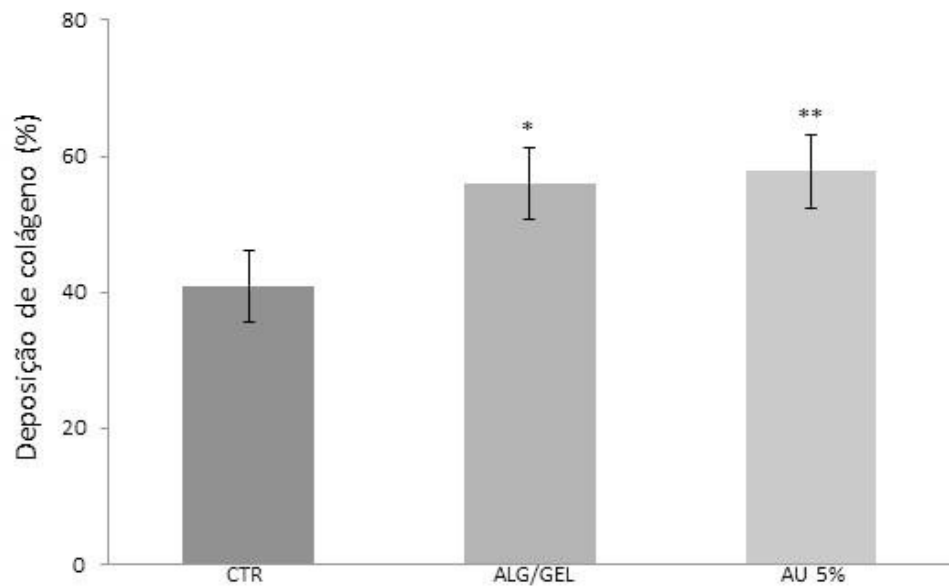


Figura 16. Análise quantitativa da contagem de colágeno em 14 dias. ** Diferença significativa para o grupo CTR ($p < 0,01$); * Diferença significativa para o grupo CTR ($p < 0,05$).

Os grupos CTR e ALG/GEL exibiram padrões morfológicos bastante similares, caracterizados por maior adensamento das fibras nas margens e base da ferida e hipocolagenização das áreas mais centrais (Figura 17; A e 17; B, respectivamente). O grupo AU 5%, por outro lado, apresentou maior homogeneidade na distribuição das fibras colágenas em toda a extensão da ferida (Figura 17; C).

No décimo quarto dia, observou-se, no grupo CTR, maior densidade de deposição colagênica, com feixes mais espessos e grosseiros de colágeno tipo I, ora ondulados ora

estirados, organizados em um padrão predominantemente paralelo à superfície da ferida. Os espaços interfibrilares se mostravam reduzidos, embora a porção mais central da ferida ainda se apresentasse hipocolagenizada em comparação às margens e base (Figura 17; D).

O grupo ALG/GEL, apesar de exibir um arranjo arquitetural semelhante, apresentou feixes de colágeno I menos espessos e com aparência menos grosseira na base e margens da ferida quando comparados a CTR (Figura 17; E).

O grupo AU 5%, por sua vez, manteve a característica de uma colagenização mais homogênea em toda a extensão da ferida, exibindo a deposição de fibras delgadas ora curtas ora longas, levemente onduladas e dispostas paralelamente (Figura 17; F).

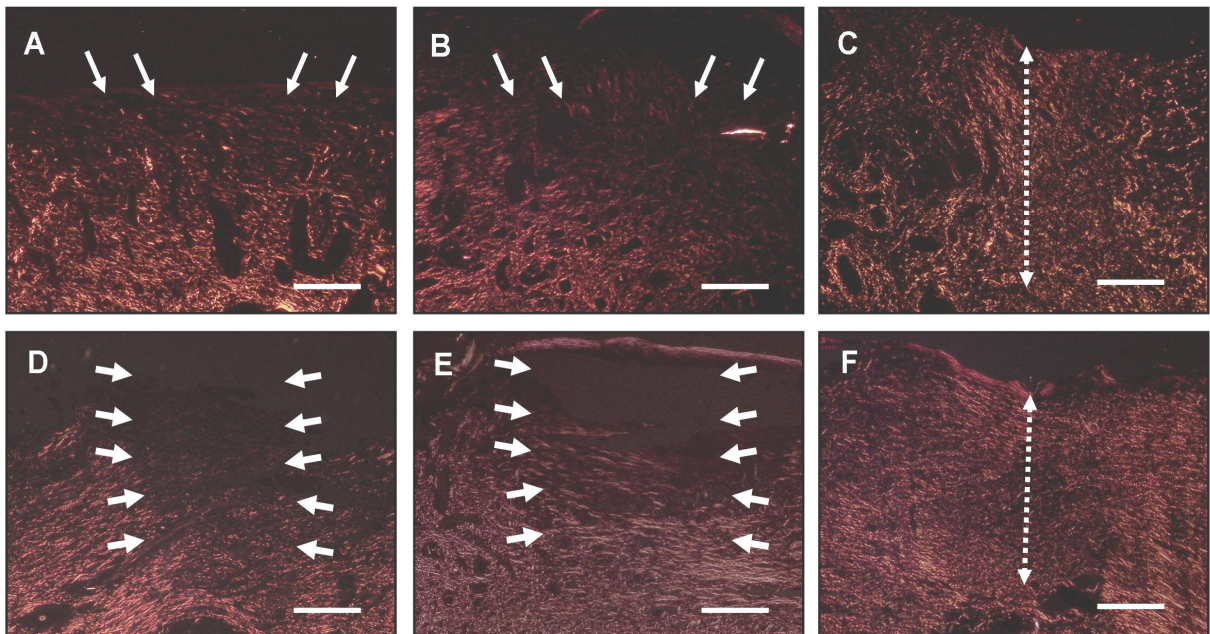


Figura 17. Deposição feixes delgados de colágeno tipo I em arranjo reticular em sete (A, B e C) e paralelo em 14 dias (D, E e F). Notar hipocolagenização (setas cheias) no centro das feridas em CTR (A/D) e ALG/GEL (B/E), e disposição homogênea do colágeno (setas pontilhadas) em AU 5% (C/F). (Picrossírius/polarização. Barra = 250 μ m).

No tecido dérmico normal, é possível observar a presença de dois subtipos de colágeno fibrilar, denominados colágeno I e III. O colágeno tipo I forma fibras de espessura variável, dispostas paralela ou entrelaçadamente, com birrefringência amarelo-alaranjada e avermelhada, enquanto o colágeno de tipo III forma fibras delgadas constituída de fibrilas delicadas, frouxamente dispostas mostrando uma fraca birrefringência de coloração esverdeada e amarelo-esverdeadas quando analisado pela Picrossírius-polarização (DANTAS FILHO *et al.*, 2007).

Durante a formação do processo cicatricial, o colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo substituído por tipo I à medida que ocorre maturação do tecido

cicatricial (CARNEIRO *et al.*, 2005). Esse processo tem grande relevância para a resistência dérmica na área cicatricial, posto que o aumento na relação entre colágeno tipo I e tipo III é determinante para a força tênsil e estabilidade mecânica do tecido conjuntivo (FRIEDMAN *et al.*, 1993).

A predominância de colágeno tipo I em todos os grupos sugere, portanto, um estágio avançado de cicatrização, onde já ocorreu a substituição do padrão jovem da derme papilar (rica em colágeno tipo III) por um tecido fibroso em maturação (rico em colágeno tipo I).

Relatos prévios de Nunes *et al.* (2011), indicam que a análise da disposição das fibras e fibrilas também constitui uma variável importante na análise da dinâmica do reparo, predominando, inicialmente, um padrão reticular, em razão da presença de uma rica rede vascular associada ao desenvolvimento da reação de granulação.

Posteriormente, à medida que aumenta o conteúdo de colágeno tipo I, as fibras assumem um arranjo paralelo à superfície da ferida, a fim de facilitar o fenômeno de contração cicatricial; finalmente, ocorre um gradual rearranjo na arquitetura colagênica, as fibras passando a exibir uma organização entrelaçada, que propicia maior resistência mecânica à cicatriz fibrosa.

Desta forma, a disposição reticular das fibrilas em sete dias, também evidenciada em outros estudos (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; DANTAS *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2011), é um forte indicativo de que, apesar de ter havido a deposição de colágeno tipo I, o processo de remodelação ainda está nas fases iniciais, ao passo que o arranjo paralelo visto em 14 dias sugere uma evolução adequada do reparo, aparentemente facilitando a contração da ferida.

Por outro lado, a maior condensação fibrosa nas margens e base das feridas, evidenciada nos grupos CTR e ALG/GEL, em detrimento da distribuição mais homogênea das fibras de colágeno tipo I observada em AU 5%, tanto em sete quanto em catorze dias, sugere que o ácido úsnico parece exercer algum efeito estimulatório sobre a síntese de colágeno. Achados similares foram relatados por Nunes *et al.* (2011), utilizando AU veiculado em vesículas lipossomais, incorporadas em filmes de colágeno bovino.

A análise quantitativa do colágeno depositado indicou que a esponja sem o fármaco parece ter maior atividade pró-fibroplásica do que aquela incorporada com ácido úsnico, corroborando relatos prévios de Dantas *et al.* (2011).

De fato, o maior componente fibroso evidenciado nos grupos ALG/GEL e AU 5% sugere um possível efeito modulatório do alginato sobre a colagenização. No entanto,

NAGAKURA *et al.* (2005) verificaram um efeito inibitório do alginato de sódio sobre a fibroplasia *in vitro*.

Portanto, é possível especular que o efeito biológico poderia ser resultado de um efeito indireto, resultante da redução da infiltração inflamatória e facilitação da instalação da fase proliferativa do reparo.

Contudo, é importante ressaltar que em nenhum dos animais que compunham os grupos ALG/GEL ou AU 5% foi evidenciada excessiva deposição colagênica, indicando que, dentro dos parâmetros propostos neste experimento, o uso das esponjas de alginato, contendo ou não ácido úsnico, não levou à hipercolagenização patológica características das quelóides ou cicatrizes hipertróficas.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados da caracterização físico-química demonstraram que fármaco foi incorporado ao sistema de forma eficiente e indicando que o mesmo não sofreu degradação química durante o processo de fabricação das esponjas;

- A esponja incorporada com ácido úsnico 5%, apresentou menor resistência mecânica, corroborando com a observação microestrutural que mostrou a presença de uma estrutura de malha fibrilar densa e heterogênea, porém o aumento regular dos poros parece sugerir um melhor perfil de liberação do produto incorporado, por facilitar a permeação do solvente.

- O uso de esponja de alginato e gelatina favorece a cicatrização de feridas, onde sugere-se que este benefício esteja relacionado à modulação de alguns dos eventos biológicos envolvidos neste processo, tais como a reação de granulação, epitelização e deposição de colágeno. Além disso, a incorporação de ácido úsnico, nas esponjas proporcionou uma disposição mais homogênea do colágeno, facilitando aparentemente a contração da ferida, evitando a formação de cicatrizes antiestéticas.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E. R.; ALVES, E. F. Análise da produção bibliográfica sobre qualidade de vida de portadores de feridas crônicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 147-152, 2011.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. ; BARRETO, A.L.S. ; PIRES, J. A.; REIS, F.P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M. A. G. ; CARDOSO, J.C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**. v. 27, p. 1105-1110, 2009.
- ALEMDAROĞLU, C.; DEĞİM, Z.; ÇELEBI, N.; ZOR, F.; ÖZTÜRK, S.; ERDOĞAN. D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v.32, n.3, p. 319-327, 2006.
- ALMEIDA, J. F. S. L. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. 2010. 271 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade de Coimbra. Coimbra, 2010.
- ASADA, M.; SUGIE, M.; INOUE, M.; NAKAGOMI, K.; HONGO, S.; MURATA, K.; *et al.* Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. **Biosci Biotech Biochem**. v. 61, n. 6, p. 1030-2, 1997
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S.; **Chemistry of Lichen Substances**; Japan Society from the Promotion of Science; Tokyo, 1954.
- ASKELAND, D.; PHULÉ, P. **The Science and Engineering of Materials**. Thomson, Toronto. pp. 863, 2006.
- BILGAINYA, R.; FARID, K.; STEPHEN, M. Spontaneous patterning and nanoparticle encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges. **Materials Science and Engineering C**, v.30, p. 352–356, 2010.
- BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BURLANDO, B.; RANZATO, E.; VOLANTE, A.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F.; VEROTTA, L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta Med.**, v.75, n. 6, p. 607-13, 2009.

- BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev Bras Fisioter**, v. 14, n.1, p. 45-51, 2010.
- CARLUCCI, V. D. S.; ROSSI, L. A.; FICHER, A. M. F. T.; FERREIRA, E.; CARVALHO, E. C. A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. **Rev Esc Enferm USP**. v.41, n.1, p.21-8, 2007.
- CARNEIRO, C. G.; SENNES, L. U.; SALDIVA, P. H. N.; TSUJI, D. H.; XIMENES FILHO, J. A. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. **Rev Bras Otorrinolaringol**. v. 71, n. 2, p. 798-802, 2005.
- CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v.36, p. 155–161, 2005.
- CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento Dinâmico-Mecânico e Relaxações em Polímeros e Blendas Poliméricas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.
- CENSI, R.; DI MARTINO, P.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 680-692, 2012.
- CHARLESWORTH, T. M.; AGTHE, P.; MOORES, A.; ANDERSON, D. M. The use of haemostatic gelatin sponges in veterinary surgery. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 1, p. 51-56, 2012.
- CHOI, Y. S.; HONG, S. R.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H.; NAM, Y. S. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. **Biomaterials**, v.20, p.409-417, 1999.
- CHOI, Y. S.; LEE, S. B.; HONG, S. R.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H. Studies on gelatin-based sponges. Part III: A comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.12, p.67-73, 2001.
- CONDE, L. M. S. **Polímeros naturais para aplicações biomédicas**. 2011. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química Medicinal). Universidade do Minho. Braga, 2011.

- DAI, M.; ZHENG, X.; XU, X. *et al.* Chitosan-Alginate Sponge: Preparation and Application in Curcumin Delivery for Dermal Wound Healing in Rat. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1-9, 2009.
- DANTAS FILHO, A. M.; AGUIAR, J. L. A.; ROCHA, L. R. M.; AZEVEDO, I. M.; RAMALHO, E.; MEDEIROS, A. C. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 22, n. 1, p. 64-71, 2007.
- DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAUJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by associating sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 6, p. 1-9, 2011.
- DEMLING, R. H.; WAY, L. W. **Queimaduras e outras lesões térmicas**. In: Way L.W.(ed), Cirurgia: diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: p.170-80, 1993.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, C. M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v.9, p.283-89, 2004.
- DINO, R. G.; SERRA, M. C.; MACIEIRA, L. **Queimaduras no Brasil**. In: Condutas atuais em queimaduras. Revinter. Rio de Janeiro: p.1-3, 2001.
- DORNELAS, C. B.; RESENDE D. K.; ROCHA, H. V. A.; GOMES, A. S.; TAVARES, M. I. B. COUTINHO, S. S. S.; CABRAL, L. M. Avaliação de derivados poliméricos intercalados em montmorilonita organofílica na preparação de novos materiais de uso farmacêutico. **Polímeros**. v.18, n.3, p.222-229, 2008.
- ELBERT, D. L. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 31-56, 2011.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M. E. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Physiology and Biochemistry**, v.116, p.51-54, 1997.
- FRANCOLINI, I.; NORRIS, P.; PIOZZI, A.; DONELLI, G.; STOODLEY, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 48, n. 11, p. 4360, 2004

FRIEDMAN, D. W.; BOYD, C.; MACKENZIE, J. W.; NORTON, P.; OSLOM, R. M.; BEAK, S. M. Regulation of collagen in keloids and hypertrophic scars., **J Surg Res.** v. 134, p. 1019-1025, 1993.

GALLOWAY, D. J. **Lichen biogeography.** in: Nash III, T.H. (ed.). Lichen biology. University Press, Cambridge. Great Britain: p. 199-216, 1996.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, 2011.

GROENEWOLD, M. D.; GRIBNAU, A. J.; UBBINK, D. T. Topical haemostatic agents for skin wounds: a systematic review. **BMC surgery**, v. 11, n. 1, p. 15, 2011.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional.** 3 ed. São Paulo: Manole, 2002.

HIBBELER, R. **Mechanics of Materials.** Pearson Education, Inc., New Jersey. pp. 873, 2003.

HO, M. H.; KUO, P. Y.; HSIEH, H. J.; HSIEN, T. Y.; HOU, L. T.; LA, J. Y.; WANG, D. M. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. **Biomaterials**, v.25, p. 129–138, 2004.

HUANG, Z.; ZHENG, G.; TAO, J.; RUAN, J. Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Usnic Acid. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.** p. 1-5, 2011.

HÜNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances.** Springer, Berlin: p.493,1996.

HWANG, C. M.; SANT, S.; MASAELI, M. *et al.* Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering. **Biofabrication**, v. 2, n. 3, p. 035003, 2010.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry.** v.61: p.729-736, 2002.

IONASHIRO, M. “**Giolito. Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**”. 1ª ed., 96 p. São Paulo, 2004.

KÄFFER, M. I.; CÁCERES, M. E. S.; VARGAS, V. M. F.; MARTINS, S. M. A. Novas ocorrências de líquens corticícolas crostosos para a região sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 948–951, 2010.

KATAOKA, K.; SUZUKI, Y.; OHNISHI, K.; SUZUKI, K.; TANIHARA, M.; IDE, C.; ENDO, K.; NISHIMURA, Y. Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhanced elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. **J. Biomed. Mat. Res.** v.54: p.373-384, 2001.

KO, H.-F.; SFEIR, C.; KUMTA, P. N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1917, p. 1981-1997, 2010.

KOTAGALE, N. R.; PATEL, C. J.; PARKHE, A. P. *et al.* Carbopol 934-Sodium Alginate-Gelatin Mucoadhesive Ondansetron Tablets for Buccal Delivery: Effect of pH Modifiers. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 4, p. 471-479, 2010.

KUMAR, M. S.; KIRUBANANDAN, S.; SRIPRIYA, R.; SEHGAL, P. K. Triphala Incorporated Collagen Sponge—A Smart Biomaterial for Infected Dermal Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v. 158, n. 1, p. 162-170, 2010.

LAI, H. L.; ABU'KHALIL, A.; CRAIG, D. Q. M. The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 251, p. 175-181, 2003.

LEE, K. G.; KWEON, H. Y.; YEO, J. H.; WOO, S. O.; LEE, J. H.; PARK, Y. H. Structural and physical properties of silk fibroin/alginate blend sponges. **Journal of Applied Polymer Science**, v.93, p.2174–2179, 2004.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; PEREIRA, E. C.; FILHO, X. L.; ALVES R. S. **Importância econômica dos liquens para o homem**. In: Xavier-Filho, L.; Legaz, M. E.; Vicente, C.; Pereira, E. C. (eds.). *Biologia de liquens. Âmbito Cultural Edições LTDA.*: p.581-619, 2006.

LI, Y.; JIA, H.; CHENG, Q.; PAN, F.; JIANG, Z. Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. **Journal of Membrane Science**. v.375, p. 304–312, 2011

LOPES, A. C. T. **Desenvolvimento de Compósitos Poliméricos baseados em Zeólitos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade do Minho. Guimarães, 2009.

LOUDEN, D.; INDERBITZIN, S.; PENG, Z.; DE NYS, R. Development of a new protocol for testing bath sponge quality. **Aquaculture**. v. 271, p. 275–285, 2007.

McDOUGALL, S.; DALLON, J.; SHERRATT, J.; MAINI, P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. **Philos Transact A Math Phys Eng Sci.** v.364 n.1843, p.1385-405, 2006.

MENDONÇA, F. A. S.; PASSARINI JUNIOR, J. R.; ESQUISATTO, M. A. M. *et al.* Effects of the application of Aloe vera (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 150–155, 2009.

MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 8, p. 5428-5448, 2011.

MORRISON, R.; BOYD, R. “**Química Orgânica**”. Fundação Calouste Gulbenkian, 15^a ed., Lisboa, 2009.

NAGAKURA T, HIRATA H, TSUJII M, SUGIMOTO T, MIYAMOTO K, HORIUCHI T, NAGAO M, NAKASHIMA T, UCHIDA A. Effect of viscous injectable pure alginate sol on cultured fibroblasts. **Plast Reconstr Surg.** v. 116, n 3, p. 831-8, 2005.

NANDAGIRI, V. K.; GENTILE, P.; CHIONO, V. *et al.* Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan–gelatin scaffolds: Influence on the physical properties and cell behavior. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1318-1327, 2011.

NARINE, K.; WEVER, D. O.; VALCKENBORGH, V. V. D.; FRANCOIS, K.; BRACKE, M.; SMET, D.S.; MAREEL, M.; NOOTEN, V.G. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. **Tissue Eng.** v.12, n.10, p.2707-16, 2006.

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

NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R. R.; DANTAS, M. D. M.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; SOUZA, J. C. C.; SERAFINI, M. R.; QUITANS-JR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, p.1-9, 2011.

- NUNES, P. S.; BEZERRA, M. S.; COSTA, L. P. *et al.* Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 1011-1014, 2010.
- ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.59–65, 2006.
- RABELO, T.K., ZEIDÁN-CHULIÁ, F., VASQUES, L.M., SANTOS, J.P.A.A., ROCHA, R.F., PASQUALI, M.A.B., RYBARCZYK-FILHO, J.L., ARAÚJO, A.A.S., MOREIRA J.C.F., GELAIN D.P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in vitro**, v. 26, 304–314, 2012.
- RAZAVI, A.; KHODADADI, A.; ESLAMI, M. B.; ESHRAGHI, S.; MIRSHAFIEY, A. Therapeutic effect of sodium alginate in experimental chronic ulcerative colitis. **Iran J Allergy Asthma Immunol**. v.7, n. 1, p. 13-8, 2008.
- RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; GUILHERME, M. R.; PAULINO, A. T.; TAMBOURGI, E. B. Morfologia de hidrogéis-ipn termo-sensíveis e ph-responsivos para aplicação como biomaterial na cultura de células. **Polímeros**. v.19, n.2, p.105-110, 2009.
- SANTOS, N. P. **Nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* (Vainio) com potencial ação antitumoral**. 2003, 149 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.
- SANTOS, R. J. V. dos. **Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular**. 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- SCHMITT, I.; LUMBSCH, H. T. Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.33, p.43–55, 2004.
- SEO, S. Y.; LEE, G. H.; LEE, S. G.; JUNG, S. Y.; LIM, J. O.; CHOI, J. H. Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ. **Carbohydrate Polymers**, p.1-7, 2012.
- SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361–368, 2011.

- SUÁREZ-GONZÁLEZ, D.; BARNHART, K.; SAITO, E. *et al.* Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 1, p. 222-234, 2010.
- SWAMY, B. Y.; PRASAD, C. V.; REDDY, C. L. N. *et al.* Preparation of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) blend microspheres for controlled release applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 1, p. 555-561, 2012.
- SZYNKOWSKA, M. I.; PAWLACZYK, A.; ROGOWSKI, J. ToF-SIMS and SEM-EDS analysis of the surface of chosen bioindicators. **Applied Surface Science**, v.255, p.1165–1169, 2008
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. Suppl_3, p. 311-324, 2009.
- TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.82, n.2, p.141-149, 2007.
- VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.
- VINJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M. K.; PARVATHAVARTHNI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflamatory activity of (+) – usnic acid. **Fitoterapia**, v.71, p.564-566, 2000.
- VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. 2004, 77p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Universidade de São Paulo, 2004.
- WANG, Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 842-847, 2010.
- WANG, T.; ZHU, X.-K.; XUE, X.-T.; WU, D.-Y. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 75-83, 2012.
- WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPF, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytotherapy**, v.14, p. 508–516, 2007.
- WILD, T.; RAHBARNIA, A.; KELLNER, M.; SOBOTKA, L.; EBERLEIN, T. Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition**, v.26, p. 862–866, 2010.

YAO, R.; ZHANG, R.; LUAN, J.; LIN, F. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. **Biofabrication**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2012.

ZENG, Q.; CHEN, W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin–oxidized alginate hydrogel. **Biomaterials**, v. 31, n. 22, p. 5772-5781, 2010.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 5, p. 607-626, 2011.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação de esponjas de alginato-gelatina-ácido úsnico sobre a cicatrização em ratos"**, sob coordenação do Prof^a. Dr^a. Francilene Amaral da Silva (protocolo CEPA 81/2010), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 15/02/2011.

São Cristóvão, 15 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Dr^a. Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

ANEXO II

Artigo submetido ao periódico Current Applied Physics

Usnic acid incorporated alginate and gelatin sponges prepared by freeze-drying for biomedical applications

Carla F.S. Cruz¹, Aldino N.P. Neto¹, Mairim R. Serafini¹, Paula P. Menezes¹, Charlene R.S. Matos², Gabriel F. Silva³, Juliana C. Cardoso⁴, Francilene A. Silva¹, Pedro J. Rolim-Neto⁴, Larissa R. Rolim, Adriano A.S. Araújo¹

¹*Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil,*

²*Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil*

³*Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil,*

⁴*Instituto de Tecnologia e Pesquisa-ITP, Aracaju, Brasil.*

⁵*Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

*Corresponding author:

Departamento de Fisiologia – Universidade Federal de Sergipe, Address: Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária, 49000-100, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. E-mail: farmsilva@uol.com.br, Tel./ Fax: 55-11-21056640

Abstract

Sponges composed of sodium alginate and gelatin were prepared via a freeze drying process in order to assess the utility of mixed sponges as potential wound dressings or matrices for tissue engineering. The results of scanning electron microscopy (SEM) showed that freezing temperature had a significant effect on the structure and density of sponges. SEM views of the sponges demonstrated that they have pores with mean diameters of 180-280 mm.

Key-words: *bioactive sponges, usnic acid, biopolymers.*

1. Introduction

Sponges may be defined as dispersions of gas (usually air) in a solid matrix [1]. There has been considerable recent interest in the use of sponges within the pharmaceutical and biomedical arena, particularly as matrices for controlled drug delivery, as wound dressings and as matrices for cell growth within the tissue engineering field [1].

Natural polymers have similar components with native extracellular matrices (ECM) and are widely used for biomedical applications. Gelatin and chitosan derivatives are among the most frequently used biomaterials due to their biocompatibility. Gelatin is obtained by a controlled hydrolysis of the fibrous insoluble protein, collagen, which is widely found in nature and is the major constituent of skin, bones and connective tissue, has always been used together with chitosan to prepare composite film for biomedical applications for its low cost and excellent functional and filmogenic properties [3-5]. Besides, gelatin is of advantage to absorb excess exudates because of its excellent ability to absorb water more than 5–10 times as weight as itself. However, gelatin is generally crosslinked by chemical methods, which inevitably use toxic crosslinkers or initiators, and therefore cause a cytotoxicity problem. Besides, gelatin hydrogels have certain drawbacks which are unfavorable for wound healing, i.e. insufficient flexibility and water absorption capacity.

Alginate, an anionic polymer, widely used as an instant gel for bone tissue engineering, is biocompatible, hydrophilic, and biodegradable under normal physiological conditions [7-9].

Usnic acid is one of the most common and abundant lichen metabolites. It has been previously shown that usnic acid has antiviral [3], antibiotic [16], antiprotozoal [13], antitumoral [17], anti-inflammatory, antipyretic and analgesic [18], dermal Burn healing [11], gastroprotective and antioxidante and hepatotoxic activities [10].

The aim of this study was to prepare a alginate/gelatin sponge constituted of usnic acid and to evaluate its characterization physico-chemical using differential thermal analysis (DTA), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) and infrared spectroscopy (FTIR). Sponges were also characterized regarding microstructure using scanning electron microscopy (SEM).

2. Material and methods

2.1 Materials

Usnic acid, 2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzenofurandione and alginate were purchased from Sigma. All chemicals were of reagent grade.

2.2 Preparation of gelatin/alginate sponges

The gelatin and sodium alginate powders were dissolved in distilled water to prepare a polymer solution, 1% (w/v) and, separately, UA was dissolved in 10 mL of dioxane to prepare concentrations of 1 and 5% (w/v). The mixtures were stirred at 50°C for 4 h. 50 mL of polymer solution was added to each concentration of UA, keeping the mixture under stirring at 50°C for 24h. After this, the solution was placed in plastic molds and frozen at -20°C for 24 hours. The frozen hydrogel were lyophilized at -80°C for 24h.

2.3 Scanning electron microscopy (SEM)

The dried films were mounted on aluminum stubs, coated with a thin layer of gold and visualized with a JEOL Model JSM-6360-LV scanning electron microscope, at an accelerated voltage of 20 kV.

2.4 Mechanical properties

The mechanical properties of the sponges were determined by conducting compression tests using a texture analyzer (TMS-PRO, Food Technology Corporation, USA) equipped with a 1kN load cell. The compression tests were performed on the hydrogel cylinders (10mm in diameter and 10mm in thickness, prepared by 30 kGy irradiation) at a constant strain rate of

1 mm/s. Compressive modules of the hybrid hydrogels were determined by the average slope of the stress–strain curve over the strain range of 0–5%. Data from each sample was calculated using triplicate measurement.

2.5 Determination of Usnic Acid content by UV spectrophotometric method

The UA content were determined by UV spectrophotometric method described by Nunes *et al.* (2011). The analysis was performed in a Shimadzu UV 1800 spectrophotometer.

2.5.1 Usnic Acid Standard Solution

A methanolic primary stock solution of UA (5.0 mg) was prepared in methanol. All the measurements were performed at room temperature. The standard solutions were prepared by the proper dilution of the primary stock solution with methanol to obtain working standard. The absorbances of these solutions were fitted in the calibration curve to calculate the accuracy and precision of the method.

2.5.2 Sample preparation for spectrophotometric analysis

To extract the sponges were cut in units of 1mm³.The sponges were diluted in methanol to volumetric flasks of 20 ml. The mixture was stirred for 5 min and sonicated for 5 min. Finally, the mixture was and diluted with methanol for drug assay by ultraviolet spectrophotometry at 290 nm. All samples were performed in triplicate for each sponge.

2.6 Thermal analysis

DSC curves were obtained in a DSC-50 cell (Shimadzu) using aluminium crucibles with about 2 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min⁻¹) and heating rate of 10°C.min⁻¹ in the temperature range from 25 to 600°C. The DSC cell was calibrated with indium (m.p. 156.6°C; H_{fus} = 28.54 J.g⁻¹) and zinc (m.p. 419.6°C). TG/DTG curves were obtained with a thermobalance model TGA 50 (Shimadzu) in the temperature range 25 – 900°C, using platinum crucibles with ~3 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere

(50 mL.min⁻¹) and heating rate of 10°C.min⁻¹. TG/DTG was calibrated using a CaC₂O₄.H₂O standard in conformity to ASTM.

2.7 Infrared spectroscopy (FTIR)

The infrared absorption spectra were obtained at room temperature in the range 4000 - 400 cm⁻¹ in KBr pellets using a PerkinElmer spectrophotometer.

3. Results and discussion

3.1 Macroscopic characteristic of sponges and pore structure

Initial inspection of the sponges indicated that all had flexible textures, as shown in Fig. 1, with considerable bending possible prior to fracture. Given the necessity of a combination of mechanical robustness and flexibility that will inevitably be required for in vivo applications, these initial indications were considered to be promising.

INSERT FIG 1

In order to further elucidate the relationship between the composition and the mechanical properties, the sponges were examined using SEM.

The porous structure of our scaffolds was achieved through a process of thermally induced phase separation and subsequent sublimation of the solvent as described in the Materials and Methods section. In general, porosity, mean pore size and orientation of porous matrix are indispensable elements of biologic activity of biomaterials having open-pored structures [12]. The effects of freezing rate on the sponge morphology were reported in many works [13-14]. Quenching at -700C could produce a lot of small ice crystals, resulting in the relatively homogeneous morphology [3]. SEM images of polysaccharide sponges prepared from cross-linked and freeze-dried gelatin/alginate composite hydrogels showed extensive arrays of ordered micro-capillaries with smooth walls (Fig. 2).

A Fig. 2 shows the SEM micrographs of the cross sections of scaffolds of alginate-gelatin sponge (A and B) and UA-alginate-gelatin sponge (C and D).

There were clear differences in the appearance of the fibrillar structure of the sponges depending on the composition. The crosslinked alginate/gelatin sponge showed a reasonably irregular network, as shown in Fig. 2a and b. The sponge UA-alginate-gelatin, however, showed a much more regular morphology, as indicated in Fig. 2c e d.

INSERT FIG 2

3.2 Mechanical Analysis

Table 1 shows the values on the mechanical properties measured in sponges. The mechanical tests for determining the elongation understood Young's modulus, stress and strain.

The sponges containing usnic acid showed variations in the tensile mechanical behavior. The sponge incorporated with 1% usnic acid obtained initial response character plastic (Young's modulus = 2.3) before break at a strain of 13%, whereas with the addition of the drug was observed at 5% greater strength (voltage) required to lower deformation, modifying the mechanical response for the character plastic. This effect appears to be associated with higher solids content present in the polymer solution [18, 19].

INSERT TABLE 1

These data are consistent to those observed in the images obtained by SEM, where the sponges incorporated with usnic acid present a mesh network homogeneous and well defined when compared to sponges biopolymers. The incorporation of usnic acid 1% led to obtaining homogeneous structures with pore diameters smaller when compared with those incorporated with usnic acid 5%, suggesting the tendency for elastic behavior [18]. In contrast, the sponges incorporated with usnic acid exhibited 5% fibrillar structure more heterogenous resulting in

decreased mechanical strength due to the presence of weak spots caused by fine fibrillar architecture that can allow rupture [20].

3.3 Determination of Usnic Acid content by UV spectrophotometric method

The optimized UV-spectrophotometric method was applied to the determination of UA in sponges using calibration curve method. The results show that the proposed method was successfully applied for the assay of UA in sponges formulation.

The Table 2 shows that the concentration of UA incorporated in the sponges with 1% UA were smaller than those incorporated with 5% UA. This result can be correlated with the findings of the SEM where the sponges 1% UA showed lower pore size, which can lead hinder the permeation of solvent extractor.

3.4 Thermal analysis

DSC curves of AU, pure gelatin, alginate alone, alginate-gelatin sponge, AU/alginate-gelatin sponges (1 and 5%) are shown in Fig. 3. DSC curve of UA showed an endothermic event between 192-210°C with a well-defined peak at 201°C corresponding to the melting point of the drug (Fig. 3). Furthermore, the DSC curve showed an exothermic event caused by thermal decomposition of the examined sample. This second event had a peak at 273°C. TG curves showed an event of fast mass loss occurring in the range of 230 to 350°C (Fig. 4), as well as further slow mass loss in the range of 350 to 900°C, which is usually attributed to the elimination of carbonaceous material. The DSC curves of UA/alginate-gelatin sponges (1 and 5%) not evidenced the melting peak of AU at 201°C, indicating absence of free UA.

TG/DTG curves of alginate/gelatin sponge presented four steps of weight loss can be observed: 36-145°C (12.0%), 196-270°C (18.7%), 270-515°C (31.8%) and 515-900°C

(18.2%). The TG/DTG curves of UA/alginate-gelatin sponges showed similar profile differing only the percentage of weight loss (Fig.4 and Table 2).

INSERT FIGURE 3 AND 4

INSERT TABLE 2

Table 2. Mass losses for (alginate:gelatin) sponge and UA/alginate-gelatin sponges (1 and 5%).

The usnic acid spectrum (Fig. 5) showed a 1690 cm^{-1} band corresponding to a conjugated cyclic ketone group. Weak bands at 1715 and 1678 cm^{-1} in the infrared spectrum are assigned to the $\nu(\text{C=O})$ non-conjugated cyclic ketone and the non-aromatic methyl ketone, respectively. Conjugation, electron donating ring substituents and possible intra-molecular hydrogen-bonding, all contribute to the lower wavenumber position of the aromatic methyl ketone to 1628 cm^{-1} . It is also possible to assign the antisymmetric and symmetric $\nu(\text{COC})$ aryl alkyl ether modes to bands at approximately 1283 and 1072 cm^{-1} , respectively. In the FTIR spectrum of NaAlg two strong absorption peaks at 1611 and 1415 cm^{-1} are seen. They can be assigned to the antisymmetric and symmetric stretching vibrations of the carboxylate group, respectively [21].

INSERT FIGURE 5

4. Conclusion

This work showed that using the biocompatible natural polymers, gelatin and alginate, novel crosslinked sponges were successfully prepared. The absence of the melting peak of UA at 201°C indicates that there is not free UA in the system with alginate-gelatin. The TG/DTG curves of the alginate-gelatin-UA showed different thermal decomposition profiles as compared to alginate-gelatin.

Acknowledgments

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe/FAPITEC-SE for the financial support.

References

- [1]Hui Ling Lai, Asad Abu’Khalil, Duncan Q.M. Craig, The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges, *International Journal of Pharmaceutics* 251 (2003) 175-/181.
- [2]Ruchi Bilgainya, Farid Khan, Stephen Mann. Spontaneous patterning and nanoparticle encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges. *Materials Science and Engineering C* 30 (2010) 352–356.
- [3]Young Seon Choi, Sung Ran Hong, Young Moo Lee, Kang Won Song, Moon Hyang Park, Young Soo Nam. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 20 (1999) 409-417.
- [4]Nagahama, H., Maeda, H., Kashiki, T., Jayakumar, R., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 255–260.
- [5]Visavadia, B. G., Honeysett, J., & Danford, M. H. (2008). Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(1), 55–56.
- [6]Chao Yang, Ling Xu, Ying Zhou, Xiangmei Zhang, Xin Huang, Min Wang, Ye Han, Maolin Zhai, Shicheng Wei, Jiuqiang Li. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 1297–1305.

- [7]Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering. *Anat Rec* 2001;263:342–9.
- [8]Becker TA, Kipke DR, Brandon T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res* 2001;54:76–8.
- [9]Zhensheng Lia,c, Hassna R. Ramaya, Kip D. Hauchb, Demin Xiaoc, Miqin Zhanga,_ . Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 3919–3928.
- [10]Fehmi Odabasoglu, Ahmet Cakir, Halis Suleyman, Ali Aslan, Yasin Bayir, Mesut Halici, Cavit Kazaz. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103 (2006) 59–65.
- [11]Paula S. Nunes, Ricardo L. C. Albuquerque-Júnior, Danielle R. R. Cavalcante, Marx D.M. Dantas, Juliana C. Cardoso, Marília S. Bezerra, Jamille C. C. Souza, Mairim Russo Serafini, Lucindo J. Quitans-Jr,1 Leonardo R. Bonjardim, Adriano A. S. Araújo. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2011, 1-9.
- [12]Chvapil M. Collagen sponge, theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res* 1977; 11:721-41.
- [13]Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18:583-90.
- [14]Dagalakis N, Flink J, Burke JF, Yannas IV. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res* 1980; 14:511-28.

- [15]Magdalena Gierszewska-Drużyńska, Jadwiga Ostrowska-Czubenko. The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Progress On Chemistry And Application Of Chitin And Its.*, in press.
- [16]Ingolfsson, K., Chung, G.A.C., Gissourarson, S.R., Skulason, V.G., Vilhelmsdottir, M., 1998. In vitro antimycobacterial activity of lichen metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 141–144.
- [17]Kupchan, S.M., Kopperman, H.I., 1975. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*, 31, 625-6.
- [18]Vijayakumar, C.S., Viswanathan, S., Reddy, M.K., Parvathavarthini, S., Kundu, A.B., Sukumar, E., 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71, 564-566.
- [18]Bilginyan, R.; Khan, F.; Mann, S. 2010. Spontaneous patterning and nanoparticle encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges. *Materials Science and Engineering C*, 30, 322-356.
- [19]Nandagiri, V. K.; Gentile, P.; Chiono, V. 2011. Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan–gelatin scaffolds: Influence on the physical properties and cell behavior. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 4, n. 7, p. 1318-1327.
- [20]Lai, H.L.; Abu Khalil, A.; Craig, D.Q.M. 2003. The preparation and characterization of drug-loaded alginate and chitosan sponges, 251, 175-181.
- [21] Gierszewska-Drużńska, M.; Ostrowska-Czubenko, J. 2010. The Effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. v. 15, 33-34.

FIGURE CAPTIONS

Fig 1. Photograph of alginate:gelatin sponge showing the pliability of the freeze dried material.

Fig. 2. DSC curves of usnic acid (UA), pure gelatina, alginate alone, (alginate:gelatin) sponge and UA/alginate:gelatin sponges (1 and 5%) obtained in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min⁻¹) and rate heating 10°C.min⁻¹.

Fig. 3. TG/DTG curves of usnic acid (UA), pure gelatina, alginate alone, (alginate:gelatin) sponge and UA-alginate:gelatin sponges (1 and 5%) obtained in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min⁻¹) and rate heating 10°C.min⁻¹.

Fig. 4. The infrared spectra of usnic acid (UA), pure gelatina, alginate alone, (alginate:gelatin) sponge and UA/alginate:gelatin sponges (1 and 5%).

Fig. 5. SEM micrographs of the cross sections of porous sponges. (A) and (B) alginate-gelatin sponge, and (C) and (D) UA- alginate-gelatin sponge.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Mechanical properties of the sponges without usnic acid (ALG / GEL) and 1 (UA 1%) and 5% of the drug (UA 5%).

Table 2. Determination of usnic acid in sponges

Table 3. Mass losses for (alginate:gelatin) sponge and UA/alginate-gelatin sponges (1 and 5%).

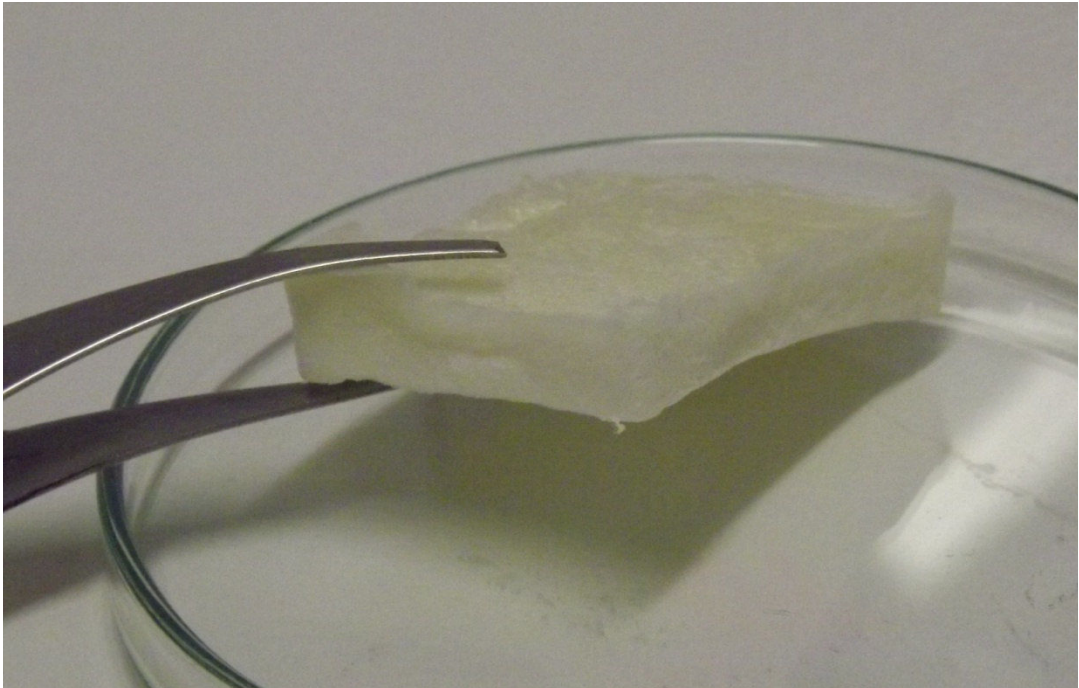


Fig. 1

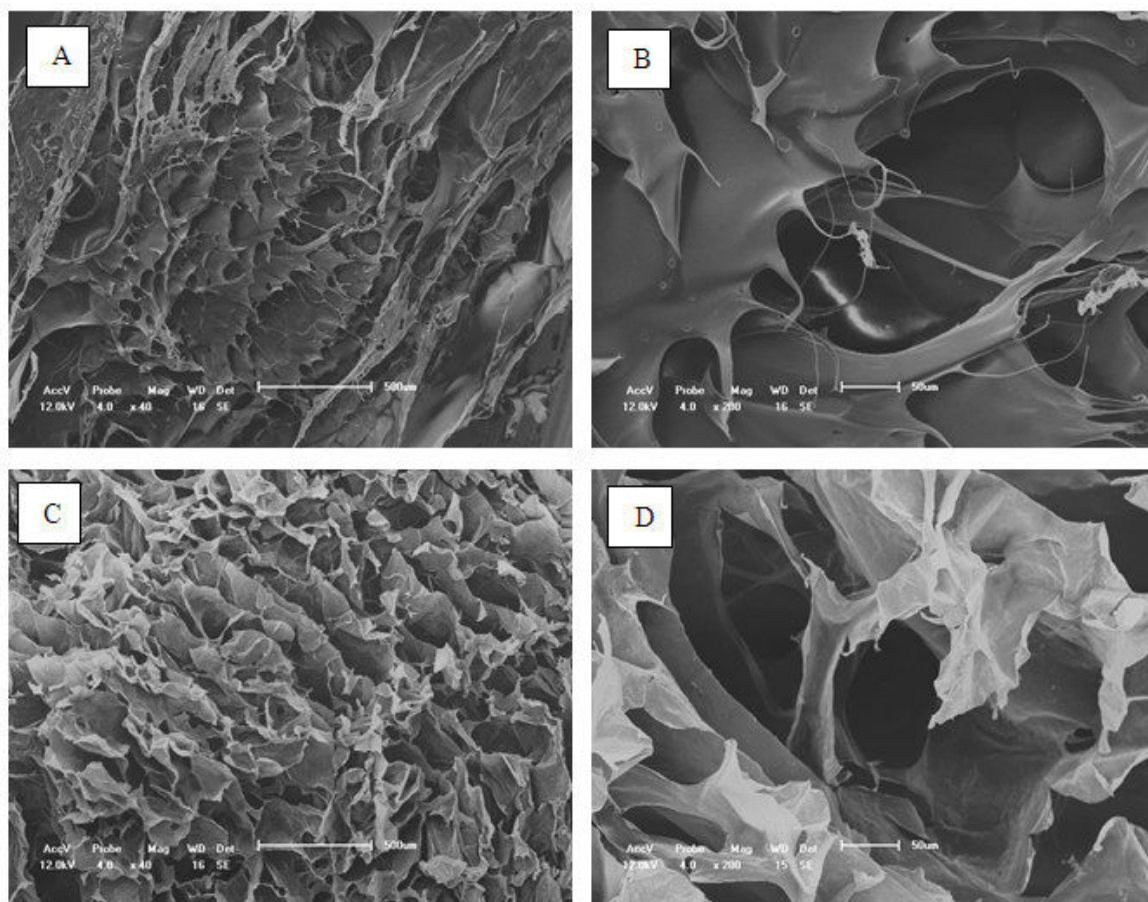


Fig.2

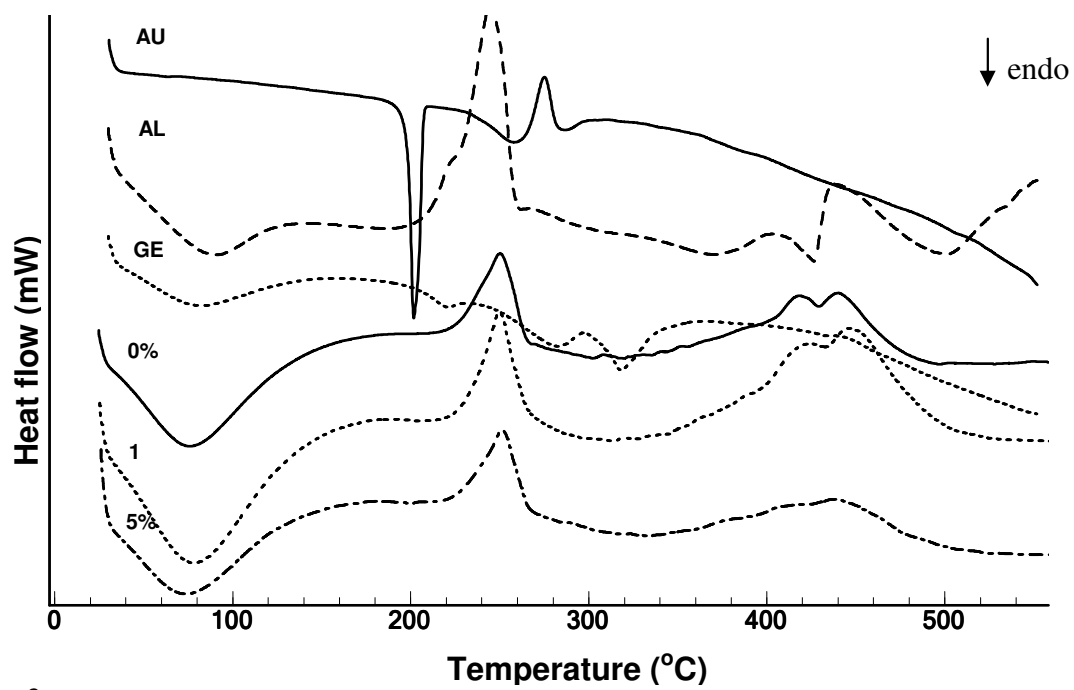


Fig. 3

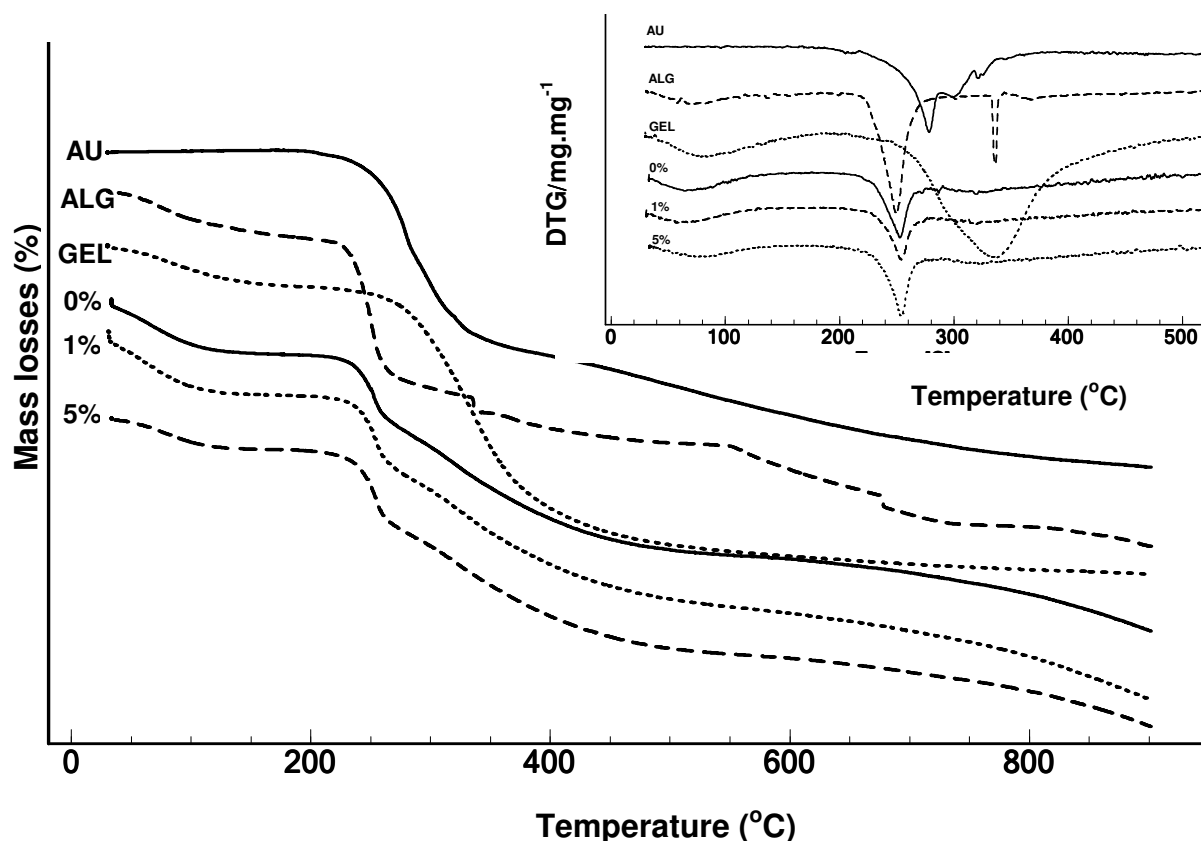


Fig. 4

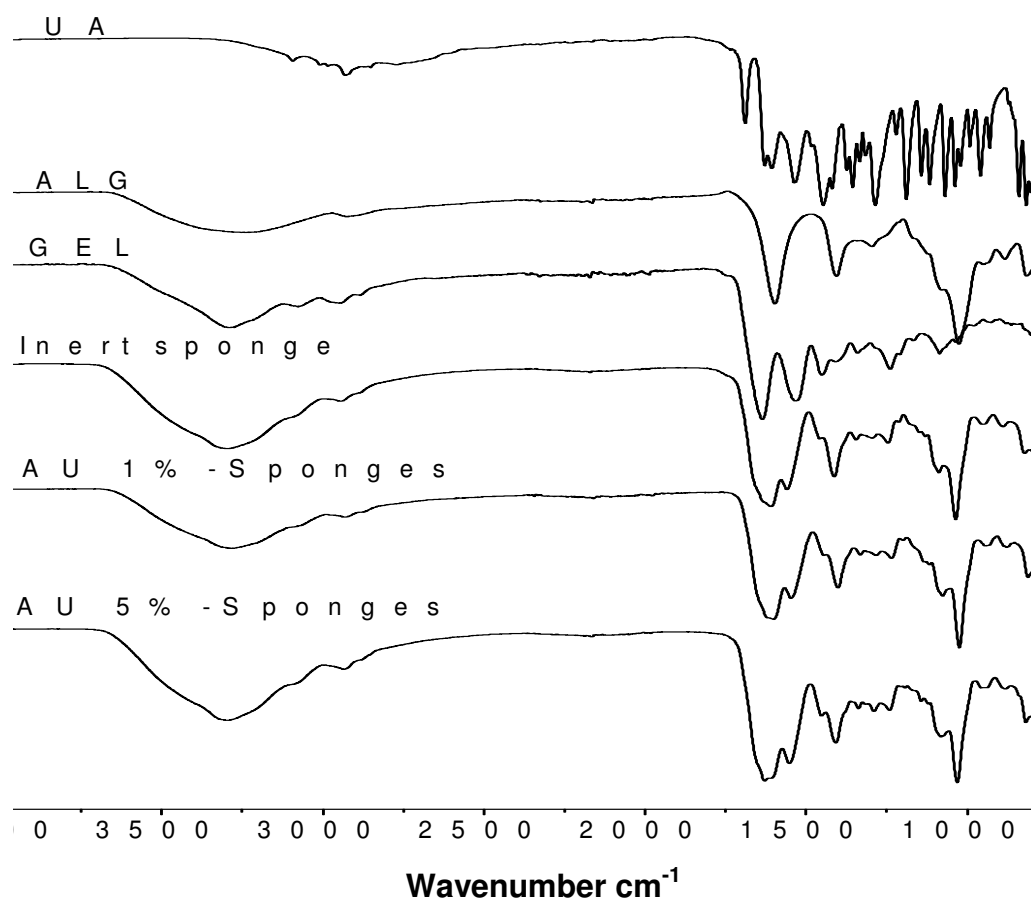


Fig. 5

	ALG/GEL	AU 1%	AU 5%
Young modulus (Mpa)	6,7 ± 2,8 ^a	2,3 ± 1,1 ^a	21,1 ± 6,0 ^b
Tensile strength (Mpa)	0,94 ± 0,47 ^a	0,29 ± 0,11 ^b	1,54 ± 0,6 ^a
Strain (%)	15,6 ± 6,9 ^a	13 ± 2,7 ^a	7,1 ± 1,7 ^b
Thickness (mm)	0,507 ± 0,04 ^a	0,651 ± 0,175 ^a	0,625 ± 0,07 ^a
Firmness (N/mm)	0,100 ± 0,02 ^a	0,223 ± 0,13 ^a	0,221 ± 0,13 ^a
Density (g/cm³)	0,0147 ± 0,001 ^a	0,0134 ± 0,001 ^b	0,0175 ± 0,001 ^c

Table 1

Usnic acid concentration (µg/mL)			
AU%	Theoretical	Experimental (RSD)	Recovery (%)
1.0	8.0	4.8 (0.401)	60.03
5.0	11.78	11.48 (0.140)	97.38

R.S.D.= relative standard deviation

Table 2

Sponge	1 st step (%)	T _{range} (°C)	2nd step (%)	T _{range} (°C)	3rd step (%)	T _{range} (°C)	4th step (%)	T _{range} (°C)
Alginate/gelatin	12.0	36-145	18.7	196-270	31.8	270-515	18.2	515-900
UA/Alg-gel 1%	13.2.0	36-140	19.6	213-271	33.6	271-480	22.6	480-900
UA/Alg-gel 5%	7.8	38-180	20.2	240-275	31.2	275-518	17.6	518-900

Table 3

ANEXO III

**Comprovante de submissão do artigo ao periódico Current
Applied Physics**

Your PDF has been built and requires approval

De: Current Applied Physics (esubmissionsupport@elsevier.com)

Enviada: terça-feira, 21 de agosto de 2012 06:16:10

Para: farmsilva@uol.com.br

Dear Francilene,

The PDF of your submission, "Usnic acid incorporated alginate and gelatin sponges prepared by freeze-drying for biomedical applications", is ready for viewing.

Please log into the Elsevier Editorial System as an author to view and

approve the PDF of your submission.

URL: <http://ees.elsevier.com/cap/>

This approval step is part of the submission process and must be completed before the manuscript can be sent to the Current Applied Physics editorial office. Please view the submission before approving it, to verify that it is free of any errors. Thank you for your time and patience.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Current Applied Physics

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO IV

Normas para publicação do periódico Current Applied Physics

Current Applied Physics

"Physics, Chemistry and Materials Science"

ISSN: 1567-1739

Imprint: ELSEVIER

Actions

Impact Factor: 1.900

5-Year Impact Factor: 1.821

Issues per year: 9

AUTHOR INQUIRIES

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder. At submission stage it will be mandatory for the Author to agree to the Ethical Statement.

Letter Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship.

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal

Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Please submit your article at <http://ees.elsevier.com/cap/>

Submission to this journal proceeds totally online at and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 3 potential referees. This is particularly important when the manuscript deals with a highly specialized subject.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in singlecolumn format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use

tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text.

See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal crossreferencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations.* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAP: Symbols, Units, Nomenclature and Fundamental Constants in Physics: <http://www.iupap.org/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by $\exp$. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source

publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>).

Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly

labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred

maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review.

Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print.
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication.

The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit

this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Author Information Pack

User Resources Advertising Careers Feedback Site Map Elsevier Websites A Reed Elsevier Company

Copyright © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Privacy Policy Terms & Conditions