

Avaliação do biopolímero de óleo de mamona, glicerol e ácido cítrico no processo de cicatrização de feridas

Hellen Kaiane George¹, Jairo de Freitas de Sousa², Dione Silva Corrêa³, Ivana Grivicich⁴

¹Acadêmica do Curso de Farmácia, ULBRA, Bolsista PIBITI/CNPq, ²Farmacêutico, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, ULBRA, ³Professora do Curso de Química e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, ⁴Professora-Orientadora dos Cursos de Biomedicina, Farmácia e Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, grivicich@ulbra.br.

Resumo

Biopolímeros de diferentes origens podem ser empregados como materiais bioativos, podendo ser aplicados no tratamento de feridas, devido as suas propriedades de biocompatibilidade. Assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar um biopolímero de poliéster e avaliar seus efeitos citotóxicos e de cicatrização *in vitro*. A síntese do biopolímero foi efetuada em sistema aberto e sua caracterização foi realizada por técnicas de RMN, FTIR e TGA. A avaliação da citotoxicidade foi realizada por ensaio colorimétrico de MTT e da cicatrização pelo ensaio *wound healing* na linhagem celular de fibroblasto de camundongo L929, nas concentrações 100, 50 e 5 µg.mL⁻¹. Somente foi observada citotoxicidade na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Os resultados dos testes de cicatrização demonstraram que o BIOPOL reduziu o tamanho da lesão causada nas concentrações de 50 e 5 µg.mL⁻¹, sugerindo um potencial efeito de cicatrização. Esses achados mostram que o biopolímero BIOPOL é seguro para uso e que pode auxiliar na recuperação tecidual, entretanto, mais estudos são necessários.

Palavras-chave: biopolímero, citotoxicidade, cicatrização, *in vitro*

Abstract

Biopolymers from different origins can be used as bioactive materials and can be applied in wound treatment, due to their biocompatibility properties. Thus, the aim of this study was to synthesize a polyester biopolymer and evaluate its cytotoxic and healing effects *in vitro*. The biopolymer synthesis was carried out in an open system, and its characterization was performed by NMR, FTIR and TGA techniques. The evaluation of cytotoxicity was performed by colorimetric MTT assay, and healing by wound healing assay in the mouse fibroblast cell line L929, at concentrations of 100, 50 and 5 µg.mL⁻¹. Cytotoxicity was only observed at the concentration of 100 µg.mL⁻¹. The results of the healing tests showed that BIOPOL reduced the size of the lesion caused at concentrations of 50 and 5 µg.mL⁻¹, suggesting a potential healing effect. These findings show that the biopolymer BIOPOL is safe to use and that it can aid in tissue recovery, however, more studies are needed.

Keywords: biopolymer, cytotoxicity, healing, *in vitro*

Introdução

O interesse atual no desenvolvimento de novos materiais de base biológica tem motivado estudos visando a descoberta de produtos para as mais variadas aplicações clínicas. Dentro deste contexto os biopolímeros biodegradáveis, com aplicações como produtos bioativos, têm recebido uma grande atenção. Os biopolímeros podem ser definidos

como polímeros produzidos a partir de seres vivos ou de matérias primas de fontes renováveis (ASTM D833, 2008). O processo de obtenção de polímeros ocorre através de reações de polimerização. Estes polímeros podem sofrer degradação em semanas ou meses, pela ação microbiológica de bactérias, fungos e algas (ASTM D833, 2008). O processo de biodegradação é o resultado da presença de grupos polares na estrutura do polímero, que são

suscetíveis a clivagem hidrolítica ou microbiológica (UMPIERRE, 2013).

Biopolímeros de diferentes origens podem ser empregados como materiais bioativos, podendo ter aplicação, por exemplo, no tratamento de feridas, onde tem um amplo escopo devido as suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, potencial regenerativo e durabilidade (KUHL et al., 2017). A utilização de biopolímeros para a produção de materiais biodegradáveis tem sido uma alternativa em substituição a materiais sintéticos que vão além da sua capacidade de degradação, uma vez que polímeros naturais, em sua grande maioria possuem propriedades que podem ser enfatizadas de acordo com a sua aplicação. Alguns exemplos de biopolímeros (de origem natural ou sintética), são utilizados em aplicações biológicas (GOMES et al., 2017).

Os biopolímeros que são compatíveis e assimilados por um sistema biológico são úteis na confecção de suturas, implantes e fixações ósseas, pois podem ser absorvidos pelo organismo ao passo em que ocorre a regeneração do tecido lesionado. O poli-hidroxialcanoato (PHA) é um desses exemplos, produzido em biorreatores por bactérias que armazenam os biopolímeros no interior de suas células. Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito clínico. Entre as vantagens apresentadas por esse tipo de material, destaca-se a facilidade de fabricação para produzir filmes, fios e outras formas variadas, além do custo e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades desejadas para aplicações específicas (GOMES, 2017). O comportamento multifuncional e a capacidade de ajuste dos biopolímeros facilitam suas aplicações em uma ampla variedade de tipos de feridas, desde fibras tecidas que aumentam de volume em contato com o exsudato até hidrogéis ricos em água que ajudam a manter um ambiente úmido em feridas secas (OLIVEIRA et al., 2019).

Há uma grande variedade de biopolímeros com possibilidade de aplicação na área da saúde e a capacidade de combiná-los oferece uma variedade de comportamentos físicos e químicos, que podem ser projetados para funcionalidades específicas. A compatibilidade fisiológica e a capacidade de controlar a liberação de drogas quando expostas a vários ambientes biológicos tornam os biopolímeros uma alternativa de emprego nesta área. Nas aplicações farmacêuticas e biomédicas, já são observados as utilizações dos biopolímeros, a exemplo destacam-se: alginato, quitosana, pectina, gelatina, glicerol, ácido cítrico e ácido rícinoleico usados como materiais para favorecer o processo de cicatrização de feridas e hidratação do tecido epitelial (SAMROT et al., 2020).

Um dos grupos de biopolímeros intensamente estudados e amplamente utilizados são os poliésteres derivados da natureza. Vale ressaltar que poliésteres contendo ligações ésteres são formados por reação de condensação de ácidos ou anidridos di ou policarboxílicos e álcoois polifuncionais (GURGEL, 2019).

A eficiência de alguns polímeros derivados do glicerol tem sido comprovada por pesquisas realizadas na área biomédica. A grande vantagem do uso do glicerol é devido a sua propriedade de possibilitar a adição de hidroxilas livres aos polímeros permitindo diferentes aplicações (TAN et al., 2018). A aplicabilidade do uso do ácido cítrico em biopolímeros deve-se a um grupo funcional livre, da cadeia polimérica. O uso de um poliéster biodegradável com base em ácido cítrico, em combinação com polióis, tais como glicerol e sorbitol tem sido observado e com grandes perspectivas (LAURENTINO, 2015). A utilização de óleo de mamona, óleo vegetal hidroxilado, é uma fonte alternativa de poliols na produção de materiais poliméricos, pois apresenta grande compatibilidade com o glicerol. Além de ser viável devido o seu preço baixo, a biodegradabilidade, elevada capacidade de ser um recurso renovável e arranjo estrutural passível de modificações químicas estratégicas. As hidroxilas e as ligações duplas na estrutura molecular do óleo de mamona conferem grande reatividade a este óleo, o que favorece seu emprego na síntese de materiais poliméricos, em especial poliésteres (GURGEL, 2019).

A síntese de novos biopolímeros para uso em aplicações terapêuticas devem ser seguidas por ensaios para a identificação da composição, estrutura, propriedades citotóxicas *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, devem ser observados aspectos regulatórios relacionados ao acompanhamento de longo prazo (SANTOS et al., 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar a atividade biológica *in vitro* de um biopolímero poliéster do óleo de mamona, glicerol e ácido cítrico.

Materiais e Método

Locais de realização dos testes

O biopolímero (BIOPOL) foi obtido e caracterizado no Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento – CEPED, da Universidade Luterana do Brasil, na cidade de Canoas/RS. A avaliação dos efeitos biológicos foi realizada no laboratório de Biologia do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA.

Síntese do biopolímero

Os monômeros glicerol, óleo de mamona e ácido cítrico foram empregados na proporção descrita na tabela 1, utilizando o ácido p-tolueno sulfônico como catalisador na proporção de 0,01% em massa. A denominação adotada foi: biopolímero (BIOPOL), óleo de mamona (OM), glicerol (Gli), ácido cítrico (AC). A estequiometria empregada conduziu a razão [OH]/[COOH]: 1,5.

Na Tabela 1 está demonstrada a razão estequiométrica, de acordo com os valores de massa e números de mol dos monômeros empregados para obtenção do biopolímero selecionado no processo de síntese.

Tabela 1 - Quantidade dos monômeros empregados no Biopolímero

BIOPOL ([OH]/[COOH]: 1,5)					
Ác. Cítrico		Óleo de Mamona		Glicerol	
massa	nº mol	massa	nº mol	massa	nº mol
9,60 g	0,05	62,11 g	0,0675	0,69 g	0,0075
13,3%		85,8%		0,9%	

A reação de policondensação do tipo esterificação foi empregada, a fim de deslocar o equilíbrio em favor do produto utilizou-se o método de excesso de um dos reagentes poliál, ou seja, aumento do teor de hidroxilas oriundas do óleo de mamona, gerando um biopolímero polihidroxilado.

A reação de formação do polímero foi conduzida em sistema aberto, sob temperatura inicial de 100 °C, utilizando um agitador mecânico com rotação inicial de 50 rpm, por um período de 30 min. O óleo de mamona foi usado em percentual mais elevado, sendo 50% aquecido na etapa inicial em conjunto com ou glicerol. Na sequência adicionou-se o ácido cítrico e a mistura continuou sendo agitada até a completa homogeneização, sendo o produto formado denominado como “pré-polímero”. O restante do óleo de mamona foi então adicionado ao pré-polímero e manteve-se o aquecimento e a agitação mecânica até o material obter a viscosidade esperada, sendo este denominado biopolímero.

Durante o processo foi possível identificar a total homogeneidade dos monômeros, na qual a mistura reacional se apresentou como um líquido amarelo, translúcido a castanho e viscoso. Decorrido o tempo das reações de condensação, a mistura polimérica foi vertida em frascos de 30 mL, sendo esta resfriada a temperatura ambiente.

A concentração dos monômeros hidroxilados foi de 90% Óleo de Mamona + 10% Glicerol no biopolímero sintetizado.

Caracterização do biopolímero

As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro Varian modelo *Avance-400* de 400 MHz, empregando-se o solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆).

As análises de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Diferencial (DTG) foram realizadas no equipamento *TA instruments*, utilizando cadinhos de alumina de 50 µL, com amostras de massa em torno de 10 mg de biopolímero, em razões de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C min⁻¹, em atmosfera de ar seco com vazão de 50 mL min⁻¹ e no intervalo de temperatura de 30 - 700 °C.

Para análise de grupos funcionais por Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado o equipamento *BrukerAlpha-P*, e os espectros foram obtidos pelo método de Refletância Total Atenuada com varredura de número de onda de 4000 a 500 cm⁻¹ e com resolução de 5 cm⁻¹. Para o óleo de mamona, utilizou-se uma pipeta Pasteur para depositar uma gota de amostra sobre o cristal do ATR e obter-se o espectro. Para o biopolímero, devido sua alta viscosidade, foi necessário utilizar uma espátula para cobrir o cristal com a amostra.

Linhagem celular e condições de cultivo

Foi utilizada a linhagem de células de fibroblastos de camundongo, L929, adquirida do *RJCB Collection* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (v/v), a temperatura de 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de no mínimo 95%.

Teste de citotoxicidade pelo ensaio MTT

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)) (SCUDIERO, *et al.*, 1988). Culturas em triplicatas foram expostas por 24 h ao biopolímero nas concentrações de 5, 50 e 100 µg.mL⁻¹. O DMSO (10%) foi utilizado como controle positivo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com 100 µL de solução de MTT (0,5 mg.mL⁻¹ de MTT) em meio de cultura sem soro fetal bovino e sem fenol, a 37 °C por 4 h. Após a incubação o sobrenadante foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 200 µL de DMSO e quantificados em um leitor de microplacas (Multiskan, UNISCIENCE), em densidade ótica de 540 nm.

A análise foi realizada conforme a *International Standardization for Organization*, ISO 10993-5 (2009), que normatiza testes de citotoxicidade in

vitro para avaliação de compostos para uso na saúde.

Teste de cicatrização pelo ensaio wound healing

Para avaliação da cicatrização *in vitro*, utilizamos o ensaio *wound healing*, previamente descrito por Walter et al. (2010) e Vockel et al. (2011). As células foram inoculadas, em triplicata, em uma concentração de 10^5 células/poço em uma placa de 24 poços e mantidas em condições padrão de cultura, durante 24 h para permitir a adesão celular e formação de uma monocamada confluenta. Passado esse período, as monocamadas foram marcadas com uma ponta de ponteira 200 μ L estéril, utilizando uma régua estéril para criar um risco retilíneo, formando uma lesão de comprimento próximo ao diâmetro do poço. Após, as células foram extensivamente lavadas com PBS 1X para completa remoção dos *debris* celulares resultantes da criação do risco. A seguir, as células foram tratadas nas concentrações de 0, 5 e 50 μ g.mL⁻¹. e mantidas a 37 °C em condições padrão de cultivo celular.

A cicatrização celular foi analisada por fotografia após 0 h, 24 h, 48 h e 72 h subsequentes à criação da lesão. Para tanto, as imagens foram obtidas com câmera digital (*AxioCamMRc*, Carl Zeiss, Alemanha) em lente objetiva de 5 X, acoplada ao microscópio óptico invertido com contraste de fase (*Axiovert 25*, Carl Zeiss, Alemanha), utilizando o programa MRGrab 1.0.0.4 (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram analisadas com utilização de *software ImageJ* (versão 1.48) e o resultado da migração foi expresso em porcentagens. Considerando-se o tempo 0 como sendo equivalente a 100% da medida da largura do risco.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância (*one-way ANOVA*) com o teste post hoc de Dunnett's. Todos os valores de p apresentados são de duas vias e os valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os testes foram realizados no software *Graphpad Prism*® (*Graphpad Software Inc*; versão 5.01).

Resultados e Discussão

Obtenção do biopolímero

A síntese do poliéster mostrou-se relativamente simples, visto que não foi utilizado solvente e pode ser conduzida em reator aberto em temperatura de trabalho de 100 °C. O catalisador ácido p-tolueno sulfônico mostrou boa atividade na esterificação e na conservação das propriedades, como a não alteração da cor além da conversão polimérica.

De acordo com os resultados obtidos, as condições ideais para a obtenção de biopolímero por poliesterificação foram uma mistura de ácido cítrico, glicerol e óleo de mamona na razão [OH]/[COOH] 1,5 em temperatura de 100 °C por 30 min. Sínteses de poliésteres biodegradáveis a base de ácido cítrico, glicerol e ácido ricinoleico (maior constituinte químico do óleo de mamona) são classificadas como fontes promissoras. No óleo de mamona é encontrado a estrutura química de um triglicerídeo, que apresenta diversos pontos de reatividade (dupla ligação, grupo éster e grupos hidroxilas em sua cadeia carbônica) e por tanto uma facilidade de reação (BARIZON, 2013; RODRIGUES, 2016).

A mistura do óleo de mamona com glicerol, que possibilita a obtenção de hidroxilas livres, produziu um biopolímero com desempenho adequado ao processamento, ou seja, cor e viscosidade adequada para favorecer os processos de ligações entre as unidades químicas, resultados esses que estão de acordo com Gomes et al. (2017).

O biopolímero sintetizado apresentou um aspecto "mel" (elevada viscosidade) onde foi definido o ponto final do processo de polimerização. O biopolímero apresentou uma tonalidade mais escura, característica atribuída a alta concentração de óleo de mamona, onde na visão de Rodrigues (2016), este óleo possui insaturações, que provocam oxidação durante as reações de polimerização. O poliéster foi sintetizado sem a utilização de solventes orgânicos, não promovendo resíduos e caracterizando o processo como reação de síntese limpa.

Termogravimetria (TG), Termogravimetria Diferencial (DTG)

A estabilidade térmica foi analisada por TGA; as curvas TG/DTG do biopolímero, está apresentada na Figura 1. Observações preliminares indicam que o biopolímero começou a demonstrar perda de massa antes que se inicie a degradação térmica. Observações preliminares de acordo com as curvas demonstradas (azul indica uma derivada e vermelho DTG) indicam que o BIOPOI inicia em 200 °C lentamente a degradação, se acentuando a partir de 300 °C, evidencia-se mais que um evento de perda de massa.

O biopolímero mostrou um evento entre 200-300 °C com perda de 10% de massa e a partir desta temperatura, a decomposição térmica foi observada até 480 °C, onde se encontrou completamente degradado. O biopolímero apresentou 70% de decomposição em 400 °C. O teor menor ou ausência de glicerol na composição deste biopolímero não acarretou aumento na estabilidade térmica.

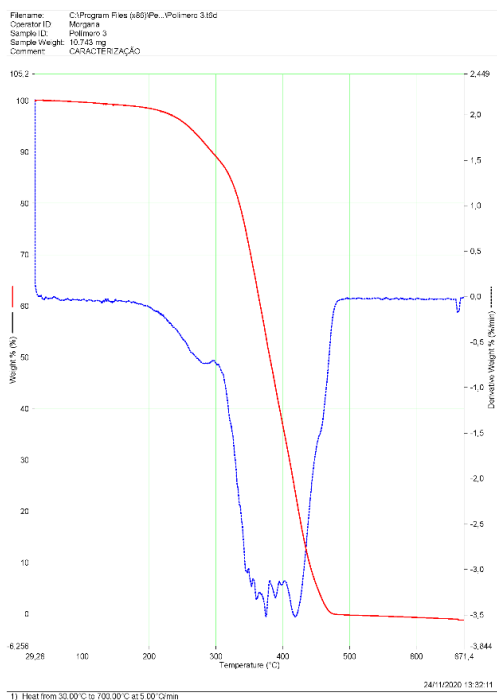


Figura 1. Termograma do BIOPOL.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho do glicerol, ácido cítrico, e óleo de mamona do biopolímero está apresentado na Figura 2. Os respectivos biopolímeros apresentam uma estrutura de éster com a presença dos picos em 1750 cm^{-1} (estiramento de carbonila) e em torno de 1204 e 1050 cm^{-1} (conjugação do éster, $\text{C}-\text{C}(\text{C}=\text{O})-\text{O}$).

Foi observada a presença da banda O-C-C dos ésteres a partir de álcoois, refere-se à deformação axial da ligação carbono-oxigênio, ocorrendo entre 1160 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} , refere-se a uma banda característica de éster e que não está presente nos monômeros precursores.

O espectro não mostra banda larga de OH livre de ácidos carboxílicos ($2500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), o que indica que houve conversão de todo ácido cítrico em éster, o que está de acordo com o emprego de excesso de monômero hidroxilado, o que pode também ser evidenciado pela presença da banda de estiramento do grupo hidroxila. Foram observadas as bandas características de éster (1.750 cm^{-1} , 1.150 cm^{-1} e 750 cm^{-1}). Vale ressaltar que elas também apresentam banda de estiramento do grupo hidroxila; assim comprovando que, a obtenção dos biopolímeros, reação de esterificação entre os monômeros utilizados foi eficiente na estequiometria estudada conforme a Figura 2 demonstra.

O aparecimento de bandas características de ésteres, bem como, redução de bandas típicas de OH livre de ácidos carboxílicos, compreendem

fortes evidências de que a reação de esterificação entre os monômeros utilizados aconteceu.

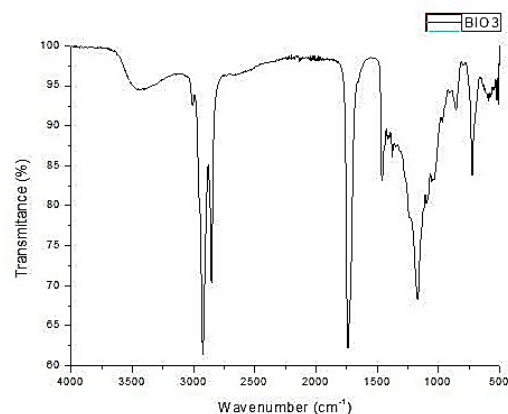


Figura 2. Espectro de Absorção na Região de Infravermelho.

A Figura 3 a seguir traz os espectros de infravermelho do ácido cítrico e do glicerol obtidos na literatura, que foram empregados a fim de facilitar a comparação e determinar o aparecimento, a sobreposição e supressão de bandas.

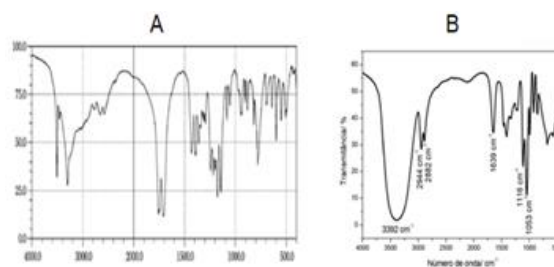
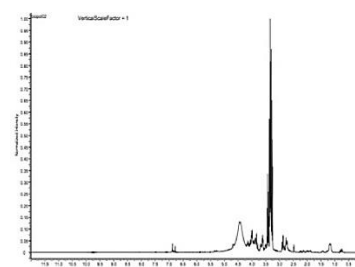


Figura 3. Espectro de infravermelho respectivamente do ácido cítrico (A) e do glicerol (B).

Espectroscopia no RMN

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C do biopolímero, apresentado na Figura 4, mostram os principais sinais de modificação dos polióis pelo ácido cítrico, indicando a ramificação dos poliésteres sintetizados nas regiões de 3,6 a 4,2 ppm nos espectros de hidrogênio entre em 60 a 75 ppm nos espectros de carbono, bem como o pico de carbono carbonílico em 172 ppm.

(A)



(B)

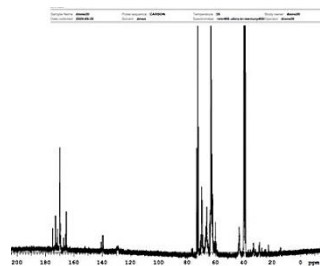


Figura 4. Espectros RMN1H (a) e RMN13C (b) do BIOPOL.

Além disso, nos espectros de hidrogênio, aparecem um pico arredondado em 4,5 ppm referente a hidrogênio de hidroxila, mostrando que o biopolímero obtido é um material hidroxilado e a ausência de sinal entre 11-12 ppm indica que todo o ácido cítrico foi consumido.

Análise da citotoxicidade do BIOPOL

A avaliação da citotoxicidade de biopolímeros utilizando a linhagem celular L929 é bem estabelecida na literatura (PRUDENCIO et al., 2016, SU et al., 2018). Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* no que se refere a possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais rapidamente. Os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, uma vez que são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para avaliação de segurança e biocompatibilidade de compostos *in vitro* (LAGARTO et al., 2005).

O biopolímero foi avaliado quanto aos seu potencial de citotoxicidade com o objetivo de verificar a sua segurança para uso. Com base nos resultados de citotoxicidade (Figura 5) verificou-se que na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o BIOPOL demonstrou efeito citotóxico. Esses resultados podem ser observados pela redução da viabilidade celular acima de 70% (ou citotoxicidade de 30% ou mais), conforme ISO 10993-5 (2009). Já nas concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o biopolímero testado não demonstrou citotoxicidade na linhagem celular L929.

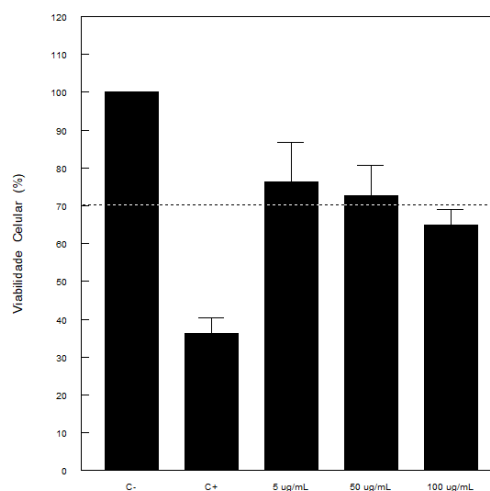


Figura 5. Viabilidade da linhagem celular de fibroblastos L929 após exposição ao BIOPOL nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, controle positivo (C+, DMSO a 10%) e controle negativo (C-; meio de cultura) durante 24 h. A linha tracejada mostra a viabilidade celular de 70%.

Nesse sentido, um outro biopolímero a base de óleo de mamona não apresentou citotoxicidade na linhagem celular L929 (USCÁTEGUI et al., 2019). Da mesma forma, um biopolímero produzido a base de glicerol também não demonstrou ser citotóxico na linhagem celular L929 (ATYA et al., 2021).

Análise da cicatrização *in vitro*

Após verificarmos a segurança do biopolímero e em quais concentrações eles não apresentam citotoxicidade, foi realizado o ensaio para verificar o potencial de cicatrização do BIOPOL. Assim, com base nos resultados anteriores, os experimentos subsequentes foram realizados com as concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por não apresentarem citotoxicidade. Na Figura 6 é possível verificar que na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o controle não tratado apresentou uma redução da lesão em aproximadamente 10%, assim como os BIOPOL após 24 h. Já no tempo de 48 h o controle não tratado e o BIOPOL reduziram a lesão em aproximadamente 40%. Ao analisar o tempo de 72 h verificamos que as células não tratadas tiveram uma redução máxima da lesão de 56-60%, por outro lado o BIOPOL reduziu a lesão em aproximadamente 70%. Gharibi et al. (2021) demonstraram um potencial efeito de recuperação da ferida *in vitro* com um gel a base de óleo de mamona.

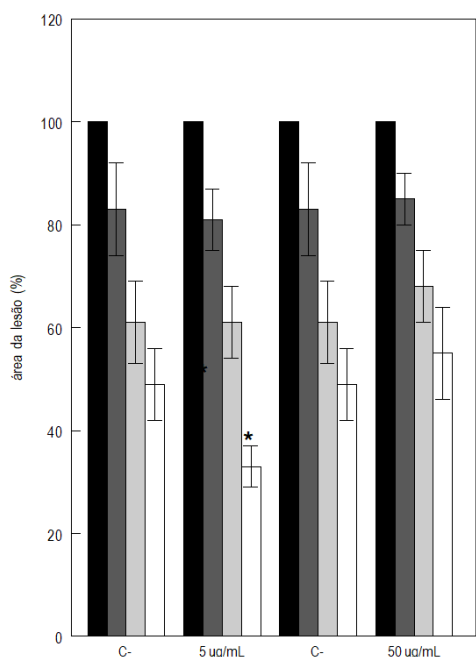


Figura 6. Redução da área da lesão in vitro na linhagem celular L929 após exposição por 24 h às concentrações de 5 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ do BIOPOL e controle negativo (C-, meio de cultura). A avaliação ocorreu nos tempos 0 h (■), 24h (■), 48h (■) e 72 h (□). *Diferente do controle não tratado (Anova, p < 0,05)

Conclusão

Os resultados obtidos indicam a viabilidade de usar o glicerol, o óleo de mamona e o ácido cítrico, na preparação de biopolímeros, a fim de obter um material com valor agregado e ambientalmente viável.

Os testes biológicos foram promissores e demonstraram em quais concentrações do BIOPOL são citotóxicas e quais podem ser empregadas com segurança nos testes *in vitro*. Mais ainda, foi possível identificar que o BIOPOL pode ser um candidato a ser utilizado como cicatrizante tecidual, entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para avaliar o real potencial terapêutico do BIOPOL.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro recebido, Código de Financiamento 001 e da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Referências

ASTM Standard D833 - **Standard Terminology Relating to Plastics**. ASTM International. West Conshohocken, PA, 2008.

BARIZON, Leonardo Almeida. **Síntese de Materiais Poliméricos contendo moléculas bioativas e materiais de fontes renováveis via catálise enzimática**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GHARIBI, Reza *et al.* Antibacterial and Biocompatible Hydrogel Dressing Based on Gelatin and Castor-Oil-Derived Biocidal Agent. **ACS Biomaterials Science & Engineering**. v. 7, p. 3633-3647, 2021

GOMES, Rodrigo da Vitória *et al.* Síntese e caracterização de bioplásticos a partir de glicerol e óleo de mamona. **Latin American Journal of Energy Research**, v. 4, n. 1, p. 41 - 51, 2017.

GURGEL, Danyelle. **Desenvolvimento de materiais poliméricos de poliuretano utilizando resíduos industriais e óleo de mamona**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 10993- 5. **Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

KUHL, Gabriela *et al.* Aspecto morfológico da interface entre o compósito, constituído de quitosana e polimetilmetacrilato, e a falha óssea de tibia de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, p. 1491-1498, 2010.

LAGARTO, Alicia *et al.* Comparative study of red blood cell in rat calves as alternatives to Draize test eye irritation. **Toxicology in vitro**, v.14, p.529-533, 2005.

LAURENTINO, Larissa da Silva. **Síntese de monômeros derivados do óleo de mamona e copolimerização em meio heterogêneo via radicais livres**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

OLIVEIRA, Marina Ferreira *et al.* Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevida. **Revista Gaúcha de Enfermagem**. Porto Alegre, v. 40, p. 20180016, 2019.

RODRIGUES, Jessica Delavechia Oliveira. **Síntese e Caracterização de biopolímeros obtidos a partir do óleo de mamona (*Ricinus communis L.*)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SAMROT, Antony *et al.* Production, characterization and application of nanocarriers made of polysaccharides, proteins, bio-polyesters and other biopolymers: A review. **International Journal of**

Biological Macromolecules, n. 165, p 3088-3105, 2020.

SANTOS, Gildemberg Alves *et al.* Production of polyhydroxy butyrate na dhydroxyapatite (PHB/HA) composites for use as biomaterial. **Cerâmica**, São Paulo, v. 63, n. 368, p. 557-561, 2017.

SCUDIERO, Dominic *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Reseach**, v. 48, p. 4827 - 4833, 1988.

TAN, Aaron *et al.* Design and development of low cost polyurethane biopolymer based on castor oil and glycerol for biomedical applications. **Biopolymers**. v. 109, p. e23078, 2018.

UMPIERRE, Alexandre *et al.* Gliceroquímica e Valorização do Glicerol. **Revista Virtual de Química**, v. 1 n. 5, p. 106-116, 2013.

USCÁTEGUI, Yomaira *et al.* Candidate Polyurethanes Based on Castor Oil (*Ricinus communis*), with Polycaprolactone Diol and Chitosan Additions, for Use in Biomedical Applications. **Molecules**. v. 24, p. 237, 2019.

VOCKEL, Mathias *et al.* Somatostatin Inhibits Cell Migration and Reduces Cell Counts of Human Keratinocytes and Delays Epidermal Wound Healing in an Ex Vivo Wound Model. **Plos ONE**, v. 6, p. e19740, 2011.

WALTER, Mary *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**. v. 316, p.1271-1281, 2010.

PRUDENCIO, Almudena *et al.* Phenolic Acid-based Poly(anhydride-esters) as Antioxidant Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**. v. 16, p. 214-222, 2016.

SU Feng, *et al.* Biocompatibility and in vivo degradation of chitosan based hydrogels as potential drug carrier. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**. v. 29, p. 1515-1528, 2018

ATYA Abdulraheem, *et al.* Fabrication and characterization of carbon aerogel/poly(glycerol-sebacate) patches for cardiac tissue engineering. **Biomedical Materials**. v. 26, p. 1-18, 2021.