UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DANILO MARTINS DOS SANTOS

Materiais não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana: Desenvolvimento por Eletrofiação, Caracterização Físico-Química e Avaliação citotóxica *in vitro*

São Carlos

2018

DANILO MARTINS DOS SANTOS

Materiais não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana: Desenvolvimento por Eletrofiação, Caracterização Físico-Química e Avaliação citotóxica *in vitro*

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos

2018

*Dedico este trabalho a minha
esposa Andrea e aos meus pais,
Lourival (in memoriam) e
Cícera, por todo amor, carinho
e apoio incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Sérgio Paulo Campana Filho por todo ensinamento, incentivo, dedicação, amizade e por tantas oportunidades ao longo desses quatro anos de doutorado.

A professora Dra. Elisabete Frollini por suas valiosas sugestões, ensinamentos, amizade e disponibilidade em colaborar.

A Dra. Natália Mayumi Inada e a MSc. Ilaiáli Souza Leite do Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela amizade, sugestões e contribuição nos experimentos.

Ao professor Dr. André Luiz Meleiro Porto por conceder o uso do reator micro-ondas.

A minha esposa Andrea pela amizade, compreensão, carinho e amor. Obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos e por todo o companheirismo.

Aos meus pais, Lourival e Cícera, por todo apoio, carinho, dedicação e incentivo aos estudos.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: Ana, Anderson, Daniella, Filipe, Gleyce, Joice, Juliana, Lucas, Patrícia, Rachel, Tatiane, Tonimar, Virgínia e William.

Aos funcionários da Central de Análises Químicas (CAQI) do IQSC e do grupo de Físico-Química Orgânica, em especial, ao Dr. Luiz Antônio Ramos, Dr. Marcelo Luiz Calegari, Dr. Marcio de Paula, MSc. André Luiz e Dra. Sylvana Miguel Agostinho, pela eficiência e dedicação no trabalho realizado.

A Universidade de São Paulo pela excelente infraestrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e/ou torceram pela concretização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo a produção por eletrofiação de nãotecidos compostos por fibras ultrafinas à base de policaprolactona (PCL) e cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) potencialmente aplicáveis no tratamento de lesões de pele. Para tal, QCh foi sintetizado pela reação entre cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) e quitosana em meio ácido sob irradiação de micro-ondas. Tanto a quitosana de partida como os derivados obtidos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), viscosimetria capilar, solubilidade em função do pH, análise termogravimétrica e difração de raios-X. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central e metodologia de superfície de resposta foram aplicados para avaliar o efeito dos parâmetros reacionais razão molar CGTMA/Q, temperatura e tempo reacionais sobre o grau médio de quaternização ($\bar{\alpha}$), viscosidade intrínseca e sobre o rendimento reacional. Os resultados mostraram que a razão molar CGTMA/Q foi o fator que mais influenciou as variáveis resposta avaliadas e que a síntese realizada em reator micro-ondas possibilitou a produção de QCh com elevado grau médio de quaternização ($\bar{\alpha} > 70\%$) em tempo expressivamente inferior (≤ 30 min.) quando comparado à reação empregando aquecimento convencional (> 4 h). Na etapa subsequente, QCh com diferentes características estruturais (grau médio de quaternização ($\bar{\alpha}$) e grau médio de polimerização ($\bar{\alpha}_p$)), a saber QCh1 ($\bar{\alpha} = 47,3\%$; $\bar{\alpha}_p = 2218$) e QCh2 ($\bar{\alpha} = 71,1\%$; $\bar{\alpha}_p = 1427$), foram dissolvidos em diferentes proporções mássicas com poli(ϵ -caprolactona) (PCL/QCh: 100/0 – 70/30) em solução ácido acético/ácido fórmico 60/40 (v/v) e eletrofiados. Os nãotecidos obtidos foram caracterizados quanto ao diâmetro médio e grau de orientação das fibras, porosidade e espessura, caráter hidrofílico/hidrofóbico das superfícies, capacidade de absorção de água, transmissão de vapor de água, além de cristalinidade e propriedades térmicas e mecânicas. Experimentos *in vitro* também foram realizados para avaliar a suscetibilidade à degradação enzimática, citotoxicidade em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) e queratinócitos humanos (HaCaT) e adesão dessas células na superfície dos nãotecidos. Os resultados dessa etapa revelaram que de acordo com as características estruturais do QCh e com a quantidade desse derivado na blenda PCL/QCh, os nãotecidos obtidos apresentaram fibras com diferentes diâmetros médio (175 nm - 415 nm) e graus de orientação, além de exibirem diferentes porosidade (57,0 % - 81,6 %) e capacidade de hidratação (175 % - 425 %). Os ensaios de tração revelaram que os nãotecidos apresentaram equilíbrio entre capacidade de alongação e tensão na ruptura nos

estados seco e após hidratação, sendo que altos valores de tensão na ruptura (> 4 MPa) e alongação (> 120 %) foram observados nos nãotecidos PCL/QCh 90/10. A cristalinidade e a estabilidade térmica dos nãotecidos PCL/QCh foram progressivamente reduzidas com o aumento da concentração de QCh. Os nãotecidos não foram suscetíveis à degradação por lisozima e os ensaios de citotoxicidade *in vitro* mostraram que todos os materiais, exceto PCL/QCh2 70/30, não apresentaram caráter citotóxico em relação às linhagens de células de fibroblastos (HDFn) e queratinócitos humanos (HaCaT). A presença de QCh conferiu caráter hidrofílico à superfície dos nãotecidos favorecendo a adesão e a proliferação dessas células, o que não ocorreu no nãotecido composto somente por PCL. A análise global dos resultados indicou que os nãotecidos PCL/QCh1 90/10 e PCL/QCh2 90/10 foram os que apresentaram características mais promissoras para serem utilizados como curativos, visto que possuem caráter hidrofílico, elevada capacidade de hidratação, estabilidade em meio aquoso, resistência mecânica tanto secos como hidratados, além de não apresentarem caráter citotóxico e favorecerem a adesão e proliferação de fibroblastos e queratinócitos.

Palavras-chave: quaternização da quitosana, síntese assistida por micro-ondas, nãotecidos, eletrofiação.

ABSTRACT

The main purpose of this work was the development of electrospun nonwovens composed by ultrathin fibers based on polycaprolactone (PCL) and *N*-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride (QCh) potentially useful as wound dressings. QCh was synthesized by reacting glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) and chitosan (Ch) in acid medium under microwave irradiation. The parent chitosan, as well as the resulting derivatives, were characterized by Fourier transform infrared (FTIR) and ^1H NMR spectroscopy, capillary viscometry, thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction and with respect to water-solubility as a function of pH. Full-factorial 2^3 central composite design and response surface methodology (RSM) were applied to evaluate the effects of molar ratio GTMAC/Ch, reaction time and temperature on the reaction yield, average degree of quaternization ($\bar{Q}$) and intrinsic viscosity ($[\eta]$) of QCh. Results showed that the molar ratio GTMAC/Ch was the most important factor affecting the response variables and that microwave-assisted synthesis allowed the production of highly substituted QCh ($\bar{Q} > 70\%$) at a significantly shorter time (≤ 30 min.) as compared to conventional reaction procedures (> 4 h). Following, two samples of QCh possessing different characteristics, *i.e.* average degree of quaternization ($\bar{Q}$) and viscosity average degree of polymerization ($\bar{M}_v$), namely QCh1 ($\bar{Q} = 47.3\%$; $\bar{M}_v = 2218$) and QCh2 ($\bar{Q} = 71.1\%$; $\bar{M}_v = 1427$), were synthesized, blended with PCL in acetic acid/formic acid (60/40 v/v) and electrospun into fibrous nonwovens. The PCL/QCh nonwovens were characterized in terms of morphology, surface properties, water absorption capacity, moisture permeation, thermal and tensile properties. *In vitro* experiments were carried out to evaluate the susceptibility of PCL/QCh nonwovens to enzymatic degradation, cytotoxicity toward neonatal human dermal fibroblasts (HDFn) and human keratinocytes (HaCaT), and adhesion of these cells on nonwoven's surface. According to the characteristics of QCh derivative, mainly $\bar{Q}$ and $\bar{M}_v$, and to the QCh content on the resulting PCL/QCh nonwoven, the nanofibers displayed different average diameter (175 nm - 415 nm), and the nonwovens exhibited variable porosity (57.0 % - 81.6 %) and swelling capacity (175 % - 425 %). The tensile tests revealed that the nonwovens present a balance between elasticity and strength under both, dry and hydrated state, the higher tensile strength (> 4 MPa) and elongation ($> 120\%$) being observed for PCL/QCh 90/10 nonwovens. The crystallinity and thermal stability of PCL/QCh nonwoven decreased with increasing QCh content. The PCL/QCh nonwovens were not susceptible to lysozyme degradation and all PCL/QCh nonwovens, except PCL/QCh2 70/30, were non-cytotoxic toward fibroblasts (HDFn) and

keratinocyte (HaCaT). The presence of QCh conferred a hydrophilic character to the surface of the nonwoven, favoring HDFn and HaCaT cells adhesion and spreading, which did not occur in the nonwoven composed only by PCL. Taking into account the whole set of results, it is concluded that the PCL/QCh1 90/10 and PCL/QCh2 90/10 nonwovens showed the most promising characteristics to be used as wound dressings, since they have hydrophilic character, high hydration capacity, stability in aqueous medium, mechanical resistance, in dry and hydrated states, besides they were non-cytotoxic and favored the adhesion and proliferation of fibroblasts and keratinocytes.

Keywords: quaternized chitosan, microwave-assisted synthesis, nonwoven, electrospinning.

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1 – Representação esquemática simplificada da estrutura da pele</u>	21
<u>Figura 2 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrofiação</u>	25
<u>Figura 3 - Representação esquemática de coletores utilizados no processo de eletrofiação: (a) coletor estático, (b) coletor rolo giratório, (c) coletor disco giratório, (d) coletor de tambor de fio rotatório, (e) coletor imerso</u>	29
<u>Figura 4 - Estrutura da poli(ϵ-caprolactona)</u>	30
<u>Figura 5 – Estrutura idealizada da quitosana, em que “n” corresponde ao número de unidades GlcN e “n-1” refere-se às unidades GlcNAc</u>	32
<u>Figura 6 - Reação da quitosana com cloreto de glicidiltrimetilamônio para obtenção do cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana</u>	33
<u>Figura 7 - Espectros na região do infravermelho de quitosana (a) e das amostras de derivados quaternizados QCh1 (b), QCh2 (c), QCh1-AC (d) e QCh2-AC (e)</u>	46
<u>Figura 8 - Espectros RMN ^1H da quitosana (a) QCh8 (b) e QCh1-AC (c) em solução D₂O/HCl 1% (v/v) adquirido a 85 °C</u>	47
<u>Figura 9 - Superfícies de resposta mostrando o efeito da razão molar cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA)/Quitosana, tempo e temperatura nas variáveis resposta grau médio de quaternização (a, b, c), viscosidade intrínseca (d, e, f) e rendimento de reação (g, h, i)</u>	51
<u>Figura 10 – Solubilidade da quitosana e seus derivados em solução aquosa em função do pH</u>	54
<u>Figura 11 - Curvas TG (a) e DTG (b) da quitosana e dos derivados QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC, obtidas sob atmosfera de N₂ (vazão de 50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹</u>	55
<u>Figura 12 - Difrátogramas da quitosana e dos derivados QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC.</u>	57
<u>Figura 13 - Equipamento utilizado no processo de eletrofiação</u>	61
<u>Figura 14 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrofiação sendo que (A) e (B) representam os corpos de prova dos nãotecidos retirados nas direções perpendicular e paralela ao coletor, respectivamente</u>	67
<u>Figura 15 - Condutividade (A) e viscosidade dinâmica (B) das soluções poliméricas utilizadas no processo de eletrofiação</u>	71

<u>Figura 16 - Micrografia dos nãotecidos PCL/QCh (A) e correspondentes histogramas referentes a distribuição do diâmetro médio das fibras</u>	72
<u>Figura 17 - Distribuição de orientação das fibras representada como mapa codificado por cores</u>	74
<u>Figura 18 - Espectros FTIR-ATR do derivado QCh2 e dos nãotecidos compostos por PCL/QCh2 70/30 e PCL (A); região espectral entre 3000 — 3600 cm⁻¹ dos nãotecidos PCL/QCh2 (B)</u>	75
<u>Figura 19 - Grau de hidratação em função do tempo e da composição dos nãotecidos</u>	79
<u>Figura 20 - Taxa de transmissão ao vapor de água (TVA) dos nãotecidos. Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença com nível de significância de 5% pelo teste de <i>Tukey</i>.</u>	80
<u>Figura 21 - Curva de perda de massa dos nãotecidos em função do tempo de incubação a 37 °C em tampão fosfato (pH = 7,4) na ausência (a) e na presença de lisozima (b)</u>	81
<u>Figura 22 - Difratoograma de raios-X dos nãotecidos na região 5° < 2θ < 50° (a) e na região 20° < 2θ < 25° (b)</u>	84
<u>Figura 23 – Curvas TG (a) e DTG (b) dos nãotecidos à base de PCL/QCh obtidas sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.</u>	86
<u>Figura 24 - Curvas DSC dos nãotecidos PCL/QCh1 (A) e PCL/QCh2 (B) submetidos a ciclos de aquecimento e resfriamento sob atmosfera de nitrogênio (vazão: 50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento/resfriamento de 10 °C min⁻¹</u>	88
<u>Figura 25 - Comportamento mecânico dos nãotecidos à base de PCL/QCh secos (a, c, e) e após hidratação em tampão fosfato (b, d e f) nas direções perpendicular e paralela ao coletor</u>	91
<u>Figura 26 – Viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) (a) e queratinócitos humanos (HaCaT) (b) expostos a diferentes concentrações de extratos dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30</u>	94
<u>Figura 27 - Micrografias de fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) cultivados por 12 h sobre a superfície dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30</u>	96
<u>Figura 28 - Micrografias de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados por 12 h sobre a superfície dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30</u>	97

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1- Níveis das variáveis independentes estudadas no processo de síntese de cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh)</u>	41
<u>Tabela 2 - Variáveis independentes do planejamento fatorial com ponto central 2³ e resultados experimentais</u>	49
<u>Tabela 3 - Análise de variância para , viscosidade intrínseca e rendimento</u>	49
<u>Tabela 4 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica da quitosana e das amostras QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC</u>	55
<u>Tabela 5 – Valores dos parâmetros de tensão superficial dos líquidos de prova em mJ m⁻². = tensão superficial; = componente apolar; γ^{AB} = componente polar; = componente elétron doador; = componente elétron receptor</u>	64
<u>Tabela 6 - Diâmetro médio (nm) e coeficiente de coerência das fibras, porosidade e espessura dos nãotecidos</u>	73
<u>Tabela 7 - Ângulos de contato médio dos diferentes líquidos de prova em função da composição dos nãotecidos</u>	76
<u>Tabela 8 - Valores dos componentes da energia livre de superfície* e energia livre de interação (ΔG) dos nãotecidos em mJ m⁻²</u>	77
<u>Tabela 9 – Cristalinidade dos nãotecidos determinada a partir dos difratogramas conforme metodologia proposta por Gupta et al. (2012)</u>	85
<u>Tabela 10 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica dos nãotecidos à base de PCL/QCh</u>	87
<u>Tabela 11 - Entalpia de fusão e temperatura de fusão no primeiro ciclo de aquecimento (ΔH_{m1}, T_{m1}), entalpia de cristalização e temperatura de cristalização no ciclo de resfriamento (ΔH_c, T_c), entalpia de fusão e temperatura de fusão no segundo ciclo de aquecimento (ΔH_{m2}, T_{m2}) e grau de cristalinidade ($X_c(\%)$) dos nãotecidos</u>	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR-FTIR –Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier;

CGTMA – Cloreto de glicidiltrimetilamônio;

DSC – Calorimetria exploratória diferencial;

dTG – derivada primeira da curva termogravimétrica;

GIXRD – Difração de raios-X em ângulo rasante;

GlcN – 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose;

GlcNAc – 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose;

– Grau médio de desacetilação;

– Grau médio de polimerização;

– Grau médio de quaternização;

HaCaT – Queratinócitos humanos;

HDFn – Fibroblastos dérmicos humanos neonatais;

MEV – microscopia eletrônica de varredura;

PCL – Poli(ϵ -caprolactona);

Q – Quitosana;

QCh – Cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana;

RMN ^1H – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;

TG – termogravimetria;

TVA – Taxa de transmissão de vapor de água;

ΔG - energia livre de interação;

γ_{Total} – energia livre de superfície.

SUMÁRIO

<u>Apresentação</u>	17
<u>1 Motivação</u>	18
<u>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	20
<u>2 Introdução e Revisão Bibliográfica</u>	21
<u>2.1 Lesões de pele</u>	21
<u>2.2 Processo de cicatrização</u>	22
<u>2.3 Curativos empregados no tratamento de lesões de pele</u>	23
<u>2.4 Eletrofiação</u>	24
<u>2.4.1 Parâmetros de solução</u>	26
<u>2.4.1.1 Massa molar, concentração de polímero e viscosidade</u>	26
<u>2.4.1.2 Condutividade das soluções</u>	27
<u>2.4.1.3 Tensão superficial</u>	27
<u>2.4.2 Parâmetros de processo</u>	27
<u>2.4.2.1 Voltagem aplicada</u>	27
<u>2.4.2.2 Fluxo de solução polimérica</u>	28
<u>2.4.2.3 Distância de trabalho</u>	28
<u>2.4.2.4 Tipo de coletor</u>	28
<u>2.4.3 Parâmetros ambientais</u>	29
<u>2.4.4 Polímeros utilizados no processo de eletrofiação</u>	30
<u>2.5 Síntese de Cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana</u>	32
<u>2.6 Síntese de cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana assistida por irradiação de micro-ondas</u>	35
<u>3 Objetivos</u>	38
<u>3.1 Objetivo geral</u>	38
<u>3.2 Objetivos específicos</u>	38

<u>CAPÍTULO 2 - SÍNTESE DE CLORETO DE <i>N</i>-(2-HIDROXIL)-PROPIL-3-TRIMETILAMÔNIO QUITOSANA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS</u>	39
<u>4 Materiais e métodos</u>	40
<u>4.1 Materiais</u>	40
<u>4.2 Síntese do cloreto de <i>N</i>-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh)</u>	40
<u>4.3 Caracterizações</u>	41
<u>4.3.1 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</u>	41
<u>4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)</u>	42
<u>4.3.3 Determinação do grau médio de quaternização () por titulação condutimétrica</u>	42
<u>4.3.4 Viscosimetria capilar</u>	43
<u>4.3.5 Solubilidade em água</u>	43
<u>4.3.6 Análise termogravimétrica (TGA)</u>	44
<u>4.3.7 Difractometria de raios-X</u>	44
<u>4.4 Análise estatística</u>	44
<u>5 Resultados e Discussão</u>	45
<u>5.1 Caracterização espectroscópica da quitosana e dos derivados quaternizados</u>	45
<u>5.2 Análise estatística</u>	48
<u>5.3 Solubilidade em água</u>	53
<u>5.4 Análise termogravimétrica</u>	54
<u>5.5 Difração de raios-X</u>	56
<u>6 Conclusões parciais</u>	57
<u>CAPÍTULO 3 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NÃOTECIDOS À BASE DE POLI(ε-CAPROLACTONA)/CLORETO DE <i>N</i>-(2-HIDROXIL)-PROPIL-3-TRIMETILAMÔNIO QUITOSANA PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO</u>	59
<u>7 Materiais e métodos</u>	60
<u>7.1 Materiais</u>	60
<u>7.2 Processo de eletrofiação</u>	60

<u>8</u>	<u>Caracterizações</u>	61
8.1.1	<u>Viscosidade e condutividade das soluções poliméricas utilizadas no processo de eletrofição</u>	61
8.1.2	<u>Morfologia das fibras</u>	62
8.1.3	<u>Medidas de espessura</u>	62
8.1.4	<u>Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)</u>	62
8.1.5	<u>Porosidade dos nãotecidos</u>	63
8.1.6	<u>Medidas de ângulo de contato, energia livre de superfície e energia livre de interação (ΔG)</u>	63
8.1.7	<u>Perfil de hidratação</u>	64
8.1.8	<u>Taxa de transmissão de vapor de água (TVA)</u>	65
8.1.9	<u>Degradação enzimática</u>	65
8.1.10	<u>Difração de raios-X em ângulo rasante (GIXRD)</u>	66
8.1.11	<u>Análise termogravimétrica (TGA)</u>	66
8.1.12	<u>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</u>	66
8.1.13	<u>Propriedades mecânicas: Ensaios de tração</u>	67
8.1.14	<u>Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos nãotecidos</u>	68
8.1.15	<u>Ensaios de adesão celular</u>	69
8.2	<u>Análise estatística</u>	69
<u>9</u>	<u>Resultados e discussões</u>	69
9.1	<u>FTIR-ATR</u>	74
9.2	<u>Ângulo de contato, energia de superfície e energia livre de interação (ΔG)</u>	76
9.3	<u>Capacidade de hidratação dos nãotecidos</u>	78
9.4	<u>Taxa de transmissão de vapor de água (TVA)</u>	80
9.5	<u>Degradação enzimática</u>	81
9.6	<u>Difração de raios-X com incidência rasante (GIXRD)</u>	83
9.7	<u>Análise termogravimétrica</u>	85

<u>9.8</u>	<u>Calorimetria exploratória diferencial</u>	88
<u>9.9</u>	<u>Análises mecânicas</u>	90
<u>9.10</u>	<u>Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i></u>	93
<u>10</u>	<u>Conclusões parciais</u>	98
	<u>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS</u>	99
	<u>Referências Bibliográficas</u>	102

Apresentação

Com o intuito de facilitar a compreensão e organização dos assuntos tratados nesta tese, a mesma foi dividida em três capítulos, além da motivação, objetivos, conclusões gerais e perspectivas. No capítulo 1, são apresentadas a fundamentação teórica e revisão bibliográfica dos principais tópicos abordados nesse trabalho. O capítulo 2 contempla o estudo da síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana em meio ácido sob irradiação de micro-ondas. Já o terceiro capítulo foi dedicado ao estudo de obtenção de não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona) (PCL)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) empregando processo de eletrofiação. Ao final é feita uma conclusão geral dos estudos realizados.

1 Motivação

O tratamento de lesões de pele representa grande desafio, principalmente no caso de feridas graves e de difícil cicatrização e, embora haja diversos tipos de curativos disponíveis comercialmente, ainda há grande demanda para o desenvolvimento de materiais que possam proporcionar cicatrização de maneira rápida e efetiva, além de reduzir os riscos para o paciente (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016).

Materiais nanoestruturados à base de polímeros naturais, especialmente polissacarídeos, têm sido amplamente estudados para aplicação como curativos multifuncionais no tratamento de lesões de pele. Diversas técnicas têm sido empregadas para o desenvolvimento desse tipo de material, com destaque para a eletrofiação, que consiste em técnica simples e de baixo custo para produção de estruturas planas, flexíveis e porosas, formadas por manta de micro/nanofibras (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014). Tais sistemas têm despertado grande interesse, pois apresentam estrutura similar à matriz extracelular, elevadas razão área superficial/volume e porosidade, o que facilita a permeação de gases, o transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio de umidade no leito da ferida, e, portanto, favorecem a regeneração do tecido lesado (MELE, 2016; RIEGER; BIRCH; SCHIFFMAN, 2013).

Em função de sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, ação hemostática, mucoadesividade e hidrofiliabilidade, cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) consiste em matéria-prima promissora para produção de materiais funcionais empregando a técnica de eletrofiação a serem aplicados como curativos (WU et al., 2007; SONIA; SHARMA, 2011; RUIHUA et al., 2012; YAN et al., 2017). Contudo, o uso desse derivado para produção de nãotecidos utilizando eletrofiação representa grande desafio em função da elevada repulsão entre os grupos carregados (ALIPOUR et al., 2009; IGNATOVA et al., 2010; IGNATOVA; MANOLOVA; RASHKOV, 2007), sendo necessário o uso de polímero não-carregado, como é o caso da poli(ϵ -caprolactona) empregada no presente estudo, para tornar a solução eletrofiável. O uso da poli(ϵ -caprolactona) justifica-se também por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, além do fato de que os materiais obtidos por eletrofiação a partir desse polímero apresentam propriedades mecânicas adequadas para serem utilizados como curativos (CIPITRIA et al., 2011; LEE et al., 2016; BASAR et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

O estudo da síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) em meio ácido sob irradiação de micro-ondas pode resultar em método alternativo

promissor para produção desse derivado quaternizado. A utilização de irradiação de micro-ondas como forma de aquecimento é interessante no sentido de reduzir o tempo reacional e a ocorrência de reações indesejáveis, aumentando, assim, o rendimento do processo quando comparado às metodologias de aquecimento usualmente empregadas (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013).

Neste contexto, o segundo capítulo desse trabalho foi voltado ao estudo da síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana em meio ácido sob irradiação de micro-ondas e avaliação, por meio do uso de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta, dos efeitos dos parâmetros reacionais razão molar quitosana/cloreto de glicidiltrimetilamônio, tempo e temperatura no rendimento reacional, no grau médio de quaternização e na viscosidade intrínseca do derivado QCh.

O terceiro capítulo foi dedicado ao estudo da obtenção de não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona) (PCL)/Cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) empregando processo de eletrofição. Duas amostras de QCh possuindo diferentes características estruturais (grau médio de quaternização () e grau médio de polimerização ()) foram sintetizadas, dissolvidas em diferentes proporções mássicas com poli(ϵ -caprolactona) em solução ácido acético/ácido fórmico 60/40 (v/v) e eletrofiadas.

Do nosso conhecimento, não há relatos na literatura de síntese de QCh em meio ácido sob irradiação de micro-ondas e abordagem matemática-estatística para avaliação dos efeitos dos parâmetros reacionais da síntese realizada nessas condições sobre propriedades desse derivado quaternizado de quitosana. Adicionalmente, também não há relatos de produção por eletrofição de não tecidos compostos por micro/nanofibras à base de poli(ϵ -caprolactona) (PCL)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh).

Capítulo 1 - Introdução e Revisão bibliográfica

2 Introdução e Revisão Bibliográfica

2.1 Lesões de pele

A pele representa cerca de 15% da massa corporal total de um adulto, sendo considerada o maior órgão do corpo humano, e é composta por duas camadas distintas denominadas epiderme e derme, as quais são sustentadas pela hipoderme (Figura 1) (ZAIDI; LANIGAN, 2010).

Figura 1 – Representação esquemática simplificada da estrutura da pele

Fonte: Adaptado de Zaidi e Lanigan (2010).

A epiderme representa a camada mais externa da pele, sendo constituída principalmente por queratinócitos. A derme, por sua vez, está localizada logo abaixo da epiderme e é formada por matriz extracelular, cujos componentes são a substância fundamental, constituída principalmente por glicosaminoglicanos, e rede de fibras colágenas e elásticas, além de células residentes (macrófagos, adipócitos e fibroblastos). Por outro lado, a hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e não faz parte da pele, sendo responsável pela fixação da derme à musculatura subjacente ou ao osso. Na pele são observadas também estruturas acessórias, tais como glândulas, pelos e músculo eretor dos pelos (VANPUTTE; REGAN; RUSSO, 2016; ZAIDI; LANIGAN, 2010).

A pele tem como funções a proteção contra micro-organismos, agentes físicos e químicos, prevenção da desidratação, regulação da temperatura corpórea, excreção de metabólitos e produção de vitamina D. Adicionalmente, a pele possui receptores sensoriais que são responsáveis pela detecção de calor, frio, tato, pressão e dor (VANPUTTE; REGAN; RUSSO, 2016).

Lesões de pele consistem em ruptura da estrutura anatômica desse órgão com consecutiva perda de suas funções e, dependendo da extensão da área afetada, podem ser

classificadas em: *i)* lesões superficiais, quando ocorrem danos à epiderme e derme; *ii)* lesões profundas superficiais, nas quais ocorre a destruição da epiderme, da derme e da hipoderme; *iii)* lesões profundas totais, em que também ocorrem danos no tecido muscular e suas estruturas adjacentes, como tendões, cartilagens e ossos (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2009; BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016).

As lesões de pele também são classificadas em função do tempo requerido para cicatrização em agudas ou crônicas. Lesões agudas são decorrentes de estresses mecânicos (abrasões, lacerações, incisões e contusões) e exposição a produtos químicos corrosivos, calor e choque elétrico. O processo de cicatrização desse tipo de lesão requer de 8 a 12 semanas. Por outro lado, o processo de cicatrização de lesões crônicas é lento e superior a 12 semanas. A persistência desse tipo de lesão pode ser decorrente de trauma repetitivo ou pressão prolongada na região afetada ou de determinadas patologias, tais como insuficiência vascular arterial ou venosa, infecções prolongadas, e diabetes (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; MELE, 2016).

2.2 Processo de cicatrização

O processo de cicatrização de lesões de pele envolve quatro etapas sucessivas e sobrepostas, a saber, hemostase, inflamação, granulação e remodelação (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016). Imediatamente após a lesão, ocorre vasoconstrição, liberação de fatores que promovem a coagulação do sangue e início da formação de trombo rico em plaquetas. Esse trombo é rapidamente infiltrado por fibrina e eritrócitos dando origem ao trombo vermelho que, além de auxiliar na contenção da perda de sangue, consiste em matriz preliminar que atua como suporte para células inflamatórias, tais como neutrófilos e monócitos (MELE, 2016; REINKE; SORG, 2012).

Durante a fase inflamatória, sinalizadores são liberadas pelas plaquetas atraindo neutrófilos, os quais atuam inibindo o crescimento de micro-organismos e iniciam o desbridamento. Concomitantemente, monócitos são diferenciados em macrófagos que dão continuidade ao processo de desbridamento e secreta citocinas e fatores de crescimento que estimulam a migração de fibroblastos e células epiteliais para a região da lesão (MELE, 2016; SINNO; PRAKASH, 2013). Essas células em conjunto com queratinócitos são essenciais na fase de proliferação que é caracterizada pela reepitelização, angiogênese, síntese de matriz extracelular e formação do tecido de granulação. Ao final da fase de proliferação, o leito da ferida é totalmente preenchido por tecido de granulação, a circulação é reestabelecida e fibroblastos tendem a se diferenciar em miofibroblastos, os quais atuam na contração da

ferida e remodelação da matriz extracelular. Durante a fase de remodelação, acentua-se a deposição de colágeno no tecido de granulação e ocorre apoptose de macrófagos, miofibroblastos e células endoteliais e, por fim, a formação da cicatriz (REINKE; SORG, 2012; MELE, 2016).

Embora a pele geralmente seja capaz de regenerar-se após lesão, esta habilidade pode ser afetada em certas condições tais como infecções persistentes, trombozes, diabetes, edemas ou pressão local prolongada, devido ao uso de alguns tipos de medicamentos bem como em consequência da perda de regiões extensas de pele. Sem tratamentos adequados, o processo de regeneração da região afetada é dificultado, sendo necessário o uso de curativos (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; SONG et al., 2016).

2.3 Curativos empregados no tratamento de lesões de pele

Curativos exercem papel fundamental no tratamento de lesões de pele e devem ser selecionados de acordo com o tipo de lesão, *i. e.* se a lesão é superficial ou profunda, se é seca ou se libera grande quantidade de exsudados, se está infectada ou não, de modo a proporcionar a regeneração do tecido lesado da maneira mais rápida e efetiva (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2009; ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014).

Os curativos podem ser classificados conforme a atividade em passivos, interativos e bioativos (ZAHEDI et al., 2009). Curativos passivos não participam da reparação tecidual, limitando-se às funções de oclusão, proteção mecânica da ferida e absorção não controlada de exsudados, sendo a gaze exemplo desse tipo de material. Por outro lado, curativos interativos mantêm o equilíbrio de umidade e temperatura no leito da ferida, permitem a permeação de vapor de água e oxigênio, além de atuar como barreira à penetração de micro-organismos no leito da ferida, criando, assim, condições propícias para a cicatrização. Exemplos desse tipo de curativo são filmes e espumas semipermeáveis à base de poliuretano comercialmente disponíveis como Tegaderm™ (3M Health Care, Saint Paul, MN) e Allevyn™ (Smith and Nephew, Hull, UK), respectivamente. Já os curativos bioativos, além de controlar o ambiente do leito da ferida, estimulam direta ou indiretamente a cicatrização, podendo conter agentes antimicrobianos e fatores de crescimento em sua formulação. Exemplos comerciais desse tipo de curativo são o Kaltostat (Conva Tec, Princeton, NJ), composto de fibras à base de alginato, e o Aquacel (Conva Tec, Princeton, NJ), constituído por fibras de carboximetilcelulose impregnadas com prata na forma iônica (ZAHEDI et al., 2009; ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014; BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016).

De maneira geral, o curativo deve ser seguro para o paciente, ser clinicamente efetivo e de fácil manipulação, aplicação e remoção. Em uma situação ideal, curativos devem atuar como proteção física e contra micro-organismos, propiciar alívio da dor, possibilitar a permeação de oxigênio e nutrientes e manter o equilíbrio de umidade, calor e pH no leito da ferida (WIEGAND; HIPLER, 2010; MELE, 2016). Adicionalmente, devem apresentar atividade hemostática, degradação controlada, propriedades mecânicas adequadas, acelerar o processo de cicatrização e possuir arquitetura com capacidade para suportar a adesão, proliferação e diferenciação celular (MELE, 2016). Embora diversos tipos de dispositivos destinados à regeneração de lesões encontrem-se comercialmente disponíveis, nenhum deles possui todas as propriedades mencionadas acima.

Diversas estratégias têm sido empregadas para o desenvolvimento de curativos multifuncionais que apresentem bioatividade. Nãotecidos são estruturas planas, flexíveis e porosas, formadas por manta de fibras ou filamentos dispostos de forma orientada ou randômica (NBR13370, 2002). Nãotecidos compostos por micro/nanofibras produzidas por processo de eletrofiação têm despertado grande interesse devido ao fato que esses materiais apresentam estrutura similar à matriz extracelular da pele que, por sua vez, desempenha papel fundamental durante o processo de cicatrização de feridas e atua como suporte (*scaffold*) que fornece condições para a adesão, proliferação e diferenciação celular (ABRIGO, MARTINA; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014; MELE, 2016). Adicionalmente, nãotecidos apresentam elevadas razão área superficial/volume e porosidade, o que facilita a permeação de gases, o transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio de umidade no leito da ferida (HASSIBA *et al.*, 2016; MELE, 2016; RIEGER; BIRCH; SCHIFFMAN, 2013).

2.4 Eletrofiação

A Eletrofiação (*electrospinning*) consiste em técnica simples e de baixo custo que possibilita a preparação de fibras com diâmetro variando da ordem de micrômetros a alguns nanômetros. O início dessa técnica remonta aos estudos desenvolvidos por Rayleigh em 1882 (RAYLEIGH, 1882) e por John Zeleny em 1914 (ZELENY, 1914), os quais deram grandes contribuições para a compreensão do comportamento de fluidos sob ação de um campo elétrico. Posteriormente, na década de 1930, patentes descrevendo o aparato experimental utilizado para eletrofiação foram depositadas por Antom Formhals (FORMHALS, 1934, 1937, 1939). Na década de 1960, Sir Geoffrey Taylor contribuiu significativamente para o desenvolvimento da técnica de eletrofiação através de seus estudos relacionados à modelagem matemática do cone formado por uma gota sob a ação de um campo elétrico, o qual mais

tarde foi denominado cone de Taylor, e o comportamento de jatos de solução polimérica eletricamente carregados (TAYLOR, 1964, 1969; TAYLOR; VAN DYKE, 1966).

A partir da década de 1990 houve expressivo aumento nas pesquisas envolvendo a técnica de eletrofiação para obtenção de materiais formados por micro/nanofibras poliméricas destinados aos mais variados tipos de aplicações, tais como engenharia de tecidos, curativos, tratamento de água e sensores eletroquímicos (MERCANTE et al., 2017; XUE et al., 2017). O arranjo experimental típico utilizado em eletrofiação está representado na Figura 2 e consiste de uma fonte de alta voltagem, um recipiente para a solução, capilar e coletor metálicos, sendo que este último pode ser de diversos formatos (cilíndrico ou plano, por exemplo) e dimensões. Além disso, eletrodos conectam o capilar ao coletor completando um circuito para geração de um campo elétrico (AGARWAL; GREINER; WENDORFF, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrofiação

Fonte: Adaptado de Vatankhah et al. (2014).

No processo de eletrofiação, a solução polimérica é injetada sob fluxo controlado através do capilar e tende a formar uma gota na ponta do capilar, a qual é mantida pela tensão superficial. A alta voltagem, da ordem de 5 a 30 kV, que é aplicada entre o capilar e coletor, resulta em incremento na densidade de carga de mesmo sinal na superfície da gota de solução polimérica (MELE, 2016; SUN *et al.*, 2014). A repulsão entre essas cargas gera forças eletrostáticas que contrapõe às forças de tensão superficial, o que resulta na distorção da geometria da gota. Quando o potencial elétrico da superfície é suficientemente alto, as forças eletrostáticas superam a tensão superficial, resultando em deformação da gota para forma de cone, denominado cone de Taylor, a partir do qual são ejetados jatos finos de solução polimérica eletricamente carregada (RENEKER; YARIN, 2008; AGARWAL; GREINER;

WENDORFF, 2013). Esses jatos se movem em direção ao coletor e durante essa fase são alongados e chicoteados de modo a resultar na evaporação do solvente, o que leva à deposição de micro/nanofibras sobre a superfície do coletor comumente como um não tecido (RIEGER; BIRCH; SCHIFFMAN, 2013).

A obtenção de fibras a partir de soluções poliméricas pela técnica de eletrofiação envolve uma série de parâmetros, os quais são categorizados em parâmetros de solução (*e.g.* concentração polimérica, viscosidade e condutividade), parâmetros de processo (*e.g.* diâmetro do capilar, vazão de solução polimérica, distância agulha-coletor, voltagem aplicada e tipo de coletor) e parâmetros do ambiente (temperatura e umidade relativa). O ajuste desses parâmetros possibilita o controle da morfologia, diâmetro médio e orientação das fibras, bem como as características dos não tecidos obtidos. Abaixo serão apresentados os principais efeitos desses parâmetros na formação e morfologia das fibras obtidas por eletrofiação.

2.4.1 Parâmetros de solução

Os parâmetros de solução estão associados às propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações polímero-solvente (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). A primeira etapa no processo de eletrofiação consiste na dissolução do polímero em solvente, ou mistura de solventes, apropriado. O solvente deve apresentar volatilidade adequada e sua escolha afeta propriedades importantes da solução, tais como tensão superficial, viscosidade e condutividade, as quais exercem efeito significativo na formação e morfologia das fibras (XU et al., 2017).

2.4.1.1 Massa molar, concentração de polímero e viscosidade

A formação de fibras homogêneas, com morfologia cilíndrica e sem a presença de defeitos (denominados *beads*), requer o emaranhamento de número suficiente de cadeias poliméricas. A ocorrência desse emaranhamento depende principalmente da massa molar e concentração de polímero que, por sua vez, definem a viscosidade da solução. Para uma dada concentração, a densidade de emaranhamento aumenta com o incremento da massa molar. De modo similar, mantendo a massa molar do polímero fixa, há aumento da densidade de emaranhamento com o incremento da concentração polimérica (SHENOY et al., 2005). De maneira geral, baixa massa molar e/ou baixa concentração polimérica resulta em menor viscosidade das soluções, o que favorece a formação de fibras com menor diâmetro, a ocorrência de *beads* nas fibras, e a dispersão da solução na forma de aerossol

(*electrospraying*). Por outro lado, fibras homogêneas, sem *beads* e com maior diâmetro são obtidas com o aumento da viscosidade, o que está associado ao aumento do grau de emaranhamento das cadeias poliméricas e consequente aumento da estabilidade dos jatos formados. É importante enfatizar que se a viscosidade da solução polimérica é muito elevada, isso pode resultar em ramificação das fibras e até mesmo impedir a eletrofiação (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

2.4.1.2 Condutividade das soluções

A condutividade elétrica das soluções exerce influência significativa na morfologia das fibras e está relacionada ao tipo de polímero, ao solvente utilizado e à presença de substâncias iônicas no meio (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). O aumento da condutividade geralmente está associado à redução do diâmetro médio das fibras. Esse comportamento é atribuído à maior densidade de carga da solução que leva ao maior alongamento do jato polimérico resultando em segmentos menos espessos e, por consequência, em menor diâmetro de fibra (SUN et al., 2014). Contudo, condutividade acima de um valor crítico pode ocasionar maior instabilidade dos jatos e levar à formação de fibras com distribuição de diâmetro médio mais heterogênea e, em alguns casos, impedir o processo de eletrofiação (HAYATI; BAILEY; TADROS, 1987; BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

2.4.1.3 Tensão superficial

A tensão superficial da solução está relacionada principalmente ao tipo de solvente utilizado (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Para que ocorra a formação do jato de solução polimérica é necessário que as forças eletrostáticas envolvidas no processo de eletrofiação superem a tensão superficial da solução (RENEKER; YARIN, 2008). Dessa forma, a redução da tensão superficial geralmente contribui para a formação de jatos mais estáveis e, consequentemente, de fibras mais homogêneas e sem *beads* (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). No entanto, é importante ressaltar que nem sempre a solução de menor tensão superficial é mais adequada no processo de eletrofiação, pois pode ocorrer predomínio das propriedades viscoelásticas da solução sobre a tensão superficial (SUN et al., 2014).

2.4.2 Parâmetros de processo

2.4.2.1 Voltagem aplicada

Para que ocorra o processo de eletrofiação é necessária a aplicação de uma voltagem crítica que gere forças eletrostáticas sobre a gota de solução superiores às originadas da tensão superficial e resulte na ejeção de jatos de solução polimérica (SUN et al., 2014). Não há consenso na literatura sobre a influência da voltagem aplicada sobre a morfologia e diâmetro das fibras. Alguns autores sugerem que alta voltagem favorece a ejeção de maior quantidade de solução polimérica e, portanto, a formação de fibras com maior diâmetro. Por outro lado, há estudos indicando que o aumento da voltagem aplicada resulta em maior alongamento dos jatos de solução polimérica em decorrência da maior intensidade das forças eletrostáticas e, então, leva à formação de fibras com menor diâmetro e com defeitos (*beads*) (DEITZEL et al., 2001; RENEKER; YARIN, 2008; BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

2.4.2.2 Fluxo de solução polimérica

O fluxo de solução polimérica através do capilar exerce grande influência na morfologia das fibras. Fibras com distribuição de diâmetro homogênea e sem defeitos são formadas em valor de fluxo crítico que depende dos parâmetros de solução, dos demais parâmetros de processo e parâmetros de ambiente (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015). O aumento do fluxo acima desse valor crítico resulta em fibras com maiores diâmetros e com defeitos (*beads*) devido à secagem incompleta do jato de solução durante o percurso entre a ponta do capilar e o coletor metálico (PHAM; SHARMA; MIKOS, 2006; PELIPENKO et al., 2013).

2.4.2.3 Distância de trabalho

A distância entre a ponta do capilar e o coletor, denominada distância de trabalho, deve apresentar valor adequado para garantir a total evaporação do solvente (PELIPENKO et al., 2013). Distância de trabalho muito pequena pode resultar em fibras com maior diâmetro, mais achatadas e com defeitos (GENG; KWON; JANG, 2005; MERCANTE et al., 2017). Por outro lado, o aumento da distância de trabalho pode inicialmente resultar na redução do diâmetro de fibra até atingir um limite no qual o campo elétrico não seja efetivo para estabilizar o cone de Taylor e, conseqüentemente, ocorrer formação de fibras com defeitos e até mesmo impedir o processo de eletrofiação (SUN et al., 2014; HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

2.4.2.4 Tipo de coletor

Diversos tipos de coletores podem ser utilizados no processo de eletrofiação e são definidos conforme a aplicação final desejada. Geralmente coletores estáticos revestidos com folhas de alumínio (Figura 3a) são utilizados e possibilitam a deposição de fibras de forma randômica (MERCANTE et al., 2017). Contudo, há outros tipos de coletores que permitem a obtenção de fibras dispostas de forma alinhada como os coletores rolo rotatório (Figura 3b), disco rotatório (Figura. 3c) e tambor de fio rotatório (Figura. 3d) (HE; NIE; FENG, 2014). Adicionalmente, há coletores que possibilitam a obtenção de estruturas esponjosas compostas por fibras, como é o caso coletor imerso (Figura. 3e) (KI et al., 2007).

Figura 3 - Representação esquemática de coletores utilizados no processo de eletrofiação: (a) coletor estático, (b) coletor rolo giratório, (c) coletor disco giratório, (d) coletor de tambor de fio rotatório, (e) coletor imerso

Fonte: Adaptado de He; Nie; Feng (2014) e KI et al., (2007).

2.4.3 Parâmetros ambientais

Parâmetros ambientais, principalmente temperatura e umidade relativa, podem influenciar na formação e morfologia de fibras *via* eletrofiação (PELIPENKO et al., 2013). A temperatura afeta a viscosidade da solução e a taxa de evaporação do solvente. O aumento da temperatura da solução favorece a formação de fibras com diâmetros menores devido à redução da viscosidade. Por outro lado, a redução da temperatura leva à redução da taxa de evaporação do solvente e, conseqüentemente, maior alongamento do jato de solução polimérica antes de chegar ao coletor, o que resulta em fibras com diâmetros menores (DE VRIEZE et al., 2009).

O efeito da umidade relativa na morfologia das fibras depende da composição da solução polimérica. Quando polímeros hidrofóbicos são eletrofiados em ambiente com alta umidade relativa ocorre a formação de poros na superfície das fibras. Esse comportamento é atribuído ao fato da água atuar como um não-solvente e favorecer a formação de um filme na superfície do jato eletrificado. A presença desse filme leva à formação de poros na superfície da fibra para permitir a evaporação do solvente no interior do jato e solidificação da fibra (MEDEIROS et al., 2008). Adicionalmente, o aumento da umidade relativa está associado à redução do diâmetro médio das fibras. De acordo com Pelipenko *et al.* (2013), esse comportamento é atribuído à menor taxa de evaporação do solvente em ambientes com maior umidade relativa levando à solidificação mais lenta do jato polimérico que, por sua vez, é submetido por maior tempo às forças eletrostáticas, resultando, assim, no alongamento do jato e consequente redução do diâmetro da fibra.

2.4.4 Polímeros utilizados no processo de eletrofiação

Nãotecidos obtidos por eletrofiação são produzidos a partir de polímeros sintéticos, naturais ou de misturas de ambos. Os polímeros sintéticos típicos utilizados em eletrofiação voltada para o desenvolvimento de materiais destinados a aplicações biomédicas são o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (HU et al., 2014; SHAHVERDI et al., 2014; FERNANDES et al., 2016; NARAYANAN et al., 2016; VALENTE et al., 2016).

A poli(ϵ -caprolactona) (Figura 4) é um poliéster alifático linear composto por unidades repetitivas de hexanoato sintetizado através da polimerização de abertura de anel da ϵ -caprolactona (LABET; THIELEMANS, 2009).

Figura 4 - Estrutura da poli(ϵ -caprolactona)

Fonte: Adaptado de Cipitria et al. (2011).

A poli(ϵ -caprolactona) é semi-cristalina, biocompatível, biodegradável e é considerada um polímero de baixo custo quando comparada a outros poliésteres alifáticos. Materiais obtidos a partir desse polímero apresentam propriedades mecânicas adequadas para uma

variedade de aplicações biomédicas (CIPITRIA et al., 2011). Em função dessas características, a poli(ϵ -caprolactona) tem sido um dos polímeros sintéticos mais empregados em eletrofiação, isoladamente ou em combinação com outros polímeros sintéticos ou naturais, para produção de nãotecidos porosos compostos por micro/nanofibras destinados à regeneração tecidual (CIPITRIA et al., 2011; LEE et al., 2016; BASAR et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

Apesar de nãotecidos compostos somente por poli(ϵ -caprolactona) serem biocompatíveis, biodegradáveis e apresentarem adequadas propriedades mecânicas, o caráter hidrofóbico desse polímero limita sua molhabilidade e dificulta a adesão celular e, portanto, a regeneração do tecido lesado (GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2008). A eletrofiação de blendas compostas por poli(ϵ -caprolactona) e polímeros naturais consiste em uma das estratégias utilizadas para obtenção de biomateriais com propriedades mecânicas adequadas e características que favoreçam a regeneração tecidual. Dentre os polímeros naturais utilizados, pode-se citar a fibroína de seda (LEE et al., 2016) e quitosana (ZHOU et al., 2017).

Polímeros naturais têm sido extensivamente utilizados para a produção de biomateriais utilizando a técnica de eletrofiação. Além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, alguns polímeros naturais possuem atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; HU et al., 2014; MELE, 2016). Os polímeros naturais tipicamente utilizados compreendem proteínas tais como colágeno e fibroína de seda, além de polissacarídeos, dentre os quais a celulose, alginato, quitina e quitosana são os mais empregados (FREY, 2008; ELSABEE; NAGUIB; MORSI, 2012; BARBER et al., 2013; NISTA; BETTINI; MEI, 2015; OHKAWA, 2015; BABITHA et al., 2017).

Polissacarídeos quimicamente modificados, tal como o acetato de celulose, também são utilizados para a produção de biomateriais *via* eletrofiação. Cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh), é um derivado catiônico de quitosanas, i. e. que possui cargas positivas permanentes ao longo de suas cadeias poliméricas, que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, ação hemostática, mucoadesividade e hidrofiliidade (XU et al., 2003; SONIA; SHARMA, 2011; PRADO; MATULEWICZ, 2014; YAN et al., 2017), que o torna uma potencial matéria-prima para produção de materiais funcionais a serem aplicados na regeneração de tecidos. No entanto, tentativas de eletrofiar soluções de derivados quaternizados de quitosanas foram infrutíferas devido à elevada repulsão entre os grupos carregados, sendo necessária a adição de polímeros não-carregados, tais como poli(ácido lático) e poli(álcool vinílico) para tornar a solução

eletrofiável (ALIPOUR et al., 2009; IGNATOVA et al., 2010; IGNATOVA; MANOLOVA; RASHKOV, 2007).

Considerando as qualidades, as potencialidades e as limitações acima descritas em relação à poli(ϵ -caprolactona) e ao derivado quaternizado de quitosana, é interessante buscar a combinação desses dois polímeros visando associar as citadas vantagens e superar as limitações para resultar em material que apresente compatibilidade tecidual e propriedades mecânicas adequadas.

Diante do grande potencial do cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana como matéria-prima para elaboração de dispositivos biomédicos, no próximo tópico será dado enfoque à síntese e características desse derivado de quitosanas, tema que constitui objeto de estudo de parte do presente trabalho.

2.5 Síntese de Cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana

Quitosanas são copolímeros lineares formados por unidades 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 5), com predomínio de unidades GlcN (RINAUDO, 2006). Quitosanas são encontradas em algumas espécies de fungos, sendo geralmente preparadas a partir da reação de *N*-desacetilação da quitina, polissacarídeo abundante em exoesqueletos de crustáceos, insetos e moluscos (RINAUDO, 2006; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008).

Figura 5 – Estrutura idealizada da quitosana, em que “n” corresponde ao número de unidades GlcN e “n-1” refere-se às unidades GlcNAc

Fonte: adaptado de Dash *et al.* (2011).

Propriedades como atoxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana fazem das quitosanas um material promissor para várias aplicações biomédicas (DASH et al., 2011; NGO et al., 2015; BANO et al., 2017; MUXIKA et al., 2017)

No entanto, a baixa solubilidade das quitosanas em meio neutro e alcalino reduz as potenciais aplicações desse polímero (MOURYA; INAMDAR, 2008; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; CHEN et al., 2016). Nesse sentido, estratégias de modificação química das quitosanas são empregadas com o propósito de conferir novas propriedades (*e.g.* solubilidade em meio neutro e alcalino) e de potencializar as já existentes (*e.g.* atividade antimicrobiana e mucoadesividade) (WANG et al., 2016; PAVINATTO et al., 2017).

Modificações químicas das quitosanas envolvendo o grupo —NH_2 ligado ao C2 da unidade GlcN e os grupos —OH ligados aos carbonos C3 e C6 são as mais usuais (ALVES; MANO, 2008; ZHU et al., 2016). Dentre essas modificações, pode-se citar a carboximetilação (BUKZEM et al., 2016), quaternização (SENRA et al., 2015) e peguilação (Casettari et al., 2010) da quitosana. Cloreto de *N*-(2-hidroxil) propil-3-trimetilamônio (QCh) consiste em um derivado quaternizado de quitosanas preparado pela reação de quitosanas com cloreto de glicidiltrimetilamônio (Figura 6). Esse derivado apresenta solubilidade em ampla faixa de pH e atividade antibacteriana, mucoadesividade, hidrofiliabilidade e ação hemostática potencializadas quando comparado às quitosanas (WU et al., 2007; SONIA; SHARMA, 2011; RUIHUA et al., 2012; YAN et al., 2017).

Figura 6 - Reação da quitosana com cloreto de glicidiltrimetilamônio para obtenção do cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana

Fonte: Adaptado de Ruihua et al. (2012).

Assim como nas quitosanas, as propriedades físico-químicas e atividades biológicas do QCh são regidas pela massa molar e grau médio de desacetilação () que consiste no número médio de unidades glucosamina na cadeia do polímero. Adicionalmente, essas propriedades são fortemente dependentes do grau médio de substituição (), também denominado grau médio de quaternização () no caso de QCh, que está associado ao número médio de unidades da cadeia do derivado contendo grupos com carga permanente positiva (CHO et al., 2006; HUANG et al., 2014; SVIRSHCHEVSKAYA et al., 2016).

A solubilidade em água do QCh aumenta com o aumento do grau de quaternização (CHO et al., 2006). De maneira geral, o aumento do também resulta em aumento da atividade antibacteriana (TAN et al., 2013). Contudo, derivados com elevado apresentam maior citotoxicidade em relação a diferentes tipos de células (WONGWANAKUL, RATJIKA *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2012). O estudo realizado por Faizuloev *et al.* (2012) demonstrou que, mantendo o grau de quaternização fixo em 90%, derivados QCh com elevada massa molar são mais citotóxicos quando comparados aos de menor massa molar. A degradação das quitosanas e seus derivados quaternizados no corpo humano é realizada principalmente pela ação da lisozima e é dependente, dentre outros fatores, do grau médio de desacetilação (), sendo verificado que derivados com elevado são menos suscetíveis à ação dessa enzima (VERHEUL et al., 2009; KEAN; THANOU, 2010).

As condições de reação definem a regioseletividade da síntese e o grau médio de substituição do derivado resultante. Além disso, também afetam o grau de despolimerização da cadeia das quitosanas e, portanto, a massa molar do derivado quaternizado. O pH do meio, temperatura e tempo reacional bem como a razão molar quitosana/cloreto de glicidiltrimetilamônio são os principais fatores que influenciam a síntese de QCh (RUIHUA et al., 2012; LI et al., 2014).

A síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana em meio neutro ou básico pode resultar em reações colaterais, como degradação da quitosana e formação de cloreto de 2,3-dihidroxipropil trimetilamônio, além de reduzir a formação do derivado quaternizado e diminuir a regioseletividade em relação ao grupo amino (RUIHUA et al., 2012; PRADO; MATULEWICZ, 2014). Nesse sentido, rotas de síntese empregando meio ácido têm sido propostas, resultando em derivados com elevado grau médio de substituição aumentando a regioseletividade em relação ao grupo amino e reduzindo a formação de produtos indesejados, sendo, portanto, vantajosas em relação ao uso de meio neutro ou básico (CHO et al., 2006; RUIHUA et al., 2012; PRADO; MATULEWICZ, 2014).

Os processos comumente empregados para a produção de QCh requerem temperatura relativamente elevada (60 - 85° C) e tempo reacional longo (4 - 10 h) (LOUBAKI; OUREVITCH; SICSIC, 1991; RUIHUA *et al.*, 2012; SONIA; SHARMA, 2011; SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004; WU; SU; MA, 2006; WU *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2010). Em tais condições, a ocorrência de reações colaterais, tais como a despolimerização da quitosana e hidrólise do cloreto de glicidiltrimetilamônio, afetam negativamente tanto o rendimento do processo quanto as características do derivado obtido (RUIHUA *et al.*, 2012), e a pesquisa por processos de conversão que minimizem a ocorrência de reações colaterais, o tempo reacional e a quantidade de reagentes e energia empregadas é muito importante.

A irradiação de micro-ondas tem sido empregada com sucesso em sínteses orgânicas, principalmente devido a vantagens como menor tempo reacional, rendimento elevado e redução da quantidade de produtos indesejáveis (NUCHTER *et al.*, 2004; CADDICK; FITZMAURICE, 2009; KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013). Estudos empregando irradiação por micro-ondas para derivatização de quitosana, tais como a produção de carboximetilquitosana (GE; LUO, 2005), de carboximetilquitosana quaternarizada (LIU *et al.*, 2012), de quitoooligossacarídeos (ILLY *et al.*, 2014) e de cloridrato de quitosana-guanidinado (ZHANG *et al.*, 2017), entre outros, têm sido realizados, resultando em processos com maior rendimento reacional em tempo significativamente reduzido quando comparados às metodologias convencionais de aquecimento. No entanto, o uso da irradiação de micro-ondas para síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana ainda tem sido pouco explorado.

No próximo tópico será dada ênfase aos princípios de reações assistidas por irradiação de micro-ondas e uso de reatores micro-ondas para síntese de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana.

2.6 Síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana assistida por irradiação de micro-ondas

As micro-ondas consistem em radiação eletromagnética com frequência entre 0,3 e 300 GHz, o que corresponde a comprimentos de onda (λ) de 1 mm a 1 m, e está situada entre a região de infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético. A frequência utilizada em reatores micro-ondas é de 2,45 GHz ($\lambda = 12,2$ cm) e o aquecimento de materiais por micro-ondas, também denominado aquecimento dielétrico, ocorre através da conversão de

energia eletromagnética em calor por meio de dois mecanismos: polarização dipolar e condução iônica (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2008).

A polarização dipolar está associada ao alinhamento de moléculas que possuem dipolo com o campo elétrico aplicado. Na presença das micro-ondas, os dipolos das moléculas tendem a se orientar com o campo elétrico e, nesse processo, como o campo na frequência de 2,45GHz oscila $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, energia na forma de calor é perdida em função da fricção e colisões moleculares (ZHU; CHEN, 2014). O segundo mecanismo de aquecimento é a condução iônica, no qual a oscilação do campo elétrico faz com que as espécies carregadas se movam em solução, alternando constantemente de direção, o que leva a fricção e colisões entre elas e, por consequência, a geração de calor (NUCHTER et al., 2004).

Sínteses orgânicas são tradicionalmente realizadas com o uso de aquecimento convencional (banhos, por exemplo), em que inicialmente as paredes do frasco reacional são aquecidas e posteriormente os reagentes são aquecidos por convecção ou condução. No aquecimento assistido por micro-ondas o meio reacional é aquecido de forma mais eficiente e homogênea e há gradiente invertido de temperatura quando comparado ao aquecimento convencional (DE LA HOZ; DÍAZ-ORTIZ; MORENO, 2005). Além disso, o uso de reatores micro-ondas pode propiciar o superaquecimento de solventes à pressão atmosférica e o aquecimento seletivo de reagentes (DE LA HOZ; DÍAZ-ORTIZ; MORENO, 2005; KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013).

Dessa forma, a redução dos tempos de reação de sínteses assistidas por irradiação de micro-ondas quando comparadas às realizadas com emprego do aquecimento convencional pode ser racionalizada em função da maior eficiência de aquecimento do meio reacional que resulta em maiores velocidades de reação conforme pode ser evidenciado pela aplicação da Lei de Arrhenius (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013; ZHU; CHEN, 2014).

As primeiras sínteses orgânicas conduzidas em reator micro-ondas foram relatadas em 1986 nos trabalhos desenvolvidos por Gedye (GEDYE et al., 1986) e Guiguere (GIGUERE et al., 1986). Contudo, os primeiros reatores utilizados eram fornos micro-ondas domésticos que não permitiam o controle adequado da temperatura do meio reacional e ofereciam grande risco de acidentes. A partir dos anos 2000 foram desenvolvidos reatores dedicados a reações assistidas por micro-ondas, com controle preciso de temperatura e muito mais seguros (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2008). Desde então, foram reportadas diversas reações orgânicas conduzidas com sucesso em reator micro-ondas, sendo relatado em muitos casos redução expressiva de tempo reacional, maior rendimento de síntese e redução da

formação de produtos indesejados (DALLINGER; KAPPE, 2007; CADDICK; FITZMAURICE, 2009; SOSNIK; GOTELLI; ABRAHAM, 2011; GAWANDE et al., 2014).

Conforme mencionado no tópico anterior, a derivatização assistida por irradiação de micro-ondas de polissacarídeos, como quitosanas, tem sido amplamente explorada nos últimos anos. No entanto, há poucos estudos relatando o uso de reatores micro-ondas para a síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh).

Luo e colaboradores (2010) sintetizaram QCh em reator micro-ondas empregando proporção molar de cloreto de glicidiltrimetilamônio/quitosana de 6:1, isopropanol/solução aquosa de NaOH como meio reacional, pH=9, temperatura e tempo de 80 °C e 50 min., respectivamente, resultando em derivado quaternizado com grau médio de quaternização, igual a 88,5%. Os autores realizaram a síntese empregando as mesmas proporções de cloreto de glicidiltrimetilamônio/quitosana descrita acima e aquecimento convencional a 80 °C por 6 h obtendo derivado com = 96,1%. Apesar do maior grau de quaternização obtido empregando aquecimento convencional, houve grande redução no tempo reacional quando o aquecimento foi realizado através da irradiação de micro-ondas (de 6 h para 50 min.).

Ling e colaboradores (2013) sintetizaram cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana em isopropanol/solução aquosa de NaOH empregando reator micro-ondas e avaliaram de forma univariada os efeitos da temperatura, pH do meio reacional, tempo de reação e proporção molar de quitosana/ cloreto de glicidiltrimetilamônio no grau médio de substituição dos derivados obtidos. As melhores condições de síntese foram obtidas a 80 °C, pH=10, tempo reacional de 50 min. e proporção molar de cloreto de glicidiltrimetilamônio/quitosana de 6:1, resultando em QCh com = 90,2%. Entretanto, a possível interação entre os parâmetros reacionais em estudo não foi analisada. Adicionalmente, variáveis respostas importantes relacionadas às características e propriedades do derivado, tais como grau médio de polimerização e solubilidade, e o rendimento reacional, não foram avaliadas.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em conjunto de ferramentas estatísticas e matemáticas efetivo para o desenvolvimento e otimização de processos que envolvem uma ou mais respostas de interesse que é influenciada por diversas variáveis independentes (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009). A MSR é baseada no ajuste de equação polinomial aos dados obtidos a partir de planejamentos experimentais para descrever uma variável dependente, ou resposta, e variáveis independentes. Simultaneamente, a MSR permite a avaliação do efeito da interação das variáveis independentes sobre a resposta avaliada e a otimização dos níveis das variáveis independentes

para obter a melhor resposta possível de maneira mais rápida e econômica quando comparada às abordagens univariadas (BEZERRA et al., 2008; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

A síntese de QCh envolve parâmetros reacionais tais como a razão molar quitosana/cloreto de glicidiltrimetilamônio, tempo e temperatura reacionais, que influenciam uma série de propriedades desse derivado quaternizado como o grau de quaternização e viscosidade intrínseca, bem como o rendimento reacional (CHO et al., 2006; RUIHUA et al., 2012; LI et al., 2014). Dessa forma, a MSR pode ser considerada uma ferramenta interessante para avaliar como os parâmetros reacionais (variáveis independentes) relacionados à síntese de QCh e a interação entre eles afetam as propriedades desse derivado quaternizado.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Produzir nãotecidos compostos por fibras ultrafinas obtidas por eletrofiação de blendas poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio potencialmente aplicáveis no tratamento de lesões de pele.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana pela reação de quitosana e cloreto de glicidiltrimetilamônio em meio ácido empregando reator micro-ondas;
- Aplicar planejamento fatorial 2^3 com ponto central e metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência da estequiometria da reação, em termos da razão molar quitosana/cloreto de glicidiltrimetilamônio, temperatura e tempo de reação no grau médio de substituição, viscosidade intrínseca e rendimento em massa do derivado catiônico obtido;
- Desenvolvimento de nãotecidos a partir da eletrofiação de soluções poliméricas à base de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) com diferentes características estruturais em diferentes proporções mássicas PCL/QCh, a saber 100/0, 95/5, 90/10, 80/20 e 70/30, e caracterização físico-química, estrutural, mecânica e térmica dos materiais obtidos;
- Avaliar a suscetibilidade dos nãotecidos à degradação enzimática por lisozima *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos nãotecidos em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) e queratinócitos humanos (HaCaT).

Capítulo 2 - Síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana assistida por irradiação de micro-ondas

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Quitosana comercial foi adquirida da empresa Cheng Yue Planting Co Ltd, China. A purificação da quitosana foi realizada conforme metodologia proposta por Abreu e Campana-Filho (2009), com modificações. Quitosana foi dispersa em solução de ácido acético 1% (v/v) em concentração de 3g L⁻¹ e a suspensão foi mantida sob agitação magnética por 24 h. A solução resultante foi filtrada, sob pressão positiva, em membrana de porosidade 0,45 µm (Millipore – White SCWP) e, em seguida, neutralizada com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ resultando na precipitação da quitosana. Posteriormente o precipitado foi lavado extensivamente com água e com soluções etanol/água 75 %, 80 %, 90 % e, por fim, com etanol absoluto. O material resultante desta etapa foi seco a 30 °C em estufa com circulação forçada de ar por 48 h. Cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; USA), ao passo que o ácido acético (99,8 %) foi adquirido da Synth (Diadema, SP; Brasil). Todos os outros reagentes foram de grau analítico e utilizados sem prévia purificação.

4.2 Síntese do cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh)

A síntese do derivado catiônico de quitosana pela reação do biopolímero com cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC) foi conduzida em frasco com capacidade de 100 mL em reator micro-ondas Discover-LabMate, marca CEM Corporation, gentilmente disponibilizado pelo Prof. Dr. André Luiz M. Porto para utilização nos laboratórios do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC/USP – Campus de São Carlos - Área 2). A derivatização da quitosana foi realizada empregando diferentes proporções molares de cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) /quitosana (Q), temperaturas e tempos de reação, conforme planejamento fatorial completo com ponto central com três fatores e dois níveis (2³) apresentado na Tabela 1, totalizando 22 experimentos (2³ = 8 pontos fatoriais (em duplicata) e seis repetições do ponto central). A seleção dos fatores estudados e os respectivos intervalos de variação foram definidos a partir da análise de trabalhos correlacionados (LOUBAKI; OUREVITCH; SICSIC, 1991; SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004; WU; SU; MA, 2006; WU et al., 2007; LUO et al., 2010; ZHAO et al., 2010; SONIA; SHARMA, 2011;

RUIHUA et al., 2012; XIAO et al., 2012b; LING et al., 2013) e por meio de ensaios preliminares a este trabalho.

Tabela 1- Níveis das variáveis independentes estudadas no processo de síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh)

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Razão molar GTMAC/Quitosana	X ₁	4	5	6
Tempo (min.)	X ₂	20	25	30
Temperatura (°C)	X ₃	75	80	85

Tipicamente, aproximadamente 0,5 g de quitosana purificada foram dispersos em 30 mL de água deionizada e 150 µL de ácido acético foi adicionado. Após 10 minutos sob agitação magnética, cloreto de glicidiltrimetilamônio foram adicionados ao meio reacional, o qual, sob agitação magnética, foi aquecido, mantendo-se a potência do reator micro-ondas fixa em 200 W, pelo tempo e temperatura estabelecidos no delineamento experimental. Após a reação, o derivado foi obtido por precipitação com acetona, separado por filtração, lavado exaustivamente com acetona e seco em estufa com recirculação de ar a 35 ± 1 °C por 24 h. Síntese empregando aquecimento convencional (AC) por meio de banho de glicerina foi realizada nas mesmas condições de dois pontos do planejamento experimental, a saber, QCh1 (X₁ = 4/1; X₂ = 20 min.; X₃ = 75 °C) e QCh8 (X₁ = 6/1; X₂ = 30 min.; X₃ = 85 °C), dando origem às amostras denominadas QCh1-AC e QCh8-AC, respectivamente. Em todas as sínteses, o rendimento foi determinado pela razão entre as massas de derivado obtido e de quitosana de partida.

4.3 Caracterizações

4.3.1 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de quitosana e dos derivados catiônicos obtidos foram previamente secas em estufa a vácuo a 40 °C por 12 h e pulverizadas com KBr grau espectroscópico na proporção de 1/100 (m/m). As misturas resultantes foram prensadas em formato de pastilhas e secas em estufa a vácuo a 40 °C por 24 h. As análises de todas as amostras foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu modelo IRAffinity com transformada de

Fourier na região espectral entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 32 varreduras.

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi empregada para a caracterização estrutural e para a determinação do grau médio de desacetilação () da quitosana e dos graus médios de quaternização () das amostras de QCh. Aproximadamente 10 mg de amostra foram solubilizados em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v). Após solubilização, a solução obtida foi transferida para tubo de quartzo ($\Phi = 5 \text{ mm}$). Os espectros de RMN ^1H foram adquiridos em espectrômetro modelo 400/54 Premiun Shielded (Marca Agilent Technologies) operando a 400 MHz a 85 °C. A janela espectral utilizada foi 6,4 kHz (14 a 2 ppm), tempo médio de relaxação médio de 30 s e tempo médio de aquisição médio de 5 s. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm). O grau de desacetilação () de quitosana e o grau médio de quaternização () dos derivados foram calculados pelas Equações 1 (HIRAI; ODANI; NAKAJIMA, 1991) e 2 (DESBRIÈRES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996), respectivamente.

$$\overline{GD}(\%) = \left(1 - \frac{I_{CH_3}/3}{I_{H_2-H_6}/6} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\overline{GQ}(\%) = \left(\frac{I_{H_{1'}}}{I_{H_{1'}} + I_{H_1}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde I_{CH_3} é a integral referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida (2,0 ppm); $I_{H_2-H_6}$ é a integral referente dos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel glicopiranosídico ($3,0 \text{ ppm} < \delta < 4,2 \text{ ppm}$); $I_{H_{1'}}$ é a integral referente ao hidrogênio do carbono 1 na unidade glicosamina monosubstituída (5,0 ppm); I_{H_1} é a integral referente ao hidrogênio do carbono 1 na unidade glicosamina não-substituída (4,8 ppm) (DESBRIÈRES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996).

4.3.3 Determinação do grau médio de quaternização () por titulação condutimétrica

O grau médio de quaternização () foi determinado por titulação dos contra-íons Cl^- dos derivados com solução aquosa padronizada de AgNO_3 (CHO et al., 2006). Amostras (0,1 g)

foram dissolvidas em 100 mL de água deionizada e a condutividade da solução foi medida utilizando condutivímetro modelo Handylab LF1 (Schott-Geräte) em função do volume de solução 0,017 mol L⁻¹ AgNO₃ adicionado empregando titulador automático Titronic Universal (Schott-Geräte). As medidas de condutividade durante as titulações foram efetuadas à temperatura de 25,0 ± 0,1°C. O grau médio de quaternização ($\overline{Q}$) foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$\overline{Q}(\%) = \left(\frac{1,7 \times 10^{-5} V_{AgNO_3}}{\left(\left(W(g) - (1,7 \times 10^{-5} V_{AgNO_3} \times M_{CGTMA}) \right) / (M_G \times \overline{DD}) + M_{AG} (1 - \overline{DD}) \right) \times \overline{DD}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Em que V_{AgNO₃} (mL) é o volume de solução AgNO₃ no ponto de equivalência, W (g) é a massa de derivado, M_{GTMAC}, M_G e M_{AG} são as massas molares (g mol⁻¹) do cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) (151 g mol⁻¹) e das unidades glucosamina (GlcN) (161 g mol⁻¹) e acetilglucosamina (GlcNAc) (203 g mol⁻¹), respectivamente, e $\overline{Q}$ é o grau médio de desacetilação da quitosana purificada.

4.3.4 Viscosimetria capilar

Viscosidades intrínsecas ($[\eta]$) de quitosana e de QCh foram determinadas em tampão acetato 0,3 mol.L⁻¹ / ácido acético 0,2 mol.L⁻¹ (pH = 4.5). Amostra de 50 mg de quitosana purificada foi suspensa em 25 mL de solução de ácido acético 0,6 mol L⁻¹ e mantida sob agitação magnética por 24 h. Para os derivados QCh, a massa de amostra utilizada foi de 90 mg. Após essa etapa, foi adicionado 25 mL de solução de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹. A solução resultante foi submetida à filtração por pressão positiva através de membranas de 0,45 µm (Millipore®) e uma alíquota de 15 mL foi transferida para viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, ϕ = 0,53mm). Medidas de tempo de escoamento foram determinadas a 25,00 ± 0,01 °C em viscosímetro AVS-350 acoplado a módulo diluidor automático AVS-20. A extrapolação das curvas η_{rel}/C versus C à diluição infinita permitiu a determinação dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

4.3.5 Solubilidade em água

A solubilidade da quitosana e dos derivados QCh em função do pH do meio (2 < pH < 12) foi estimada a partir da medida de transmitância das soluções desses polímeros. Amostras foram dissolvidas em solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹ para obtenção de soluções

com concentração de 1 mg mL^{-1} . Aliquotas dessas soluções foram transferidas para cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e a transmitância em 600 nm foi medida em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu, UV 3600). O pH das soluções poliméricas foi ajustado pela adição de solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O polímero foi considerado insolúvel quando a transmitância da solução polimérica foi inferior a 50 % quando comparada com a solução controle ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl).

4.3.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada com o auxílio de equipamento TGA-50 da Shimadzu. Aproximadamente 8 mg de amostra foram colocados em porta amostra de platina e aquecidos de 25 até $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} .

4.3.7 Difratometria de raios-X

Os difratogramas de raios-X de quitosana e seus derivados foram obtidos a temperatura ambiente em difratômetro Bruker AXS D8 Advance operando a 40 kV e 40 mA com feixe de radiação de Cu $K\alpha$ ($1,5406 \text{ \AA}$). O intervalo 2θ foi de 5 a 50° e a velocidade de varredura foi de $5^{\circ}/\text{min}$. O índice de cristalinidade (ICr) das amostras foi calculado utilizando metodologia proposta por Osorio-Madrado et al. (2010) utilizando a Equação 4:

(4)

Em que A_{crist} expressa a área de contribuição cristalina obtida subtraindo a contribuição amorfa da área total (A_{total}) do difratograma. A contribuição amorfa foi estimada a partir do tratamento do difratograma com o programa *X'Pert HighScore* versão 3.0 (DEGEN et al., 2014).

4.4 Análise estatística

O tratamento matemático-estatístico dos dados experimentais consistiu no ajuste de uma função polinomial ao conjunto de dados experimentais obtidos a partir da execução do planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central. Regressão linear múltipla foi utilizada para ajustar a Equação 5 aos dados experimentais por meio do método dos mínimos quadrados

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^k b_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (5)$$

em que: Y é a função genérica; X é a variável codificada, obtida a partir da variável original; b representa os coeficientes estimados pelos métodos dos mínimos quadrados, e ε é o erro experimental.

Foi realizada Análise de Resíduos a 95% de limite de confiança ($p < 0,05$), que consistiu: no teste de significância do ajuste do modelo, baseados na Análise de Variância (ANOVA), comparando-se a proporção da variação explicada, isto é, pela análise do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{aj.}$). A significância dos coeficientes do modelo foi avaliada pelo teste F e valor da probabilidade (valor- p), adotando-se um valor de $p \leq 0,05$, para todos os ensaios.

Superfícies de respostas foram obtidas empregando modelo matemático proposto nos níveis reais das variáveis independentes, mantendo-se a resposta em função do eixo Z, com eixos X e Y representando as variáveis independentes ao mesmo tempo em que se mantêm as demais variáveis constantes no ponto central. A estatística e os gráficos de superfície de resposta foram obtidos empregando programa *Statistica for Windows* versão 10.0 da *StatSoft*.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização espectroscópica da quitosana e dos derivados quaternizados

Os espectros no infravermelho das amostras de quitosana e do derivado quaternizado são apresentados na Figura 7. O espectro de infravermelho da quitosana (Figura 7a) exibe banda larga e intensa centrada em 3440 cm^{-1} que corresponde às deformações axiais de –O-H e –N-H. A banda em 2877 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de –C-H. As bandas características em 1652 e 1600 cm^{-1} são correspondentes à deformação axial de –C=O (banda de amida I) e deformação angular de –NH₂, respectivamente. A banda em 1157 cm^{-1} corresponde à deformação angular de –O-H em ligação hidrogênio e a banda em 1085 cm^{-1} é atribuída à deformação angular de –C-O (BRUGNEROTTO et al., 2001). Essas bandas principais também são observadas nos espectros das amostras do derivado QCh produzidas empregando aquecimento por micro-ondas (Figura 7b e 7c) e aquecimento convencional (Figura 7d e 7e). No entanto, uma nova banda é observada em 1483 cm^{-1} , a qual é atribuída às deformações C–H dos grupos metil do grupo trimetilamônio ($^+N(CH_3)_3$) (CHO et al., 2006).

Adicionalmente, nos espectros dos derivados QCh, houve redução da intensidade da banda correspondente à amina primária ($\approx 1600\text{ cm}^{-1}$) e aumento da intensidade da banda em 1652 cm^{-1} , indicando que as aminas primárias presentes nas unidades GlcN da quitosana foram modificadas para amina secundária em decorrência da reação com o cloreto de glicidiltrimetilamônio (XIAO *et al.*, 2012). Por outro lado, as bandas características observadas entre 1157 cm^{-1} - 1030 cm^{-1} permaneceram inalteradas após a reação da quitosana com CGTMA indicando que não ocorreu reação entre os grupos hidroxilas ligados aos C3 e C6, o que está em concordância com a literatura (HUANG *et al.*, 2014). Dessa forma, a análise de espectroscopia no infravermelho permitiu avaliar as alterações estruturais devido à reação de quitosana com CGTMA indicando predominância de *N*-substituição.

Figura 7 - Espectros na região do infravermelho de quitosana (a) e das amostras de derivados quaternizados QCh1 (b), QCh8 (c), QCh1-AC (d) e QCh8-AC (e)

Evidência adicional das alterações estruturais da quitosana após a reação com CGTMA é fornecida pela comparação dos espectros de RMN ^1H da quitosana (Figura 8a) e dos derivados quaternizados QCh8 (Figura 8b) e QCh1-AC (Figura 8c).

Figura 8 - Espectros RMN ^1H da quitosana (a), QCh8 (b) e QCh1-AC (c) em solução D₂O/HCl 1% (v/v) adquirido a 85 °C

O espectro RMN ^1H da quitosana apresenta singlete em 2,0 ppm característico dos hidrogênios metílicos dos grupos acetamido das unidades GlcNAc e sinal em 3,15 ppm relacionado ao átomo de hidrogênio ligado ao C2 da unidade GlcN. Além disso, o conjunto de sinais entre 3,3-4,0 ppm, correspondem aos hidrogênios H3-H6 das unidades GlcN e ao hidrogênio ligado ao C2 das unidades de GlcNAc, ao passo que o sinal em 4,80 ppm é

atribuído ao hidrogênio (H1) ligado ao carbono anomérico (C1). A partir da análise do espectro de quitosana e considerando a Equação 1 (Seção 4.3.2), o grau médio de desacetilação (α) calculado foi de 95 %. Os espectros RMN ^1H das amostras QCh8 e QCh1-AC apresentam sinais adicionais em 3,2 ppm e 3,31 ppm, correspondentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos dos grupos $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ e $-\text{NHCH}_2-$, respectivamente, que são devidos à introdução do substituinte nas cadeias de quitosana. Adicionalmente, o sinal do hidrogênio ligado ao C2 das unidades GlcN é deslocado de 3,15 ppm para 3,10 ppm devido à reação da quitosana com GTMAC. Os sinais em 4,8 ppm e 5,0 ppm correspondem ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico (C1) nas unidades GlcN não-substituídas e substituídas, respectivamente. Considerando a análise do espectro RMN ^1H e a Equação 2 (Seção 4.3.2), o grau médio de quaternização (β) dos derivados foi calculado. O β dos derivados também foi calculado utilizando o método de titulação condutimétrica. Os valores para α determinados por RMN de ^1H e titulação estão apresentados na Tabela 2. Constatou-se que os valores de α determinados a partir das curvas de titulação apresentaram concordância com os valores obtidos a partir dos espectros de RMN ^1H .

5.2 Análise estatística

A Tabela 2 apresenta os valores decodificados e codificados (em parênteses) das variáveis independentes razão molar CGTMA/quitosana, tempo e temperatura, além dos valores experimentais das variáveis respostas grau médio de quaternização (β), viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e rendimento reacional. Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que o grau médio de quaternização variou entre 47% e 71%, ao passo que a viscosidade intrínseca variou entre 230 mL g⁻¹ e 290 mL g⁻¹ e o rendimento entre 120% e 164%, indicando, portanto, que as condições reacionais afetaram as características estruturais do derivado quaternizado bem como o rendimento de síntese. Visando descrever a relação entre as variáveis dependentes e independentes, a Equação 5 (Seção 4.4) foi ajustada aos dados experimentais por regressão linear múltipla e o ajuste do modelo foi avaliado pelo quadro ANOVA (Tabela 3), o qual demonstra quais termos do modelo foram ou não estatisticamente significativos ao nível de 95% de significância (p -valor < 0,05).

Tabela 2 - Variáveis independentes do planejamento fatorial com ponto central 2³ e resultados experimentais

Ensaio	Variáveis independentes	Variáveis resposta ^a
--------	-------------------------	---------------------------------

	GTMAC/Quitosana (mol/mol)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	1	2	[η] ³	Rendimento (%)
1	4 (-1)	20 (-1)	75 (-1)	47.3 $\pm$ 0.4	46.5 $\pm$ 1.6	288 $\pm$ 3	133 $\pm$ 4
2	4 (-1)	20 (-1)	85 (+1)	51.7 $\pm$ 0.3	52.0 $\pm$ 0.9	277 $\pm$ 2	125 $\pm$ 3
3	4 (-1)	30 (+1)	75 (-1)	53.7 $\pm$ 0.2	53.3 $\pm$ 0.3	268 $\pm$ 3	141 $\pm$ 7
4	4 (-1)	30 (+1)	85 (+1)	57.6 $\pm$ 0.1	58.4 $\pm$ 0.2	262 $\pm$ 2	135 $\pm$ 4
5	6 (+1)	20 (-1)	75 (-1)	60.5 $\pm$ 0.6	60.3 $\pm$ 1.5	258 $\pm$ 4	150 $\pm$ 4
6	6 (+1)	20 (-1)	85 (+1)	63.5 $\pm$ 0.4	62.4 $\pm$ 0.5	252 $\pm$ 3	137 $\pm$ 2
7	6 (+1)	30 (+1)	75 (-1)	67.2 $\pm$ 0.8	65.1 $\pm$ 0.4	246 $\pm$ 1	159 $\pm$ 3
8	6 (+1)	30 (+1)	85 (+1)	71.1 $\pm$ 0.8	69.9 $\pm$ 0.4	233 $\pm$ 4	164 $\pm$ 3
9	5 (0)	25 (0)	80 (0)	56.3 $\pm$ 0.4	53.3 $\pm$ 0.2	267 $\pm$ 3	146 $\pm$ 5
10	5 (0)	25 (0)	80 (0)	56.7 $\pm$ 0.2	52.8 $\pm$ 0.4	267 $\pm$ 1	149 $\pm$ 4
11	5 (0)	25 (0)	80 (0)	56.8 $\pm$ 0.3	53.0 $\pm$ 0.2	270 $\pm$ 1	148 $\pm$ 6

^aValores são médias $\pm$ desvio padrão de duas repetições; ¹determinado por RMN ¹H; ²determinado por titulação condutimétrica; ³[η] = Viscosidade intrínseca.

Tabela 3 - Análise de variância para , viscosidade intrínseca e rendimento

Fonte ^a	*		Viscosidade intrínseca		Rendimento	
	F	p-value	F	p-valor	F	p-valor
X ₁	5991,78	0,000 ^b	477,04	0,002 ^b	309,429	0,003 ^b
X ₁ ²	255,04	0,004 ^b	48,01	0,020 ^c	20,364	0,046 ^c
X ₂	1565,26	0,001 ^b	176,04	0,006 ^b	156,214	0,006 ^b
X ₃	474,74	0,002 ^b	51,04	0,019 ^c	25,929	0,036 ^c
X ₁ .X ₂	8,22	0,103 ^d	1,04	0,415 ^d	17,357	0,053 ^d
X ₁ .X ₃	5,26	0,149 ^d	0,042	0,857 ^d	1,929	0,299 ^d
X ₂ .X ₃	0,33	0,624 ^d	0,042	0,857 ^d	21,429	0,044 ^c
Falta de ajuste	8,22	0,103 ^d	7,042	0,118 ^d	13,714	0,066 ^d
R ²	0,9987		0,9881		0,9724	
R ² _{adj.}	0,9959		0,9605		0,9078	

* determinado por RMN de ¹H; ^aX₁= razão molar GTMAC/Quitosana; X₂ = Tempo (min.); X₃ = Temperatura (°C); ^b = significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01); ^c = significativo ao nível de 5% de probabilidade (p < 0,05), ^d = não significativo ao nível de 5% de probabilidade (p > 0,05).

Os resultados na Tabela 3 indicam que as variáveis que exerceram mais influência nos valores de grau médio de quaternização () e viscosidade intrínseca foram os termos lineares razão molar CGTMA/Quitosana (X₁), tempo (X₂) e temperatura (X₃) seguido pelo termo quadrático CGTMA/Quitosana (X₁²). Adicionalmente, essas variáveis resposta não foram afetadas pelos termos de interação X₁.X₃, X₁.X₂ e X₂.X₃ (p > 0,05). Por outro lado, o termo linear razão molar CGTMA/Quitosana (X₁) foi o que mais influenciou os valores de rendimento reacional, seguido pelos termos lineares tempo (X₂) e temperatura (X₃). Além

disso, os termos de interação entre tempo e temperatura ($X_2.X_3$) e termo quadrático CGTMA/Quitosana (X_1^2) também foram significativos ($p < 0,05$). A partir dessa análise, modelos polinomiais que expressam a relação entre as variáveis dependentes e independentes decodificadas foram elaborados e estão representados pelas Equações (6) – (8).

$$(\%) = 36,1 - 18,0X_1 + 2,6X_1^2 + 0,3X_2 + 0,5X_3 \quad (6)$$

$$[\eta] = 258 + 67,75X_1 - 8,125X_1^2 - 0,875X_2 + 0,125X_3 \quad (7)$$

$$\text{Rendimento } (\%) = 310 + 32,9167X_1 - 4,6667X_1^2 - 8,90X_2 + 3,80X_3 - 0,10X_2X_3 \quad (8)$$

A análise do quadro ANOVA evidencia que não houve falta de ajuste dos modelos aos dados experimentais no nível de significância de 5% (valor- $p > 0,05$). Além disso, em todas as variáveis resposta analisadas, os valores de coeficiente de determinação e coeficiente de determinação ajustado foram superiores a 0,90, indicando que os modelos polinomiais adotados explicam mais de 90% da variação total da variável resposta em torno da média, ao passo que menos de 10% foram atribuídos aos resíduos. Com o objetivo de visualizar o efeito das variáveis independentes nas variáveis respostas, gráficos tridimensionais (Figura 9) foram construídos com base nas Equações 6 a 8, em que a resposta avaliada foi representada pelo eixo Z, enquanto os eixos X e Y representam duas das variáveis independentes analisadas, ao passo que a terceira variável independente foi fixada no ponto central.

Figura 9 - Superfícies de resposta mostrando o efeito da razão molar cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA)/Quitosana, tempo e temperatura nas variáveis resposta grau médio de quaternização (a, b, c), viscosidade intrínseca (d, e, f) e rendimento de reação (g, h, i)

As Figuras 9 (a), (b) e (c) demonstram claramente que houve aumento do grau de quaternização com o incremento da razão molar CGTMA/Quitosana, do tempo e da temperatura de reação. Tais efeitos podem ser racionalizados como consequência da maior concentração de cloreto de glicidiltrimetilamônio e do tempo reacional mais longo, ambos favorecendo reações de *N*-substituição mais completas na cadeia de quitosana. Além disso, o

aumento da temperatura resulta em maior quantidade de espécies reativas com energia suficiente para superar a barreira de energia de ativação, o que leva a reações mais rápidas e mais completas.

Por outro lado, as amostras dos derivados QCh apresentaram menores valores de viscosidade intrínseca quando comparados à quitosana ($[\eta]_{\text{Quitosana}} = 451 \pm 10 \text{ mL g}^{-1}$). Foi verificado que houve redução nos valores de viscosidade intrínseca com o aumento da razão GTMAC/Quitosana, tempo e temperatura de reação (Figura 9 (d), (e) e (f)). A modificação química da quitosana em meio ácido favorece a ocorrência de despolimerização da cadeia polimérica devido à suscetibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. Assim, considerando que a síntese do derivado quaternizado de quitosana foi realizada em meio ácido e que o aumento do tempo e temperatura reacionais resultou em derivados com maiores valores de grau médio de quaternização, é provável que tais condições de reação também tenham favorecido a ocorrência de despolimerização. Esses resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Wasikiewicz e Yeates (WASIKIEWICZ; YEATES, 2013) que estudaram a degradação da quitosana em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético utilizando reator micro-ondas e verificaram a ocorrência de acentuada degradação das cadeias poliméricas com o aumento do tempo de irradiação.

Os efeitos da razão molar GTMAC/Quitosana, tempo e temperatura no rendimento reacional estão apresentados nas Figuras 9(g), (h) e (i). Foi observado que o rendimento aumenta com o incremento do tempo reacional e da razão molar (Figura 9(g)). Adicionalmente, a combinação de elevada temperatura e maiores concentrações de CGTMA resultou em maiores rendimentos reacionais. Contudo, as Figuras 9(h) e 9(i) mostram que as sínteses realizadas em elevada temperatura, menor concentração de CGTMA e baixo tempo reacional resultaram em menor rendimento.

Síntese empregando aquecimento convencional por meio de banho de glicerina foi realizada nas mesmas condições empregadas na preparação das amostras dos ensaios 1 (QCh1) (razão molar CGTMA/Quitosana de 4/1; 20 min e 75°C) e 8 (QCh8) (razão molar CGTMA/Quitosana de 6/1; 30 min e 85°C), dando origem às amostras denominadas QCh1-AC e QCh8-AC, respectivamente. A amostra QCh1-AC apresentou $\text{rendimento} = 15,3 \pm 0,3\%$ e $[\eta] = 374 \pm 11 \text{ mg mL}^{-1}$, ao passo que para a amostra QCh8-AC o rendimento foi de $41,4 \pm 0,5\%$ e $[\eta]$ de $288 \pm 3 \text{ mg mL}^{-1}$. Os rendimentos dessas sínteses foram de $105 \pm 2\%$ e $118 \pm 7\%$, respectivamente. Comparando esses dados com os apresentados na Tabela 2, verifica-se que a

síntese utilizando reator micro-ondas possibilitou a obtenção de derivados mais substituídos e que a despolimerização ocorreu em menor extensão nos derivados obtidos empregando aquecimento convencional.

Assim, apesar da ocorrência de maior despolimerização na síntese assistida por micro-ondas, essa forma de aquecimento mostrou-se mais eficiente que o aquecimento convencional para promover a reação entre a quitosana e o cloreto de glicidiltrimetilamônio. Adicionalmente, é importante enfatizar que a síntese assistida por micro-ondas, como realizado no presente estudo, permitiu a preparação de derivados quaternizados de quitosana com elevados valores de ($> 40\%$) em tempo bastante reduzido (≤ 30 min.) quando comparado ao tempo de síntese convencional (4-18 h) relatado na literatura (CHO et al., 2006; WU et al., 2007; XIAO et al., 2012b).

O aquecimento por irradiação de micro-ondas ocorre basicamente por polarização dipolar e condução iônica, em que os dipolos ou íons presentes na mistura reacional alinham-se ao campo elétrico aplicado. Como o campo elétrico oscila, os dipolos ou íons tendem a se realinhar ao campo elétrico oscilante e neste processo perdem energia sob a forma de calor, devido aos choques moleculares e perdas dielétricas. Em contraste, o aquecimento convencional usualmente envolve o uso de banhos, que primeiramente aquece as paredes do frasco reacional e posteriormente os reagentes por convecção ou condução. Essa forma de aquecimento é menos eficiente quando comparada ao aquecimento por micro-ondas visto que requer maior tempo para que o meio reacional atinja a temperatura desejada (ZHU; CHEN, 2014). Por outro lado, o aquecimento por micro-ondas propicia o superaquecimento de solventes à pressão atmosférica, o aquecimento seletivo de reagentes e a formação de *hot spots* que são pontos isolados de alta temperatura no meio reacional (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013). Diante disso, a redução dos tempos de reação de sínteses assistidas por irradiação de micro-ondas quando comparadas às realizadas com emprego do aquecimento convencional pode ser racionalizada em função da maior eficiência de aquecimento do meio reacional que resulta em maiores velocidades de reação conforme pode ser evidenciado pela aplicação da Lei de Arrhenius (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013; ZHU; CHEN, 2014).

5.3 Solubilidade em água

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos substituintes na solubilidade das amostras de QCh, a transmitância das soluções poliméricas ($C_p = 1 \text{ g/L}$) foi medida em função do pH da solução (Figura 10).

Figura 10 – Solubilidade da quitosana e seus derivados em solução aquosa em função do pH

A comparação da solubilidade da quitosana e seus derivados quaternizados em meio aquoso e em função do pH revela que em $\text{pH} \leq 6,0$ todas as amostras estão completamente solúveis conforme verificado pelos valores de transmitância ($\approx 100\%$). No entanto, o aumento do pH provocou a ocorrência de turvação na solução de quitosana devido à precipitação do polímero, como consequência da desprotonação dos grupos de amônio das unidades glicosamina (GlcN). Conforme verificado na Figura 10, a solubilidade da amostra QCh1-AC foi elevada em $\text{pH} < 6,0$, mas diminuiu drasticamente em $\text{pH} > 7,0$. Por outro lado, quando o pH foi aumentado na região 6,0-12,0, a transmitância das soluções de amostras QCh1, QCh8 e QCh8-AC manteve-se próximo de 100%. Assim, devido ao seu baixo grau médio de quaternização ($= 15,3\%$), a amostra QCh1-AC exibe solubilidade semelhante à da quitosana, enquanto as amostras QCh1, QCh8 e QCh8-AC são totalmente solúveis em $2,0 < \text{pH} < 12,0$, devido à elevada quantidade de grupos positivamente carregados ($> 40\%$).

5.4 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica de polímeros é afetada pela ocorrência e extensão de reações de substituição. Nesse sentido, foi realizada análise termogravimétrica da quitosana e dos derivados quaternizados com o objetivo de avaliar o efeito dos substituintes no comportamento térmico desses polímeros. As curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivativa (DTG) para a quitosana e derivados quaternizados QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC estão representadas nas Figuras 11 (a) e (b), respectivamente, e revelam que esses polímeros apresentaram perfis de perda de massa em função do aumento da temperatura com dois eventos térmicos principais (Tabela 4). O primeiro evento ocorre entre 25 e 150 °C e está relacionado à evaporação da água adsorvida pelos materiais. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, os derivados quaternizados QCh1, QCh8 e QCh8-AC apresentaram maior perda de massa nesse estágio quando comparados à quitosana e ao derivado QCh1-AC, o que pode ser atribuído ao aumento da hidrofilicidade devido à maior quantidade de substituintes carregados na cadeia desses derivados.

Figura 11 - Curvas TG (a) e DTG (b) da quitosana e dos derivados QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC, obtidas sob atmosfera de N₂ (vazão de 50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹

Tabela 4 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica da quitosana e das amostras QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC

Amostra	Evento I			Evento II		
	Faixa	T _{Max} (°C)*	Δm (%)**	Faixa	T _{onset} (°C)***	Δm (%)
Quitosana	25 - 150	70	7	220 - 420	278	42
QCh 1	25 - 150	60	10	190 - 390	248	48
QCh 8	25 - 150	60	11	190 - 390	246	52
QCh1-AC	25 - 150	63	7	190 - 390	253	44
QCh8-AC	25 - 150	60	9	190 - 390	250	46

* T_{Max} = Temperatura de máxima perda de massa; ** Δm (%) = perda de massa; *** T_{onset} = Temperatura onset.

O segundo evento térmico se inicia em 220 °C e finaliza em 420 °C no caso da quitosana, enquanto ocorre no intervalo de temperatura de 190-390 °C no caso dos derivados quaternizados. Esse evento está associado ao processo de degradação das cadeias poliméricas da quitosana e à clivagem dos grupos substituintes nos derivados quaternizados (DE BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2004). Com base nos dados apresentados na Tabela 4, a perda de massa nesse evento térmico variou entre 42 % - 52 %, sendo observado que essa perda foi maior em derivados mais substituídos. Adicionalmente, os valores de T_{onset} (Tabela 4) revelam que os derivados quaternizados exibem menor estabilidade térmica quando comparados à quitosana e que essa estabilidade se reduz com o aumento do grau de quaternização. Resultados similares aos encontrados no presente estudo foram reportados para outros derivados de quitosana (DE BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2004; XU et al., 2010; CHETHAN et al., 2013).

5.5 Difração de raios-X

O efeito dos substituintes no arranjo estrutural das cadeias de quitosana foi estudado por difração de raios-X e os difratogramas das amostras QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC estão representadas na Figura 12. O difratograma da quitosana de partida exibe pico intenso centrado em $2\theta = 20,2^\circ$ e outro centrado em $2\theta = 10,9^\circ$. Por outro lado, nos difratogramas dos derivados quaternizados, o pico em $2\theta = 10,9^\circ$ não foi observado e a intensidade do pico em $2\theta = 20,2^\circ$ foi menor quando comparado ao difratograma da quitosana, indicando, assim, que a derivatização resultou em alteração do arranjo estrutural das cadeias de quitosana no estado sólido. Os índices de cristalinidade da quitosana e das amostras QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC foram calculados conforme metodologia proposta por Osorio-Madrado et al. (2010), resultando nos valores de 31,0 %, 18,3%, 17,5%, 24,2% e 20,6%, respectivamente. A redução do índice de cristalinidade dos derivados em relação à quitosana pode ser atribuída à presença dos grupos substituintes carregados e volumosos, os quais dificultam as interações intramoleculares de hidrogênio em decorrência do impedimento estérico e, por consequência, levam à diminuição da ocorrência de cristalinos (XIAO et al., 2012).

Figura 12 - Difrátogramas da quitosana e dos derivados QCh1, QCh8, QCh1-AC e QCh8-AC.

6 Conclusões parciais

Nesta etapa do estudo cumpre destacar os avanços na direção do desenvolvimento de metodologia simples e eficiente para sintetizar cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana utilizando reator micro-ondas. A reação assistida por irradiação de micro-ondas entre quitosana e cloreto de glicidiltrimetilamônio em meio ácido permitiu a obtenção de cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana com elevado grau médio de substituição quando comparado à reação realizada em condições similares, porém com emprego de aquecimento convencional. Adicionalmente, o tempo reacional requerido para síntese assistida por micro-ondas foi bem inferior (≤ 30 min) quando comparado ao tempo de síntese convencional (4-18 h) relatado na literatura.

O uso de planejamento fatorial e de metodologia de superfície de resposta permitiu avaliar os efeitos dos parâmetros reacionais razão molar cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC)/Quitosana (Q), temperatura e tempo reacionais nas variáveis resposta grau médio de quaternização (α), viscosidade intrínseca e rendimento reacional. Dentre as variáveis independentes avaliadas, a que exerceu maior influência nas variáveis resposta foi a razão molar cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC)/Quitosana (Q), seguida pelo tempo e

temperatura reacionais. Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que as condições reacionais que possibilitaram a síntese de derivado com maior grau médio de quaternização ($\alpha = 71,1\%$) e rendimento reacional (164 %) foram razão molar GTMAC/Quitosana de 6/1 e temperatura e tempo reacionais de 85°C e 30 min, respectivamente.

A estabilidade térmica e grau de cristalinidade dos derivados quaternizados foram inferiores à da quitosana de partida. Contudo, a reação de derivatização da quitosana resultou em amostras (QCh1, QCh8 e QCh8-AC) totalmente solúveis em $2,0 < \text{pH} < 12,0$.

Tais resultados evidenciam que a síntese do derivado quaternizado de quitosana pode ser realizada de maneira a permitir que as características do derivado e de suas propriedades físico-químicas sejam controladas a partir do controle das condições reacionais empregadas na derivatização.

Capítulo 3 - Obtenção e caracterização de não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana pela técnica de eletrofiação

7 Materiais e métodos

7.1 Materiais

Poli(ε-caprolactona) (PCL, $M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$) foi adquirida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; USA). Cloreto *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) foi sintetizado conforme metodologia desenvolvida na primeira etapa do presente trabalho empregando as seguintes condições reacionais: (i) Amostra QCh1: razão molar GTMAC/Quitosana = 4/1, tempo reacional = 20 min, temperatura reacional = 75 °C; ii) Amostra QCh2: razão molar GTMAC/Quitosana = 6/1, tempo reacional = 30 min, temperatura reacional = 85 °C. Os graus médios de quaternização ($\bar{Q}$) das amostras QCh1 e QCh2 foram determinados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN ^1H como descrito na seção 4.3.2 do capítulo anterior, resultando em $\bar{Q} = 47,3 \pm 0,4 \%$ e $\bar{Q} = 71,1 \pm 0,8 \%$, respectivamente. A viscosidade intrínseca dos derivados foi determinada conforme descrito na seção 4.3.4 do capítulo anterior, resultando em $[\eta] = 288 \pm 3 \text{ mL g}^{-1}$ e $[\eta] = 233 \pm 3 \text{ mL g}^{-1}$, respectivamente. A partir desses dados e considerando os parâmetros (K e α) da equação de Mark-Houwink-Sakurada ($[\eta] = K[\eta]^a$) reportado por Yevlampieva et al. (2015), foram determinadas as massas moleculares viscosimétricas (M_v) dos derivados (QCh1 e QCh2), valores que foram utilizados, em conjunto com os de PCL, para calcular o grau médio de polimerização ($\bar{P}_n$) resultando, em $\bar{P}_n = 2218$ e $\bar{P}_n = 1427$, respectivamente.

7.2 Processo de eletrofiação

Soluções poliméricas com concentração de 14 % (m/v) foram preparadas pela dissolução de PCL e QCh em proporções mássicas de 100/0, 95/5, 90/10, 80/20 e 70/30 em solução ácido acético/ácido fórmico (60/40 v/v) empregando agitação magnética por 3 h à temperatura ambiente. A solução polimérica obtida foi imediatamente acondicionada em seringa plástica com capacidade de 1 mL, a qual foi acoplada à bomba para controle da vazão que foi ajustada para $15 \mu\text{L min}^{-1}$ através de uma agulha metálica (0,45 mm de diâmetro interno). Voltagem de 25 kV foi aplicada entre a agulha e o coletor empregando equipamento comercial EC-DIG (IME Technologies, Geldrop, Netherlands) (Figura 13), gentilmente disponibilizado pela Profa. Dra. Elisabete Frollini para utilização no laboratório do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas (IQSC/USP – Campus de São Carlos - Área 1). As fibras produzidas foram coletadas em coletor rotatório de aço inoxidável (12,5 cm

$\times 5,5$ cm, $L \times W$, INSTOR Projetos e Robótica Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil) mantido a uma distância de 15 cm da ponta da agulha e sob rotação de aproximadamente 2.500 rpm. Todos os experimentos foram realizados por período de 40 minutos, à temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 5 %. Após o processo de eletrofiação, não tecidos com dimensões médias de 14 cm x 4 cm, foram cuidadosamente retirados do coletor, secos a 30 °C por 12 h e armazenados em dessecador contendo sílica.

Figura 13 - Equipamento utilizado no processo de eletrofiação

Fonte: Autoria própria.

8 Caracterizações

8.1.1 Viscosidade e condutividade das soluções poliméricas utilizadas no processo de eletrofiação

A condutividade das soluções foi medida a $25 \pm 0,1$ °C utilizando condutivímetro marca Gehaka, modelo CG 1800, com célula de condutividade $K = 1$. A viscosidade dinâmica das soluções poliméricas utilizadas para eletrofiação foi determinada em viscosímetro de queda de esfera (GILMONT instruments) imerso em banho termostatzado a $25 \pm 0,2$ °C. A viscosidade das soluções foi calculada com base na Equação 9:

(9)

Onde μ = viscosidade dinâmica (cP); K = constante do viscosímetro (37); ρ_{esfera} = densidade da esfera de tântalo utilizada ($16,6 \text{ g cm}^{-3}$); $\rho_{\text{solução}}$ = densidade da solução polimérica (g cm^{-3}) e t = tempo de queda da esfera (min.).

8.1.2 Morfologia das fibras

Observações das morfologias das fibras obtidas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV e corrente de 2,82 A. Antes da análise, as amostras foram recobertas com ouro em metalizador *Coating System* BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein). A partir das micrografias, o diâmetro das fibras foi determinado utilizando o programa *ImageJ* 1.45 (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD). A distribuição de diâmetro e o diâmetro médio das fibras foi determinado considerando o diâmetro de ao menos 150 fibras a partir de pelo menos 4 micrografias para cada amostra. A orientação das fibras foi avaliada utilizando o programa *OrientationJ* que consiste em uma extensão do *ImageJ*. Ao menos quatro micrografias por amostra foram utilizadas para quantificar o índice de alinhamento das fibras que varia entre 0 e 1, sendo que valores próximos a 0 e 1 correspondem às fibras depositadas de forma aleatória e alinhada, respectivamente.

8.1.3 Medidas de espessura

A espessura dos nãotecidos foi medida com auxílio de paquímetro digital (ProMax, Modelo NKS, Japão) com resolução de 0,01 mm, sendo realizadas 20 medidas ao longo de cada amostra de nãotecido.

8.1.4 Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A superfície dos nãotecidos produzidos por eletrofiação foi avaliada em espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer modelo 100 FTIR com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram obtidos na região espectral entre 4000 e 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 32 varreduras.

8.1.5 Porosidade dos nãotecidos

A porosidade dos nãotecidos foi medida pelo método de deslocamento de líquidos (LIANG et al., 2016), em que etanol P.A. foi utilizado por ser um não-solvente para PCL e QCh que permeia através dos poros dos nãotecidos obtidos sem causar intumescimento ou

encolhimento. Amostras de nãotecidos (2x2 cm²) foram pesadas (m₁), tiveram seus volumes (V) determinados com base em suas dimensões e imersos em 10 mL de etanol. Em seguida, os materiais foram submetidos a ciclos de compressão-despressurização com intuito de forçar a entrada de etanol nos poros até não haver mais liberação de bolhas de ar. Na etapa subsequente, os nãotecidos foram retirados e o excesso de líquido removido levemente com papel toalha, sendo, em seguida, determinada a massa da amostra (m₂). As análises foram realizadas em quadruplicata para cada amostra e a porosidade dos nãotecidos foi calculada de acordo com a Equação 10:

$$\text{Porosidade (\%)} = ((m_2 - m_1)/(\rho \cdot V)) \times 100 \quad (10)$$

Em que $\rho_{\text{etanol}} = 0,789 \text{ g/cm}^3$.

8.1.6 Medidas de ângulo de contato, energia livre de superfície e energia livre de interação (ΔG)

As medidas de ângulo de contato foram obtidas utilizando goniômetro CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland), a 25 °C. Amostras (10 mm × 10 mm) foram fixadas em lâmina de vidro para manter a superfície na horizontal. Água, diiodometano e etilenoglicol foram utilizados como líquidos de prova. Uma gota do líquido ($\approx 2 \mu\text{L}$) foi depositada sobre a superfície da amostra com auxílio de seringa e a imagem da gota foi captada por câmera digital por período de 10 s. Os ângulos de contato dos lados direito e esquerdo da gota foram calculados por meio do *software* CAM 2008. Os valores do ângulo de contato foram determinados a partir da média dos ângulos de cinco repetições, obtidos pela média dos ângulos direito e esquerdo de cada gota com a superfície do nãotecido. A partir desses dados e dos valores de tensão superficial dos líquidos de prova (γ_s , $\gamma_{\text{água}}$, $\gamma_{\text{diiodometano}}$, $\gamma_{\text{etilenoglicol}}$) listados na Tabela 5 (ROJO et al., 2015), foram determinados os valores de energia livre de superfície (γ^{Total}) e de seus componentes polar (γ^{AB}), apolar (γ^{LW}), elétron receptor (γ^+) e elétron doador (γ^-) empregando a equação de Young na forma da Equação 11, conforme proposto por van Oss, Chaudhery e Good (VAN OSS; CHAUDHURY; GOOD, 1988).

(11)

Onde os subscritos “S” e “L” denotam as fases sólida e líquida, respectivamente. De acordo com o modelo de van Oss, Chaudhery and Good (VAN OSS; CHAUDHURY; GOOD, 1988),

a energia de superfície total (γ^{TOTAL}) consiste na soma dos componentes apolar (γ^{LW}) e polar (γ^{AB}) ($\gamma^{\text{TOTAL}} = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}}$), sendo o componente γ^{AB} calculado de acordo com a Equação 12.

(12)

Tabela 5 – Valores dos parâmetros de tensão superficial dos líquidos de prova em mJ m^{-2} . γ^{LW} = tensão superficial; γ^{LW} = componente apolar; γ^{AB} = componente polar; γ^{AB} = componente elétron doador; γ^{AB} = componente elétron receptor

Líquido de teste	Parâmetros				
	γ^{AB}				
Água	72,7	21,8	51	25,5	25,5
Diiodometano	50,8	50,8	0	0	0
Etilenoglicol	48	29	19	47	1,9

Fonte: Rojo et al. (2015).

A hidrofiliicidade da superfície dos nãotecidos foi quantificada a partir do cálculo da energia livre interfacial (ΔG), a qual foi determinada a partir dos componentes de energia de superfície dos nãotecidos (γ^{LW} , γ^{AB}) e dos parâmetros de tensão superficial da água deionizada (γ^{LW} , γ^{AB}) empregando a Equação 13 (van OSS, 1995).

(13)

8.1.7 Perfil de hidratação

As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de 2 cm x 2 cm, os quais foram secos a 30 °C por 12 h, armazenados em dessecador com sílica por 24 horas e, em seguida, tiveram sua massa determinada. Posteriormente os corpos de prova foram imersos em 25 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) (pH = 7,4) a 37 °C em intervalo de tempo entre 30 e 360 min. Em intervalos predeterminados, os corpos de prova foram retirados e o excesso de solução removido levemente com papel toalha sendo, em seguida, determinada a massa da amostra. As análises foram realizadas em triplicata para cada amostra e a capacidade de hidratação das membranas foi calculada de acordo com a Equação 14:

(14)

Onde m_s e m_u representam as massas dos corpos de prova secos e após intumescimento em PBS, respectivamente.

8.1.8 Taxa de transmissão de vapor de água (TVA)

A taxa de transmissão de vapor de água (TVA) nos nãotecidos foi determinada gravimetricamente segundo metodologia proposta pela ASTM (*American Society for Testing and Material*), E96/E96M 16 (ASTME96/E96M-16, 2016) modificada, à temperatura de 25 °C. Amostras de nãotecidos foram dimensionadas em formato circular com 2,5 cm de diâmetro e aplicadas em células de permeação contendo água destilada. Estas células tiveram a massa medida e foram colocadas em ambiente com umidade relativa de 33 % a 37 °C por 24 h e pesadas novamente. A taxa de transmissão de vapor de água foi calculada como TVA ($\text{g m}^{-2}24\text{h}$) = $(\Delta m)/(At)$, onde Δm consiste na massa perdida após 24 h, A corresponde à área do nãotecido exposta à transferência de vapor e t o tempo de análise. A análise foi realizada em quadruplicata para cada nãotecido.

8.1.9 Degradação enzimática

A suscetibilidade dos nãotecidos à degradação enzimática foi avaliada por imersão dos mesmos em tampão fosfato estéril (pH=7,4), contendo 5.500 unidades de lisozima/mL de solução. A concentração de lisozima empregada corresponde ao valor médio da concentração dessa enzima presente no exsudato liberado em decorrência de lesão na pele (BUCHAN et al., 1981). Os nãotecidos foram cortados (10x10 mm), pesados, imersos em 5 mL de tampão fosfato contendo lisozima e mantidos a 37 °C em câmara incubadora (MARCONI M410). Após período de 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h os corpos de prova foram removidos da solução, lavados com água deionizada, congelados e liofilizados a -55 °C por 48 h em liofilizador LIOTOP, modelo L101. Depois de liofilizadas, as amostras foram pesadas e o percentual de degradação dos nãotecidos foi calculado com base na razão entre os valores das massas das amostras antes e após o ensaio. As análises foram realizadas em triplicata e para cada condição avaliada foi executado ensaio controle, também em triplicata, que correspondeu à exposição dos nãotecidos somente ao tampão fosfato.

8.1.10 Difração de raios-X em ângulo rasante (GIXRD)

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X com ângulo de incidência rasante em difratômetro Bruker Advance D8 com acessório para filmes finos operando a 40 kV e 40 mA com feixe de radiação de Cu K α (1,5406 Å). O ângulo de incidência foi de 1 °, o intervalo 2 θ foi de 5 a 50 ° e a velocidade de varredura foi de 2,5 °/min. O índice de

cristalinidade (ICr) das amostras foi calculado utilizando metodologia proposta por GUPTA et al. (2012) utilizando a Equação 15:

(15)

Em que A_{crist} expressa a área de contribuição cristalina obtida subtraindo a contribuição amorfa da área total (A_{total}) do difratograma. A contribuição amorfa foi estimada a partir do tratamento do difratograma com o programa *X'Pert HighScore* versão 3.0 (DEGEN et al., 2014).

8.1.11 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos nãotecidos foi avaliada com o auxílio de equipamento TGA-50 da Shimadzu. Aproximadamente 8 mg de amostra foram colocados em porta amostra de platina e aquecidos de 25 até 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹.

8.1.12 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A estabilidade térmica e cristalinidade dos nãotecidos também foi avaliada por calorimetria exploratória diferencial em equipamento Q2000 da TA *instruments* em atmosfera de nitrogênio. Amostras (4,5—5,0 mg) dos nãotecidos foram aquecidas de -50 a 200 °C, resfriadas até 50 °C e novamente aquecidas até 200 °C. A análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio e a taxa de aquecimento e resfriamento foi de 10 °C.min⁻¹. O grau de cristalinidade dos nãotecidos foi calculado a partir dos correspondentes valores de entalpia de fusão de acordo com a Equação 16:

(16)

Onde ΔH_m é a entalpia de fusão do nãotecido, $m_{\text{PCL/QCh}}$ é a fração mássica de PCL na blenda e $\Delta H_{m,\text{PCL}}$ consiste no valor teórico de entalpia de fusão para amostra de PCL 100 % cristalina (166 J g⁻¹) (MALHEIRO et al., 2010).

8.1.13 Propriedades mecânicas: Ensaios de tração

As propriedades mecânicas dos nãotecidos foram avaliadas através de análise dinâmico-mecânica no modo de tração, empregando equipamento TA Instruments DMA

Q800 utilizando uma garra do tipo *Tension film*. Ensaios de tração foram realizados em corpos de provas obtidos nas direções paralela e perpendicular ao coletor, conforme representação esquemática na Figura 14, nos nãotecidos secos e hidratados após intumescimento em tampão fosfato salino (pH = 7,4) por 4 h a 37 °C com intuito de simular as condições de aplicação desses materiais. Em todos os casos, pelo menos 8 corpos de prova retangulares (20 mm $\times$ 6,4 mm) foram avaliados. Os ensaios foram realizados com espaço entre garras de 5 mm, rampa de força de 1 N min⁻¹ até 18 N e força de pré-carga de 0,01 N, a 25 °C. Para realizar o ensaio mecânico das amostras hidratadas, os corpos de prova foram retirados do tampão PBS, levemente pressionados com papel toalha para remoção do excesso de solução e imediatamente avaliados. As propriedades determinadas a partir das análises dinâmico-mecânicas no modo de tração foram: módulo de elasticidade (MPa), alongamento na ruptura (%) e tensão na ruptura (MPa).

Figura 14 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrofiação sendo que (A) e (B) representam os corpos de prova dos nãotecidos retirados nas direções perpendicular e paralela ao coletor, respectivamente

Fonte: Autoria própria.

8.1.14 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos nãotecidos

A citotoxicidade *in vitro* dos nãotecidos em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) e queratinócitos humano (HaCaT) foi avaliada de forma indireta conforme metodologia adaptada da ISO 10993-5 (ISO10993-5, 2009) e descrita por Neamark et al. (2007), utilizando método de redução do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Essa etapa do trabalho foi desenvolvida

em colaboração com o Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) sob coordenação da Dra. Natália Mayumi Inada.

As células foram mantidas em frascos de cultura celular em meio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 0,5 % de antibiótico (solução de penicilina/estreptomicina), em estufa incubadora umidificada a 37°C e atmosfera contendo 5 % de CO₂. Extratos dos nãotecidos foram obtidos após exposição dos mesmos em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino durante 24 horas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Após este período, os extratos foram filtrados em membrana de acetato de celulose e submetido a diluições seriadas para obter diferentes taxas de extração (0,25 , 0,5, 1 e 5 mg mL⁻¹).

Para os experimentos, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio enzimático (solução de tripsina, 2,5 g/L, e ácido etilenodiamino tetra-acético, 250 mg/L) e semeadas em placa de 96 poços na proporção de 10⁴ células por poço, em meio de cultura e mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e substituídos pelos extratos das membranas. Na etapa subsequente, as placas foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas, sendo então submetidas ao ensaio colorimétrico de MTT para a determinação do impacto do extrato sobre a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na conversão do sal amarelado de MTT por enzimas mitocondriais em formazan, um cristal azulado, sendo possível relacionar de maneira indireta a viabilidade celular à atividade metabólica das células através da quantificação da absorbância do formazan (NEAMNARK et al., 2007).

Para tanto, após 3 horas de incubação de meio de cultura com 10 % de solução de MTT (5 mg/mL), o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com dimetil sulfóxido. Os valores de absorbância em 570 e 690 nm foram obtidos através da leitura das placas em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, EUA), e a viabilidade de cada grupo foi calculada relacionando-se os valores de sua absorbância ao valor do grupo controle (grupo que não foi exposto ao composto de interesse), que será considerado como 100 % de viabilidade.

8.1.15 Ensaios de adesão celular

Amostras de nãotecidos (25 mm x 25 mm) foram transferidas para microplacas de seis poços, cobertas com meio de cultura e mantidas por 12 horas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Em seguida, 2x10⁵ células de fibroblastos (HDFn) ou queratinócitos (HaCaT) foram

colocadas na superfície de cada amostra de nãotecido e em um poço vazio como controle e as placas foram incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ por período de 12 h. Na etapa subsequente, as células foram fixadas com solução de glutaraldeído a 3,5% por 12 h a 16 °C. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente lavadas com tampão PBS (7,4), desidratadas em escala de concentração ascendente de etanol (30, 50, 70, 80, 90 e 100 %) e secas com hexametil disilazano (HMDS). (Sigma Aldrich, St Louis, USA). As amostras secas foram recobertas com ouro em metalizador *Coating System* BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e analisadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England).

8.2 Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade, com auxílio do programa *Statistica for Windows* versão 10.0 da *StatSoft*.

9 Resultados e discussões

No presente estudo, a técnica de eletrofiação foi empregada para produzir nãotecidos à base de poli(ε-caprolactona) (PCL) e derivado quaternizado de quitosana nas proporções mássicas de 100/0, 95/05, 90/10, 80/20 e 70/30 utilizando como solvente solução ácido acético/ácido fórmico 60/40 (v/v). A escolha do solvente foi baseada na literatura (VAN DER SCHUEREN et al., 2011) e em ensaios preliminares de dissolução. O desafio dessa etapa foi encontrar a melhor proporção dos ácidos acético e fórmico que possibilitassem a dissolução completa da poli(ε-caprolactona) e do derivado quaternizado de quitosana, de modo a obter solução homogênea com viscosidade adequada. A escolha dos parâmetros de solução (concentração e proporção mássica dos polímeros) e de eletrofiação (vazão de solução polimérica, distância agulha-coletor, voltagem aplicada e rotação do coletor) foi baseada em ensaios preliminares nos quais foram considerados a formação de jatos estáveis sem ocorrência de dispersão da solução na forma de aerossol (*electrospraying*).

A eletrofiabilidade de soluções poliméricas e a morfologia das fibras estão relacionadas às propriedades das soluções tais como concentração de polímero, viscosidade, condutividade e tensão superficial. Embora todos esses parâmetros sejam importantes, a viscosidade e condutividade são os principais fatores que afetam as características das fibras obtidas por eletrofiação (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). A Figura 15(A) mostra que o

incremento na concentração de QCh e aumento no grau de quaternização do derivado resultou em maiores valores de condutividade das soluções, o que pode ser atribuído ao maior número de cargas provenientes do QCh. A viscosidade das soluções também aumentou com o incremento na concentração de QCh (Figura 15(B)), sendo que este aumento foi mais pronunciado nas soluções contendo o derivado QCh1. Esse comportamento está relacionado ao maior grau médio de polimerização desse derivado ($\bar{M}_n = 2218$) quando comparado ao derivado QCh2 ($\bar{M}_n = 1427$).

Tentativas de eletrofiar soluções contendo proporções mássicas superiores a 30% do derivado quaternizado foram infrutíferas, sendo observado apenas ocorrência de *electrospraying* em detrimento da produção de fibras, independente de alteração/combinção dos parâmetros de solução e eletrofiação. A não eletrofiação das soluções contendo maiores proporções de QCh é atribuída ao grande aumento das forças repulsivas entre os grupos positivamente carregados do derivado quaternizado de quitosana, portanto dificultando a formação das fibras. Resultados similares aos obtidos no presente estudo quanto à tentativa de eletrofiar soluções contendo apenas derivados quaternizados de quitosana foram relatados por ALIPOUR *et al.*, 2009 e IGNATOVA, M. G. *et al.*, 2010.

Figura 15 - Condutividade (A) e viscosidade dinâmica (B) das soluções poliméricas utilizadas no processo de eletrofiação

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia da superfície dos nãotecidos preparados por eletrofiação foi realizada a partir de amostras (8 mm x 6mm) retiradas na direção perpendicular ao coletor conforme representação esquemática apresentada na Figura 14 (Seção 8.1.12), sendo as micrografias obtidas apresentadas na Figura 16A. A partir das micrografias foram calculadas as distribuições dos diâmetros médios (Figura 16B) e o índice de orientação das fibras (Tabela 6).

As micrografias mostram que em todos os casos houve formação de rede homogênea sem presença de defeitos (*beads*). Os histogramas apresentados na Figura 16B mostram que a distribuição do diâmetro das fibras foi fortemente influenciada pela composição das soluções. A maioria dos nãotecidos apresentou fibras com diâmetro predominantemente na faixa entre 100 nm – 350 nm, sendo verificado que maiores proporções de QCh resultaram em fibras com maior diâmetro e com distribuição de tamanho mais heterogênea. A análise desses dados indica que ocorreu interação entre os fatores viscosidade e condutividade, visto que a formulação contendo maior percentual do derivado apresentou fibras com diâmetros maiores e com distribuição mais heterogênea quando comparada às demais composições, o que pode ser atribuído à maior viscosidade, que leva à ejeção de jatos mais espessos, e à maior condutividade, que aumenta a instabilidade dos jatos ejetados e, portanto, aumenta a heterogeneidade dos diâmetros das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Por outro lado, a comparação dos nãotecidos contendo QCh1 e QCh2 revela que fibras com menor diâmetro foram obtidas a partir das soluções contendo derivado quaternizado QCh2, o que pode ser atribuído à menor viscosidade e maior condutividade das soluções PCL/QCh2.

Figura 16 - Micrografia dos nãotecidos PCL/QCh (A) e correspondentes histogramas referentes a distribuição do diâmetro médio das fibras (B)

Tabela 6 - Diâmetro médio (nm) e coeficiente de coerência das fibras, porosidade e espessura dos não tecidos

Amostra*	Diâmetro de fibra (nm)	Coefficiente de coerência	Porosidade (%)	Espessura (μm)
PCL	175 ± 37 ^a	0.31 ± 0.05 ^a	58.5 ± 4.3 ^a	88 ± 8 ^a
PCL/QCh1 95/05	207 ± 55 ^b	0.29 ± 0.03 ^a	57.0 ± 1.6 ^a	86 ± 4 ^a
PCL/QCh2 95/05	226 ± 90 ^{b,c}	0.32 ± 0.02 ^a	61.4 ± 2.8 ^a	93 ± 11 ^a
PCL/QCh1 90/10	212 ± 61 ^b	0.27 ± 0.01 ^a	70.5 ± 2.1 ^{b,d}	90 ± 6 ^a
PCL/QCh2 90/10	159 ± 33 ^a	0.22 ± 0.01 ^b	81.6 ± 2.0 ^c	97 ± 7 ^a
PCL/QCh1 80/20	240 ± 62 ^c	0.39 ± 0.02 ^c	74.3 ± 1.4 ^{b,c}	58 ± 4 ^b
PCL/QCh2 80/20	199 ± 62 ^{a,b}	0.22 ± 0.01 ^b	71.3 ± 1.0 ^{b,d}	68 ± 8 ^b
PCL/QCh1 70/30	415 ± 117 ^d	0.52 ± 0.04 ^d	61.5 ± 4.0 ^{a,d}	47 ± 5 ^c
PCL/QCh2 70/30	272 ± 108 ^e	0.43 ± 0.01 ^c	66.0 ± 2.4 ^{b,d}	52 ± 12 ^{c,b}

* Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença com nível de significância de 5% pelo teste de *Tukey*.

De acordo com os valores de coeficiente de coerência apresentados na Tabela 6 os não tecidos PCL/QCh1 80/20, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30 exibiram maior quantidade de fibras orientadas, cujo ângulo de orientação predominante, determinado por meio de mapa de cores (Figura 17), foi próximo a 90°. Esse comportamento é atribuído à maior viscosidade das soluções que foram submetidas à eletrofiação para produzir esses não tecidos. À medida que a fibra é anexada na superfície do colector, ela tensiona o jato de solução polimérica formado de modo a favorecer o alinhamento da fibra no sentido de rotação do coletor. Esse alongamento é mais efetivo em soluções com maior viscosidade devido à maior estabilidade dos jatos ejetados e consequente redução do número de fraturas, favorecendo, portanto, a formação de maior quantidade de fibras orientadas (FENNESSEY; FARRIS, 2004; BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Figura 17 - Distribuição de orientação das fibras representada como mapa codificado por cores

Conforme apresentado na Tabela 6, a porosidade dos nãotecidos variou entre $57,0 \pm 1,6 \%$ e $81,6 \pm 2,0 \%$, sendo que os maiores valores foram observados para os nãotecidos PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 80/20 e PCL/QCh2 80/20. Os altos valores de porosidade dos nãotecidos constituem em propriedade importante do ponto de vista de aplicação desses materiais como curativos, visto que podem contribuir para a difusão de nutrientes, a remoção de metabólitos secundários e a troca gasosa, favorecendo, portanto, a regeneração do tecido lesado (CHONG et al., 2007). Na Tabela 6 são apresentados os dados de espessura dos nãotecidos cujos valores variaram entre $47 \pm 5 \mu\text{m}$ e $97 \pm 7 \mu\text{m}$. Os nãotecidos obtidos a partir de soluções com maiores proporções de derivado quaternizado apresentaram menores valores de espessura, o que pode estar relacionada à maior viscosidade das soluções utilizadas no processo de eletrofiação, o que dificulta a ejeção dos jatos e, portanto, resulta na redução da quantidade de fibras que são depositadas no coletor.

9.1 FTIR-ATR

Espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) das amostras de QCh e dos nãotecidos PCL/QCh e PCL foram adquiridos com o objetivo de caracterizar os grupos funcionais presentes na superfície desses materiais (Figura 18). O espectro de infravermelho do QCh2 (Figura 18A) exibe banda larga e intensa centrada em 3349 cm^{-1} que corresponde às deformações axiais de -O-H e -N-H . A banda em 2865 cm^{-1}

é atribuída à deformação axial de $-C-H$. As bandas características em 1653 e 1572 cm^{-1} são correspondentes à deformação axial de $-C=O$ (banda de amida I) e deformação angular de $-NH_2$ (BRUGNEROTTO et al., 2001). A banda em 1472 cm^{-1} é atribuída às deformações $C-H$ dos grupos metil ligados ao grupo trimetilamônio ($-^+N(CH_3)_3$) (CHO et al., 2006). O espectro do derivado QCh1 (não apresentado) apresentou bandas similares ao do QCh2.

Figura 18 - Espectros FTIR-ATR do derivado QCh2 e dos nãotecidos compostos por PCL/QCh2 70/30 e PCL (A); região espectral entre $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$ dos nãotecidos PCL/QCh2 (B)

O espectro do nãotecido composto somente por PCL (Figura 18A) apresenta bandas em 2943 e 2865 cm^{-1} que estão associadas, respectivamente, ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 . A banda em 1730 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo $-C=O$ característico de poliésteres. Além disso, apresenta bandas em 1472 cm^{-1} (deformação assimétrica em CH_3), 1366 cm^{-1} (deformação simétrica fora do plano do grupo CH_3), 1298 cm^{-1} e 1167 cm^{-1} (deformação assimétrica e simétrica do grupo $C-O-C$), 1241 cm^{-1} (vibração do grupo CH_3) 1043 cm^{-1} (estiramento do grupo $C-O$ e deformação assimétrica no plano do grupo CH_2) (JOSHI et al., 2015; DIEZ-PASCUAL; DIEZ-VICENTE, 2016). Os espectros dos nãotecidos PCL/QCh2 exibem bandas características tanto da poli(ϵ -caprolactona) quanto do derivado quaternizado. Na Figura 18A é apresentado o espectro do nãotecido com formulação PCL/QCh2 70/30 no qual as bandas em 3349 cm^{-1} e 1572 cm^{-1} são atribuídas às deformações axiais de $-O-H$ e $-N-H$ e angular de $-NH_2$, respectivamente, devido à presença de QCh, enquanto as bandas em 1730 cm^{-1} , 1167 cm^{-1} 1043 cm^{-1} estão associadas à presença

da poli(ε-caprolactona). Bandas similares também foram observadas nos espectros dos demais nãotecidos.

A comparação dos espectros dos nãotecidos PCL/QCh2 na região 3000 - 3600 cm⁻¹ (Figure 18B) claramente mostra que a intensidade da banda centrada em 3349 cm⁻¹ gradualmente aumenta com o incremento da concentração de QCh, o que é atribuído ao aumento na quantidade de grupos —NH₂ e —OH na superfície desses materiais. Tendência similar foi observada nos espectros dos nãotecidos PCL/QCh1.

9.2 Ângulo de contato, energia de superfície e energia livre de interação (ΔG)

O caráter hidrofílico/hidrofóbico da superfície de curativos consiste em parâmetro que influencia diversos processos interfaciais como a adesão e proliferação celular bem como a capacidade de absorção de fluidos corporais e a transferência de nutrientes e metabólitos para as células (HARNETT; ALDERMAN; WOOD, 2007; YEO; KIM, 2012). Nesse sentido, visando avaliar a hidrofilicidade da superfície dos nãotecidos, medidas de ângulo de contato com diferentes líquidos de prova (água deionizada, diiodometano e etilenoglicol) foram realizadas (Tabela 7), revelando que a composição dos nãotecidos influenciou fortemente a interação da superfície com esses líquidos. Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que os valores de ângulo de contato com água e etilenoglicol reduziram com o aumento da quantidade de QCh e do grau de quaternização. Tendência oposta foi verificada quando o líquido de prova utilizado foi o diiodometano, indicando, portanto, o aumento do caráter hidrofílico das superfícies.

Tabela 7 - Ângulos de contato médio dos diferentes líquidos de prova em função da composição dos nãotecidos

Amostra*	Água	Etilenoglicol	Diiodometano
PCL	99,7 ± 1,5 ^a	45,0 ± 2,5 ^a	20,8 ± 0,4 ^a
PCL/QCh1 95/05	95,3 ± 1,2 ^{a,b}	37,1 ± 0,7 ^b	24,5 ± 0,8 ^b
PCL/QCh2 95/05	94,1 ± 1,1 ^b	35,0 ± 3,9 ^c	25,6 ± 1,8 ^b
PCL/QCh1 90/10	63,3 ± 2,8 ^c	28,6 ± 0,9 ^d	27,1 ± 0,7 ^{b,c}
PCL/QCh2 90/10	57,4 ± 1,8 ^c	29,3 ± 0,5 ^{c,d}	29,9 ± 2,1 ^c
PCL/QCh1 80/20	59,9 ± 2,0 ^c	26,0 ± 2,4 ^{d,e}	31,6 ± 2,3 ^c
PCL/QCh2 80/20	51,9 ± 2,0 ^d	25,6 ± 2,1 ^e	33,1 ± 1,4 ^{c,d}
PCL/QCh1 70/30	43,2 ± 1,2 ^e	25,1 ± 1,1 ^e	37,1 ± 2,4 ^d
PCL/QCh2 70/30	35,5 ± 1,8 ^f	22,9 ± 1,2 ^e	42,0 ± 3,5 ^e

* Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença com nível de significância de 5% pelo teste de *Tukey*.

A partir dos dados de ângulo de contato e dos valores de tensão superficial dos líquidos de prova, foram determinados os valores de energia livre de superfície (γ_{Total}) e de seus componentes apolar (γ^{LW}), polar (γ^{AB}), elétron receptor (γ^+) e elétron doador (γ^-) conforme modelo proposto por van Oss, Chaudhery e Good (Tabela 8) (VAN OSS; CHAUDHURY; GOOD, 1988). O componente apolar (γ^{LW}) compreende a capacidade das moléculas da superfície realizarem interações intermoleculares do tipo van der Waals, ao passo que o componente polar (γ^{AB}) expressa outros possíveis tipos de interação, tais como interações dipolo-dipolo e ligações hidrogênio, sendo determinado a partir dos componentes elétron receptor (γ^+) e elétron doador (γ^-) ($\gamma^{\text{AB}} = 2$) (VAN OSS, 1995).

Tabela 8 - Valores dos componentes da energia livre de superfície* e energia livre de interação (ΔG) dos nãotecidos em mJ m^{-2}

Amostra**	γ^{LW}	γ^-	γ^+	γ^{AB}	γ^{TOTAL}	ΔG
PCL	$47,5 \pm 0,1^a$	$1,0 \pm 0,3^a$	$0,50 \pm 0,01^a$	$1,4 \pm 0,2^a$	$49,0 \pm 0,4^a$	$-80,3 \pm 2,8^a$
PCL/QCh1 95/05	$46,3 \pm 0,3^a$	$0,9 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^b$	$2,1 \pm 0,1^b$	$48,2 \pm 0,1^a$	$-73,7 \pm 1,3^b$
PCL/QCh2 95/05	$46,4 \pm 0,2^a$	$0,9 \pm 0,2^a$	$1,6 \pm 0,1^c$	$2,3 \pm 0,1^b$	$48,6 \pm 0,3^a$	$-71,5 \pm 0,3^b$
PCL/QCh1 90/10	$45,6 \pm 0,5^{a,b}$	$16,1 \pm 0,3^b$	$0,21 \pm 0,01^d$	$3,7 \pm 0,1^c$	$49,5 \pm 0,4^a$	$-27,9 \pm 1,0^c$
PCL/QCh2 90/10	$44,4 \pm 0,7^b$	$19,5 \pm 0,4^c$	$0,18 \pm 0,03^d$	$3,7 \pm 0,2^c$	$48,0 \pm 0,7^a$	$-20,6 \pm 0,2^d$
PCL/QCh1 80/20	$43,5 \pm 0,7^b$	$17,7 \pm 1,5^{c,b}$	$0,4 \pm 0,05^f$	$5,2 \pm 0,1^d$	$48,7 \pm 0,8^a$	$-20,5 \pm 1,6^d$
PCL/QCh2 80/20	$42,9 \pm 0,4^{b,c}$	$24,3 \pm 0,5^d$	$0,3 \pm 0,01^g$	$5,5 \pm 0,03^d$	$48,4 \pm 0,7^a$	$-9,2 \pm 0,5^e$
PCL/QCh1 70/30	$41,0 \pm 1,2^c$	$37,7 \pm 2,3^e$	$0,20 \pm 0,02^d$	$5,1 \pm 0,3^d$	$46,0 \pm 0,4^b$	$+16,2 \pm 2,7^f$
PCL/QCh2 70/30	$38,6 \pm 1,3^d$	$47,8 \pm 1,4^f$	$0,26 \pm 0,03^g$	$7,0 \pm 0,3^e$	$45,0 \pm 0,6^b$	$+29,5 \pm 2,1^g$

*Componentes apolar (γ^{LW}), polar (γ^{AB}), elétron receptor (γ^+) e elétron doador (γ^-) e energia de superfície total (γ^{TOTAL}); **Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença com nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Os dados apresentados na Tabela 8 revelam que a contribuição do componente apolar para a energia livre de superfície dos nãotecidos foi maior que o componente polar, sendo constatado que a contribuição do componente polar aumentou com o incremento na concentração de QCh. De fato, comparando o nãotecido formado somente por PCL e o nãotecido PCL/QCh2 70/30, verifica-se que o componente polar representa 3 e 15 %, respectivamente, da energia total de superfície. Adicionalmente, o componente elétron doador (γ^-) foi fortemente influenciado pela quantidade de QCh, sendo observado um aumento de $1,0 \pm 0,3 \text{ mJ m}^{-2}$ (nãotecido composto somente por PCL) para $47,8 \pm 1,4 \text{ mJ m}^{-2}$ (nãotecido PCL/QCh2 70/30). Por outro lado, o grau médio de quaternização do derivado também influenciou os valores do componente elétron doador (γ^-). Comparando os materiais com mesma proporção de QCh, exceto as formulações PCL/QCh 95/05, foi verificado que os

nãotecidos PCL/QCh2 apresentaram maiores valores de (γ) quando comparados aos nãotecidos PCL/QCh1 ($p < 0,05$). Além disso, a superfície dos nãotecidos preparados com quantidade de QCh igual ou superior a 10% apresentaram predominância do componente elétron doador ($\gamma^- \gg \gamma^+ \approx 0$), revelando, portanto, capacidade de doação de elétrons e de participar de interações polares (VAN OSS, 1995).

Os dados referentes aos componentes da energia livre de superfície foram utilizados para calcular a energia livre de interação (ΔG) da superfície dos nãotecidos com água (Tabela 8), que consiste em medida quantitativa da hidrofilicidade ou hidrofobicidade. Por convenção, $\Delta G > 0$ caracteriza superfícies hidrofílicas, enquanto superfícies hidrofóbicas são caracterizadas por $\Delta G < 0$. Os dados apresentados na Tabela 8 revelam que os valores de ΔG ficaram menos negativos com o incremento na quantidade de QCh e com o aumento do grau de quaternização evidenciando, portanto, o aumento progressivo da hidrofilicidade. Esses resultados corroboram a evidência observada pela análise de ATR-FTIR de que houve progressivo aumento na quantidade de grupos hidrofílicos (grupos amônio, amina e hidroxilas) expostos na superfície dos nãotecidos provenientes do derivado quaternizado de quitosana. De maneira geral, superfícies hidrofílicas são mais favoráveis à adesão e proliferação de diferentes tipos de células quando comparadas às superfícies hidrofóbicas (ARIMA; IWATA, 2007; HARNETT; ALDERMAN; WOOD, 2007; DIEZ-PASCUAL; DIEZ-VICENTE, 2016). Sendo assim, os resultados desse estudo demonstram que os nãotecidos, exceto os formados somente por PCL e as formulações PCL/QCh 95/05, podem favorecer a adesão celular e, conseqüentemente, melhorar o processo de cicatrização.

9.3 Capacidade de hidratação dos nãotecidos

Curativos devem ser capazes de manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida, o que é fundamental para prevenir a desidratação da região lesionada e favorecer o processo de cicatrização (BOATENG et al., 2008). A capacidade de absorção de fluidos de um material a ser aplicado como curativo consiste em critério importante associado à manutenção desse equilíbrio e permite estimar a capacidade de absorção de exsudatos (YOO; KIM, 2008; NINAN et al., 2016). Nesse contexto, medidas de grau de hidratação dos nãotecidos foram realizadas em solução tampão fosfato salino (pH = 7,4) a 37 °C de modo a simular as suas condições de aplicação. As curvas de grau de hidratação em função do tempo estão apresentadas na Figura 19 e revelam que a capacidade de absorção de água foi fortemente influenciada pela composição dos nãotecidos. Foi observado que as formulações contendo

derivado quaternizado de quitosana apresentaram formação de um platô após 30 minutos, enquanto o nãotecido formado somente por poli(ϵ -caprolactona) atingiu platô após 120 minutos. Adicionalmente, a máxima capacidade de hidratação aumentou com o incremento na concentração de QCh e do grau de quaternização, o que pode ser atribuído ao progressivo aumento do caráter hidrofílico dos nãotecidos. De fato, o nãotecido PCL/QCh2 70/30 apresentou capacidade máxima de absorção de água pelo menos duas vezes superior ao composto somente por PCL.

Figura 19 - Grau de hidratação em função do tempo e da composição dos nãotecidos

A porosidade também pode afetar a capacidade de hidratação, pois está relacionada à quantidade de espaço disponível para a absorção de água. Foi verificado que os nãotecidos com menores valores de porosidade (PCL/QCh 100/0 e PCL/QCh 95/05) apresentaram menor capacidade de hidratação. Esses resultados demonstram que a capacidade de hidratação dos nãotecidos PCL/QCh pode ser modulada de acordo com a quantidade de QCh e do grau de grau de quaternização para atender aos requisitos necessários para tratamento de lesões de pele que liberam muito ou pouco exsudato. Assim, em função da alta capacidade de hidratação, os nãotecidos contendo QCh em proporção igual ou superior a 10 % apresentam potencial para serem empregados no tratamento de lesões que liberam grande quantidade de exsudato.

9.4 Taxa de transmissão de vapor de água (TVA)

A capacidade de um curativo permitir a passagem de vapor de água do leito da ferida para a atmosfera é determinada pela taxa de transmissão de vapor de água (TVA). Elevada TVA pode levar à desidratação do leito da ferida, ao passo que baixa TVA pode resultar em acúmulo de exsudados e, conseqüentemente, aumento do risco de contaminação. Neste sentido, um curativo deve apresentar adequada TVA de modo a permitir o equilíbrio de umidade no leito da ferida (XU et al., 2016). Os valores de TVA dos nãotecidos estão apresentados na Figura 20 e mostram variação entre 1600 g m⁻²24h - 2500 g m⁻²24h. O maior valor de TVA foi observado no caso do nãotecido PCL/QCh1 70/30 (2435 $\pm$ 56 g.m⁻².24h), enquanto os nãotecidos PCL e PCL/QCh 95/05 apresentaram os menores valores de TVA ($\approx$ 1600 g m⁻²24h).

Figura 20 - Taxa de transmissão ao vapor de água (TVA) dos nãotecidos. Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna apresentam diferença com nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Os principais fatores que afetam a TVA são a porosidade e hidrofiliidade do material, sendo que baixos valores de porosidade dificultam a passagem do vapor de água, enquanto o aumento da hidrofiliidade favorece as interações entre as moléculas de água e o nãotecido, facilitando, portanto, a passagem do vapor de água através do material (XU et al., 2016). De fato, os nãotecidos formados somente por PCL e as formulações PCL/QCh 95/05

apresentaram os menores valores de porosidade e hidrofiliabilidade, o que justifica o menor TVA desses materiais. Alguns estudos sugerem que curativos que apresentam TVA entre 2000 g m⁻²24h - 2500 g m⁻²24h são adequados para manter o equilíbrio de umidade na região lesionada (CHEN et al., 2011; XU et al., 2016). Dessa forma, excetuando os não tecidos formados somente por PCL e PCL/QCh 95/05, os demais apresentam adequada taxa de transmissão de vapor de água quando considerada a aplicação desses materiais como potenciais curativos.

9.5 Degradação enzimática

A avaliação da estabilidade de um curativo em meio biológico é de fundamental importância, pois determina o tempo de vida útil desse material após o início de sua utilização pelo paciente. A lisozima é uma enzima que atua no mecanismo de defesa contra bactérias, especialmente as gram-positivas, catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas β (1→ 4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina que são os componentes que formam a peptidoglicana, principal polissacarídeo presente na parede celular de bactérias (ERCAN; DEMIRCI, 2015). A lisozima está presente em fluidos corpóreos tais como a saliva, lágrima e leite, além de ser encontrada em grande parte dos tecidos. A lesão da pele leva ao aumento na concentração dessa enzima em decorrência de reação inflamatória, sendo que a concentração dessa enzima no exsudato varia entre 1.000 unidades/mL a 5.500 unidades/mL (BUCHAN et al., 1981; NIYONSABA; OGAWA, 2005). Considerando que um curativo é exposto ao exsudato, os não tecidos foram avaliados *in vitro* quanto à estabilidade na presença e ausência de lisozima, sendo as curvas de perda de massa em função do tempo apresentadas na Figura 21 (a) e (b), respectivamente.

Figura 21 - Curva de perda de massa dos não tecidos em função do tempo de incubação a 37 °C em tampão fosfato (pH = 7,4) na ausência (a) e na presença de lisozima (b)

Comparando-se os valores de perda de massa dos nãotecidos na presença e na ausência de lisozima, notou-se que a degradação dos nãotecidos se deve basicamente à solubilização do QCh no tampão PBS e não à ação da lisozima, mesmo em elevada concentração dessa enzima e tempo de exposição prolongado. Foi observado que o nãotecido composto somente por poli(ϵ -caprolactona) não apresentou qualquer alteração de massa ao longo da análise. Adicionalmente, a estabilidade dos nãotecidos nos meios avaliados se reduziu com o aumento na proporção de QCh e não foi afetada pelo grau de quaternização dos derivados ($p > 0,05$). Este comportamento pode ser explicado com base nas características da quitosana utilizada na síntese do derivado quaternizado e pela presença da poli(ϵ -caprolactona).

De fato, a degradação da quitosana é dependente, dentre outros fatores, do grau médio de acetilação, já que a lisozima interage com os grupamentos *N*-acetilglucosamina presentes na estrutura desse polissacarídeo (KEAN; THANOU, 2010). De acordo com Nordtveit; Vårum e Smidsrød (1996), quitosanas com grau médio de acetilação () acima de 30 % apresentam maior suscetibilidade à degradação por lisozima mesmo em períodos curtos de exposição, ao passo que as de grau de acetilação inferior a 20 % são dificilmente degradadas. Não há estudos relacionados à avaliação da degradabilidade por lisozima do derivado empregado no presente trabalho. Contudo, Verheul et al. (2009) avaliaram a ação da lisozima sobre *N,N,N*-trimetilquitosana, um derivado quaternizado de quitosana, e concluíram que a presença dos grupos amina quaternários não influenciou na degradação do polímero, sendo que o grau de acetilação da quitosana de partida foi o fator que determinou a suscetibilidade do derivado à degradação. Diante disso, o fato dos nãotecidos à base de PCL/QCh não serem susceptíveis à degradação por lisozima é justificado, ao menos parcialmente, pelo baixo grau médio de acetilação (5 %) da quitosana de partida. Adicionalmente, a poli(ϵ -caprolactona) não

é susceptível à ação da lisozima e sua degradabilidade em fluidos corporais é muito lenta (2 – 4 anos, dependendo da massa molecular), justificando, portanto, a maior estabilidade dos nãotecidos contendo maiores percentuais de PCL (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

9.6 Difração de raios-X com incidência rasante (GIXRD)

A caracterização estrutural dos nãotecidos por GIXRD está ilustrada nos difratogramas apresentados na Figura 22(a). Em todos os materiais analisados foi observado a presença de dois picos intensos em $2\theta = 21,4^\circ$ e $2\theta = 23,7^\circ$, os quais são característicos da poli(ε-caprolactona) (GUPTA et al., 2012). A intensidade desses picos reduziu com o aumento da concentração de QCh e foi menor para os nãotecidos PCL/QCh2 quando comparado aos nãotecidos PCL/QCh1 (Figura 22(b)). Não foram observados picos característicos do QCh. Conforme verificado na seção 5.5 do capítulo anterior, esse polímero é amorfo e apresenta apenas um pico em $2\theta = 20,2^\circ$, o qual foi sobreposto pelo pico da poli(ε-caprolactona). Essa sobreposição de picos é explicada pela preponderância da quantidade de PCL em relação ao QCh em todas as composições. Com base no método proposto por Gupta et al. (2012), a cristalinidade dos nãotecidos foi calculada e os valores estão listados na Tabela 9.

Figura 22 - Difratograma de raios-X dos nãotecidos na região $5^\circ < 2\theta < 50^\circ$ (a) e na região $20^\circ < 2\theta < 25^\circ$ (b)

(a)

(b)

Tabela 9 – Cristalinidade dos nãotecidos determinada a partir dos difratogramas conforme metodologia proposta por Gupta et al. (2012)

Amostra	Cristalinidade (%)
---------	--------------------

PCL	66,9
PCL/QCh1 95/05	65,6
PCL/QCh2 95/05	63,7
PCL/QCh1 90/10	62,9
PCL/QCh2 90/10	61,0
PCL/QCh1 80/20	60,4
PCL/QCh2 80/20	52,3
PCL/QCh1 70/30	50,6
PCL/QCh2 70/30	40,4

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que houve redução da cristalinidade com o incremento na concentração de QCh. Esse comportamento é explicado pelo fato de que o aumento da concentração do derivado resulta em maior número de ligações hidrogênio entre os grupos carbonila da poli(ε-caprolactona) e os grupos hidroxila, amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) e quaternizados ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) do QCh, as quais favorecem a miscibilidade entre os dois polímeros, porém dificultam o rearranjo, nucleação e cristalização da poli(ε-caprolactona) (SENDA; HE; INOUE, 2002; JHALA; RATHER; VASITA, 2016). Também foi observado que a cristalinidade dos nãotecidos PCL/QCh2 foi inferior à dos nãotecidos PCL/QCh1, o que é atribuído ao menor grau médio de polimerização do derivado QCh2 comparado ao do QCh1. Cadeias poliméricas mais curtas apresentam maior mobilidade em solução e capacidade de interação com as cadeias de PCL quando comparada as mais longas, dificultando, assim, a formação dos domínios cristalinos (GIL-CASTELL et al., 2017).

9.7 Análise termogravimétrica

As curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivativa (DTG) (Figuras 23(a) e 23(b)) dos nãotecidos PCL e PCL/QCh mostram perfis de perda de massa com um e três eventos térmicos principais, respectivamente, cujos dados correspondentes estão listados na Tabela 10.

Figura 23 – Curvas TG (a) e DTG (b) dos nãotecidos à base de PCL/QCh obtidas sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

(a)

(b)

Tabela 10 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica dos nãotecidos à base de PCL/QCh

Amostra	Primeiro estágio		Segundo estágio			Terceiro estágio		
	Faixa	Δm (%)*	Faixa	Tonset (°C)**	Δm (%)	Faixa	Tonset (°C)	Δm (%)
PCL	-	-	-	-	-	290-440	374	93,2
PCL/QCh1 95/05	25-100	0,1	262-300	270	1,3	340-450	390	87,3
PCL/QCh2 95/05	25-100	0,3	260-293	268	2,5	350-445	392	87,6
PCL/QCh1 90/10	25-100	0,6	259-306	267	4,0	354-450	393	81,2
PCL/QCh2 90/10	25-100	1	256-306	265	4,8	352-445	395	81,7
PCL/QCh1 80/20	25-100	1,6	225-322	257	10,3	350-446	390	71,6
PCL/QCh2 80/20	25-100	2,6	220-316	262	12,4	350-445	391	72,8
PCL/QCh1 70/30	25-100	3	224-330	251	15,2	350-444	390	62,1
PCL/QCh2 70/30	25-100	4,3	220-325	256	17,1	350-450	391	63,5

* Δm (%) = perda de massa; ** T_{onset} = Temperatura onset.

O principal evento de degradação do nãotecido composto somente por poli(ε-caprolactona) se inicia em 290 °C e finaliza em 440 °C, sendo acompanhado por perda de massa de 93,2 %. O primeiro estágio de degradação dos nãotecidos PCL/QCh ocorre no intervalo de temperatura 25–100 °C e está relacionado à evaporação da água adsorvida dos materiais. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, o incremento na concentração de QCh e do grau de quaternização resultou em maior perda de massa nesse estágio. As diferenças observadas são atribuídas ao aumento da hidrofiliabilidade do nãotecido devido ao aumento no percentual de QCh e do grau de quaternização.

O segundo evento térmico observado para os nãotecidos PCL/QCh ocorreu na faixa de temperatura entre 220-330 °C e está associado à degradação do derivado quaternizado de quitosana. Com base nos dados apresentados na Tabela 10, o aumento no percentual de derivado resultou em redução nos valores de temperatura T_{onset} e maior perda de massa nesse estágio. Adicionalmente, os nãotecidos contendo o derivado QCh1 apresentaram menor perda de massa nesse estágio, o que pode ser atribuído à maior estabilidade térmica do derivado QCh1 quando comparado ao derivado QCh2, conforme constatado na seção 5.4 do capítulo anterior.

O terceiro evento térmico ocorreu no intervalo de temperatura 340-450 °C e corresponde principalmente ao processo de degradação da poli(ε-caprolactona), sendo observado menor perda de massa com o incremento na concentração do derivado quaternizado de quitosana e redução do grau de quaternização. Nesse mesmo estágio, foi observado que as temperaturas T_{onset} dos nãotecidos PCL/QCh foram maiores quando comparadas à do nãotecido composto apenas por PCL. De maneira geral, os resultados de

termogravimetria permitem concluir que a estabilidade térmica dos nãotecidos diminuiu com o aumento na concentração de QCh e nos materiais elaborados com o derivado QCh2.

9.8 Calorimetria exploratória diferencial

O comportamento térmico dos nãotecidos também foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial, sendo os termogramas dos nãotecidos PCL/QCh1 e PCL/QCh2 apresentados nas Figura 24 (A) e (B), respectivamente, e os parâmetros térmicos extraídos a partir deles listados na Tabela 11.

Figura 24 - Curvas DSC dos nãotecidos PCL/QCh1 (A) e PCL/QCh2 (B) submetidos a ciclos de aquecimento e resfriamento sob atmosfera de nitrogênio (vazão: 50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento/resfriamento de 10 °C min⁻¹

Tabela 11 - Entalpia de fusão e temperatura de fusão no primeiro ciclo de aquecimento (ΔH_{m1} , T_{m1}), entalpia de cristalização e temperatura de cristalização no ciclo de resfriamento (ΔH_c , T_c), entalpia de fusão e temperatura de fusão no segundo ciclo de aquecimento (ΔH_{m2} , T_{m2}) e grau de cristalinidade ($X_c(\%)$) dos nãotecidos

Amostra	Primeiro aquecimento		Resfriamento		Segundo aquecimento		$X_c(\%)$
	$\Delta H_{m1}(J/g)$	$T_{m1}(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(J/g)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_{m2}(J/g)$	$T_{m2}(^{\circ}C)$	
PCL	69	65	54	27	45	57	42
PCL/QCh1 95/05	65	63	48	24	43	61	41
PCL/QCh2 95/05	64	63	48	24	43	61	41
PCL/QCh1 90/10	59	63	44	23	38	61	39
PCL/QCh2 90/10	55	63	43	24	36	62	36
PCL/QCh1 80/20	50	62	34	25	30	60	38
PCL/QCh2 80/20	46	64	36	24	32	60	34
PCL/QCh1 70/30	35	63	31	25	27	60	30
PCL/QCh2 70/30	33	62	33	24	28	59	28

No primeiro ciclo de aquecimento, todas as formulações PCL/QCh apresentaram valores de entalpia de fusão (ΔH_{m1}) e temperatura de fusão (T_{m1}) inferiores ao do nãotecido composto somente por PCL. Adicionalmente, ΔH_{m1} reduziu com o aumento da concentração de QCh e os nãotecidos formulados com QCh1 apresentaram maiores valores de ΔH_{m1} quando comparados aos contendo QCh2. Foi observado ainda que não houve mudança significativa da temperatura de fusão (T_{m1}) com a quantidade de QCh e com a alteração das características estruturais desse polímero.

Conforme apresentado na Tabela 11, a incorporação de QCh também afetou a entalpia de cristalização (ΔH_c), sendo constatada redução de ΔH_c com o aumento na concentração de QCh. Contudo, não houve mudança significativa nos valores de ΔH_c quando as características estruturais do QCh foram alteradas. Além disso, as temperaturas de cristalização dos nãotecidos PCL/QCh foram inferiores ao nãotecido composto somente por poli(ϵ -caprolactona) e não alterou com o aumento da carga de QCh ou com a alteração da estrutura desse polímero.

Com base nos valores de ΔH_m do primeiro ciclo de aquecimento, a cristalinidade dos nãotecidos foi calculada utilizando a Equação 16 (seção 8.1.11) e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 11. Os valores de cristalinidade calculados por essa técnica diferem dos valores obtidos por difração de raios-X descritos no item 9.6, porém apresentam a mesma tendência, ou seja, redução com o aumento da concentração de QCh e nãotecidos PCL/QCh1

apresentaram maiores valores quando comparados aos nãotecidos PCL/QCh2. Essa redução da cristalinidade justifica, em parte, a redução nos valores de ΔH_m no primeiro ciclo de aquecimento e do ΔH_c no ciclo de resfriamento pois, em geral, menor cristalinidade está relacionada à menor estabilidade térmica de um material (SENDA; HE; INOUE, 2002; JHALA; RATHER; VASITA, 2016).

Por outro lado, conforme verificado na análise termogravimétrica, o derivado QCh não sofre decomposição na faixa de temperatura entre 25 – 200 °C que corresponde à parte da faixa de temperatura empregada no ciclo de aquecimento da análise de DSC. Assim, os eventos de fusão e recristalização observados nos termogramas dos nãotecidos estão associados principalmente à quantidade de PCL, o que justifica a redução dos valores observados de valores de ΔH_m no primeiro ciclo de aquecimento e do ΔH_c no ciclo de resfriamento com a redução da concentração desse polímero e as temperaturas de fusão (T_m1) e recristalização (T_c) não se modificarem com alteração da estrutura do derivado quaternizada.

No segundo ciclo de aquecimento foram observados menores valores de ΔH_m e maiores valores de T_m quando comparados aos valores do primeiro ciclo, o que pode ser atribuído ao diferente padrão de cristalização da poli(ε-caprolactona) adotado durante o ciclo de resfriamento quando comparado ao obtido no processo de eletrofiação, o qual foi realizado em temperatura próxima à temperatura de cristalização (T_c) da poli(ε-caprolactona) (GIL-CASTELL et al., 2017).

9.9 Análises mecânicas

Os materiais utilizados como curativos devem apresentar adequadas propriedades mecânicas que facilitem o manuseio e aplicação e também forneçam suporte mecânico para o desenvolvimento das células envolvidas no processo de regeneração do tecido (GHARIBI et al., 2014, 2015). Ensaios de tração foram realizados em corpos de provas obtidos nas direções paralela e perpendicular ao coletor nos nãotecidos secos e hidratados após intumescimento em tampão fosfato salino (pH = 7,4) por 4 h a 37 °C com intuito de simular as condições de aplicação desses materiais. Os resultados extraídos da análise das curvas de tração em função de deformação (não apresentadas) foram o módulo de elasticidade (MPa), alongamento na ruptura (%) e resistência máxima à tração (MPa), cujos valores estão listados na Figura 25.

Figura 25 - Comportamento mecânico dos nãotecidos à base de PCL/QCh secos (a, c, e) e após hidratação em tampão fosfato (b, d e f) nas direções perpendicular e paralela ao coletor

Conforme apresentado na Figura 25, os nãotecidos possuem propriedades mecânicas que variaram de acordo com a composição e com as condições de realização do ensaio, *i. e.* nas direções perpendicular ou paralela em relação ao coletor rotatório e quanto à hidratação. Observou-se nos ensaios realizados na direção perpendicular ao coletor e nos nãotecidos

secos que o menor valor de módulo de elasticidade foi apresentado pelo nãotecido composto somente por PCL ($3,5 \pm 0,3$ MPa), enquanto os nãotecidos formulados com maiores proporções de derivado quaternizado de quitosana, ou seja, os nãotecidos PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30, apresentaram os maiores valores de módulo de elasticidade, sendo estes iguais a $54,4 \pm 4,1$ MPa e $52,4 \pm 8,4$ MPa, respectivamente. Por outro lado, esses nãotecidos apresentaram os menores valores de alongação em ambas direções de análise, enquanto os nãotecidos PCL/QCh1 90/10 e PCL/QCh2 90/10 exibiram a maior capacidade de alongação na direção perpendicular ($127,4 \pm 6,9$ % e $94,9 \pm 4,3$ %, respectivamente) e paralela ($154,4 \pm 14,9$ % and $134,2 \pm 8,8$ %, respectivamente).

Adicionalmente, as análises realizadas nos nãotecidos secos revelam que maiores proporções de derivado quaternizado resultaram em menores valores de tensão na ruptura. Tal comportamento pode ser atribuído à alta interação interfacial entre PCL e QCh em altas concentrações de QCh, o que reduz a mobilidade das cadeias de PCL e resulta em baixos valores de tensão na ruptura (KHAN et al., 2013). Nota-se ainda que todos os nãotecidos apresentaram maior tensão na ruptura na direção perpendicular e, considerando a mesma razão PCL/QCh, os nãotecidos PCL/QCh1 apresentaram maior tensão na ruptura em pelo menos uma das direções de análise comparados aos nãotecidos PCL/QCh2.

A maior tensão na ruptura na direção perpendicular pode ser explicada pela presença de fibras alinhadas nos nãotecidos conforme verificado por microscopia eletrônica de varredura (Figura 16A). Diferentemente das fibras dispostas de forma randômica, as fibras alinhadas necessitam de rotação mínima para se alinharem à direção da tensão aplicada, o que resulta em maior resistência à essa força e, por consequência, maior tensão na ruptura (MUBYANA et al., 2016; KUMAR; VASITA, 2017). Por outro lado, o menor de grau de polimerização do derivado QCh2 comparado ao QCh1 favorece maior interação interfacial entre o PCL e QCh resultando em menor mobilidade das cadeias de PCL, o que restringe a transferência de tensões entre as mesmas e, consequentemente, diminui a tensão na ruptura (HEJNA; FORMELA; SAEB, 2015).

Ensaio mecânicos também foram realizados nos nãotecidos hidratados visando avaliar a aplicabilidade desses materiais na proteção de lesões que liberam grande quantidade de exsudatos. As Figuras 25 (b), (d) e (f) revelam que após hidratação todos os nãotecidos exibiram redução dos valores de módulo de elasticidade e tensão na ruptura, ao passo que houve expressivo aumento na capacidade de alongação em pelo menos um dos sentidos de avaliação. Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito plastificante da água que facilita o

deslizamento das cadeias poliméricas entre si (GHARIBI et al., 2014). Foi observado ainda que o aumento da capacidade de alongação foi mais pronunciado nos nãotecidos contendo os maiores percentuais de QCh (PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30), o que pode ser explicado pela maior capacidade de absorção de água desses materiais, conforme constatado na análise de grau de hidratação descrita anteriormente. Contudo, o aumento da quantidade de água absorvida levou também a maior desestruturação do empacotamento das cadeias poliméricas que constituem os nãotecidos resultando, assim, em menor resistência à tração desses materiais.

As propriedades mecânicas da pele humana dependem da idade, sexo e região do corpo, sendo que os valores de módulo de elasticidade variam entre 0,42 e 20 MPa, alongação entre 10% - 115 % e resistência à tração entre 2,5 e 30 MPa (SUGIHARA et al., 1991; EDWARDS; MARKS, 1995; JUSSILA et al., 2005; PAILLER-MATTEI; BEC; ZAHOUANI, 2008). Diante do fato que o presente trabalho tem por objetivo a produção de nãotecidos com potencial uso como curativos, faz-se necessário a comparação entre as propriedades mecânicas dos nãotecidos com as da pele humana. Importante ressaltar que essa comparação foi realizada apenas para verificação da magnitude dos resultados, uma vez que a comparação direta é dificultada pelas diferenças nas condições de realização dos ensaios. Tendo em vista essa consideração, todos os nãotecidos preparados neste trabalho apresentam propriedades mecânicas adequadas para serem utilizados como curativos. No entanto, os nãotecidos PCL/QCh1 90/10 e PCL/QCh2 90/10 exibem as melhores propriedades mecânicas visto que apresentam maior capacidade de alongação e resistência à tração nos dois sentidos de avaliação em condições simuladas de aplicação.

9.10 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Os estudos de viabilidade celular *in vitro* são importantes para avaliar a biocompatibilidade de materiais e são requeridos antes do desenvolvimento de estudos *in vivo* e uso clínico. Dentre as células que participam do processo de cicatrização estão os fibroblastos, os quais exercem papel fundamental na criação da matriz extracelular e de estruturas de colágeno responsáveis pelo suporte mecânico de outros tipos de células relacionados ao processo de regeneração do tecido lesado (KALLURI; ZEISBERG, 2006; WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007). Os queratinócitos também exercem papel importante no processo de cicatrização atuando principalmente na reepitelização e no processo de contração e remodelação da ferida (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; TER HORST et al., 2017).

Nesse sentido, visando avaliar a citotoxicidade dos nãotecidos, fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) e queratinócitos humanos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de extratos dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30 ($0,25 - 5 \text{ mg mL}^{-1}$) por 12 h e então submetidos ao ensaio de viabilidade celular utilizando método de redução do MTT (Figura 26).

Figura 26 – Viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) (a) e queratinócitos humanos (HaCaT) (b) expostos a diferentes concentrações de extratos dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30

De acordo com a ISO 10993-5 (ISO10993-5, 2009), a redução da viabilidade celular para valores inferiores a 70 % evidencia efeito citotóxico do material. Diante disso, conforme observado na Figura 26 (a) e (b), os nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 podem ser considerados não citotóxicos em relação às células de fibroblastos e queratinócitos visto que, independente da taxa de extração, a viabilidade celular foi acima de 70 %. Por outro lado, a exposição dos fibroblastos e queratinócitos aos extratos do nãotecido PCL/QCh2 70/30 resultou em expressiva redução da viabilidade celular, mesmo em valores menores de taxa de extração ($0,25 \text{ mg / mL}$) demonstrando, portanto, que esse material é citotóxico.

Considerando que os ensaios de viabilidade celular foram realizados com os extratos dos nãotecidos obtidos a partir da exposição desses materiais ao meio de incubação e que a poli(ϵ -caprolactona) é biocompatível e insolúvel em meio aquoso, a redução da viabilidade celular provocada pelos extratos dos nãotecidos PCL/QCh pode ser atribuída à presença do derivado quaternizado no meio de incubação. De fato, os resultados revelaram que a viabilidade celular dos fibroblastos e queratinócitos se reduziu bastante quando expostas ao extrato do nãotecido contendo alta carga de QCh com maior grau de quaternização

(PCL/QCh2 70/30). Esse comportamento pode ser justificado com base no fato de que o aumento na concentração de QCh e do grau de quaternização resulta em maior quantidade de grupos catiônicos no meio de incubação, os quais são capazes de interagir com os sítios negativos presentes nas membranas dos fibroblastos e dos queratinócitos, o que pode danificar a membrana dessas células e, conseqüentemente, levar à redução da viabilidade celular (FISCHER et al., 2003; IGNATOVA et al., 2010; WANG; DING; LI, 2013; WONGWANAKUL et al., 2016).

O estabelecimento de interações entre o biomaterial e as células é considerado passo vital para a regeneração tecidual. Nesse sentido, foi avaliada a adesão e proliferação de fibroblastos e queratinócitos na superfície dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30 por microscopia eletrônica de varredura, conforme apresentado nas Figura 27 e 28, respectivamente. Como pode ser observado, nenhuma célula foi capaz de aderir a superfície dos nãotecidos compostos somente por PCL, enquanto a superfície dos nãotecidos PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 propiciaram boa adesão e proliferação tanto de fibroblastos como de queratinócitos. Adicionalmente, foi verificado que os fibroblastos assumiram morfologia mais alongada e apresentaram crescimento orientado na direção paralela às fibras presentes na superfície do nãotecido PCL/QCh1 70/30 (Figura 27), o que pode ser associado ao maior grau de orientação das fibras desse material. Por outro lado, apesar da alta citotoxicidade dos nãotecidos PCL/QCh2 70/30 verificada nos ensaios de viabilidade celular, foi observada a adesão de fibroblastos e queratinócitos na superfície desse material.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo indicam que os nãotecidos PCL/QCh favoreceram a adesão e proliferação celular quando comparados aos nãotecidos compostos somente por PCL, o que pode ser atribuído ao maior caráter hidrofílico da superfície desses materiais em decorrência da presença do derivado quaternizado (ARIMA; IWATA, 2007; HARNETT; ALDERMAN; WOOD, 2007). Embora investigações adicionais *in vitro* e *in vivo* sejam necessárias, os resultados obtidos demonstram que os nãotecidos PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10 e PCL/QCh1 70/30 possuem maior potencial para serem aplicados como curativos em função de serem atóxicos e possibilitarem a adesão e proliferação tanto de fibroblastos como queratinócitos.

Figura 27 - Micrografias de fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) cultivados por 12 h sobre a superfície dos nãotecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30

Figura 28 - Micrografias de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados por 12 h sobre a superfície dos não tecidos PCL, PCL/QCh1 90/10, PCL/QCh2 90/10, PCL/QCh1 70/30 e PCL/QCh2 70/30

10 Conclusões parciais

Nãotecidos porosos compostos por fibras ultrafinas obtidas por eletrofiação de poli(ϵ -caprolactona) e cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCh) foram preparados com sucesso, sendo que, do nosso conhecimento, essa combinação de polímeros para produção desse tipo de material utilizando o processo de eletrofiação é inédita.

A morfologia das fibras e as propriedades dos nãotecidos foram fortemente dependentes da concentração e das características estruturais (grau médio de quaternização () e grau médio de polimerização ()) do derivado quaternizado. O diâmetro médio e orientação das fibras bem como a porosidade dos nãotecidos podem ser modulados em função da carga de QCh e nas características estruturais desse polímero. As medidas de capacidade de hidratação, taxa de transmissão de vapor de água e propriedades mecânicas dos nãotecidos indicaram a potencialidade desses materiais para serem utilizados como curativos, especialmente em feridas que liberam grande quantidade de exsudatos. Por outro lado, alta concentração de QCh ($\geq 20\%$) resultou em nãotecidos com menor estabilidade em meio aquoso, menor estabilidade térmica e menor resistência mecânica.

Todos os nãotecidos desenvolvidos neste trabalho, exceto PCL/QCh2 70/30, não apresentaram caráter citotóxico em relação às linhagens de células de fibroblastos e queratinócitos. Conforme demonstrado pelas medidas de ângulo de contato, a superfície do nãotecido composto somente por PCL foi considerada hidrofóbica. Contudo, à medida que o conteúdo de QCh nos tecidos de PCL/QCh aumentou, foi verificado aumento da hidrofilicidade das superfícies, o que favoreceu a adesão de fibroblastos e queratinócitos. Adicionalmente, o maior grau de orientação apresentado pelas fibras do nãotecido PCL/QCh1 70/30 favoreceu a orientação relativa dos fibroblastos dérmicos humanos.

A análise global dos resultados permite concluir que os nãotecidos PCL/QCh1 90/10 e PCL/QCh2 90/10 são os mais promissores para serem utilizados como curativos, uma vez que apresentam caráter hidrofílico, elevada capacidade de hidratação, estabilidade em meio aquoso, resistência mecânica tanto secos como hidratados, não apresentam caráter citotóxico, além de favorecerem a adesão e proliferação de fibroblastos e queratinócitos.

Conclusões gerais e Perspectivas

Conclusões gerais e perspectivas

O presente trabalho contribuiu para o desenvolvimento de método simples e eficiente de síntese de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana em meio ácido sob irradiação de micro-ondas. Esse método destaca-se em relação às metodologias de síntese empregando aquecimento convencional por requerer tempo reacional bem inferior (≤ 30 min) para a obtenção de derivado quaternizado altamente substituído.

O uso de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta permitiu que fosse avaliada de forma multivariada a influência da razão molar cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC)/Quitosana (Q), temperatura e tempo reacionais sobre o grau médio de quaternização ($\bar{\alpha}$) e viscosidade intrínseca e sobre o rendimento reacional. Essa abordagem permitiu a melhor compreensão do efeito dos parâmetros reacionais envolvidos na síntese e a modulação das características estruturais do derivado quaternizado conforme as condições reacionais utilizadas.

A capacidade de produzir cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana com características controladas empregando o método de síntese assistido por irradiação de micro-ondas foi explorada na segunda etapa do presente estudo. Derivados quaternizados de quitosana foram sintetizados com diferentes características estruturais (grau médio de quaternização ($\bar{\alpha}$) e polimerização ($\bar{P}_n$)), a saber QCh1 ($\bar{\alpha} = 47,3\%$; $\bar{P}_n = 2218$) e QCh2 ($\bar{\alpha} = 71,1\%$; $\bar{P}_n = 1427$), dissolvidos em diferentes proporções mássicas com poli(ϵ -caprolactona) (PCL/QCh: 100/0 – 70/30) em solução ácido acético/ácido fórmico 60/40 (v/v) e eletrofiados.

O desenvolvimento de nãotecidos à base de poli(ϵ -caprolactona) e cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana empregando a técnica de eletrofiação apresenta caráter inédito e inovador. A combinação das propriedades desses dois polímeros e o uso da técnica de eletrofiação possibilitou a obtenção de materiais compostos por fibras ultrafinas potencialmente aplicáveis como curativos no tratamento de lesões de pele. Nessa etapa do estudo foi constatado que as propriedades físico-químicas e a citotoxicidade dos nãotecidos em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos são ajustáveis em função do conteúdo e das características estruturais do derivado quaternizado, sendo que, dentre as composições avaliadas, os nãotecidos PCL/QCh1 90/10 e PCL/QCh2 90/10 foram considerados os mais promissores para serem utilizados como curativos.

Os ensaios de adesão celular permitiram constatar que a adição de derivado quaternizado favoreceu a adesão de fibroblastos e queratinócitos quando comparado ao nãotecido formado somente por poli(ϵ -caprolactona). Outro aspecto importante que deve ser

destacado nessa etapa do estudo é o fato de que o maior alinhamento das fibras no nãotecido PCL/QCh 70/30 favoreceu a orientação relativa dos fibroblastos. Esse comportamento abre perspectivas para o uso desse material não somente como curativo, mas também na área de engenharia de tecidos e em regeneração tecidual guiada em que o crescimento direcional das células seja requerido.

De maneira geral, os objetivos propostos pelo presente trabalho de doutorado foram atingidos com êxito. Contudo, é importante enfatizar a necessidade da realização de estudos complementares visando avaliar a atividade contra micro-organismos comumente presentes em lesões de pele, tais como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de análises adicionais *in vitro* e *in vivo* da biocompatibilidade dos nãotecidos.

Importante ressaltar que o presente trabalho abre perspectivas para trabalhos futuros. Dentre essas, pode-se citar o uso da técnica eletrofiação coaxial para obter sistemas no qual as fibras apresentam estrutura interna e externa diferenciada (estrutura *core-shell*), em que a estrutura externa (*shell*) é composta por poli(ϵ -caprolactona) e cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana, ao passo que a estrutura interna (*core*) pode carrear um fármaco que auxilie no processo de regeneração do tecido lesado. Esse dispositivo poderia combinar a vantagem da preservação da integridade do fármaco durante o processamento e a possibilidade de sua liberação controlada diretamente na região afetada.

Referências Bibliográficas

ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 6, p. 772–792, 1 jun. 2014.

AGARWAL, S.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 6, p. 963–991, 2013.

ALIPOUR, S. M.; NOURI, M.; MOKHTARI, J.; BAHRAMI, S. H. Electrospinning of poly(vinyl alcohol)–water-soluble quaternized chitosan derivative blend. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2496–2501, 2009.

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 401–414, 1 dez. 2008.

ARIMA, Y.; IWATA, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3074–3082, jul. 2007.

ASTME96/E96M-16. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**ASTM InternationalWest Conshohocken, PA., 2016. .

BABITHA, S.; RACHITA, L.; KARTHIKEYAN, K.; SHOBA, E.; JANANI, I.; POORNIMA, B.; PURNA SAI, K. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 52–90, 15 maio 2017.

BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; GHOURI, M. A.; YOUNUS, M. **Chitosan: A potential biopolymer for wound management**International Journal of Biological MacromoleculesElsevier, , 1 set. 2017. .

BARBER, P. S.; GRIGGS, C. S.; BONNER, J. R.; ROGERS, R. D. Electrospinning of chitin nanofibers directly from an ionic liquid extract of shrimp shells. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 601, 25 fev. 2013.

BASAR, A. O.; CASTRO, S.; TORRES-GINER, S.; LAGARON, J. M.; TURKOGLU SASMAZEL, H. Novel poly(ϵ -caprolactone)/gelatin wound dressings prepared by emulsion electrospinning with controlled release capacity of Ketoprofen anti-inflammatory drug.

Materials Science and Engineering C, v. 81, p. 459–468, 1 dez. 2017.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 15 set. 2008.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, 1 maio 2010.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BORDA, L. J.; MACQUHAE, F. E.; KIRSNER, R. S. Wound Dressings: A Comprehensive Review. **Current Dermatology Reports**, v. 5, n. 4, p. 287–297, 10 dez. 2016.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BUCHAN, I. A.; ANDREWS, J. K.; LANG, S. M.; BOORMAN, J. G.; HARVEY KEMBLE, J. V.; LAMBERTY, B. G. H. Clinical and laboratory investigation of the composition and properties of human skin wound exudate under semi-permeable dressings. **Burns**, v. 7, n. 5, p. 326–334, 1981.

BUKZEM, A. L.; SIGNINI, R.; DOS SANTOS, D. M.; LIÃO, L. M.; ASCHERI, D. P. R. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 615–624, 1 abr. 2016.

CADDICK, S.; FITZMAURICE, R. Microwave enhanced synthesis. **Tetrahedron**, v. 65, n. 17, p. 3325–3355, 25 abr. 2009.

CASETTARI, L.; VLLASALIU, D.; MANTOVANI, G.; HOWDLE, S. M.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2854–2865, 8 nov. 2010.

CHEN, Y.; LI, J.; LI, Q.; SHEN, Y.; GE, Z.; ZHANG, W.; CHEN, S. Enhanced water-solubility, antibacterial activity and biocompatibility upon introducing sulfobetaine and quaternary ammonium to chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 246–253, 5 jun. 2016.

CHEN, Y.; YAN, L.; YUAN, T.; ZHANG, Q.; FAN, H. Asymmetric polyurethane membrane with in situ-generated nano-TiO₂ as wound dressing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 3, p. 1532–1541, 2011.

CHETHAN, P. D.; VISHALAKSHI, B.; SATHISH, L.; ANANDA, K.; POOJARY, B. Preparation of substituted quaternized arylfuran chitosan derivatives and their antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, n. 0, p. 158–164, ago. 2013.

CHO, J.; GRANT, J.; PIQUETTE-MILLER, M.; ALLEN, C. Synthesis and Physicochemical and Dynamic Mechanical Properties of a Water-Soluble Chitosan Derivative as a Biomaterial. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 10, p. 2845–2855, 2006.

CHONG, E. J.; PHAN, T. T.; LIM, I. J.; ZHANG, Y. Z.; BAY, B. H.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 3, p. 321–330, maio 2007.

CIPITRIA, A.; SKELTON, A.; DARGAVILLE, T. R.; DALTON, P. D.; HUTMACHER, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. **J. Mater. Chem.**, v. 21, n. 26, p. 9419–9453, 2011.

DALLINGER, D.; KAPPE, C. O. Microwave-assisted synthesis in water as solvent. **Chemical reviews**, v. 107, n. 6, p. 2563–91, jun. 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 1 ago. 2011.

DE ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 214–221, jan. 2009.

DE BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P. A kinetic study on the thermal degradation of N,N,N-trimethylchitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 353–361, maio 2004.

DE LA HOZ, A.; DÍAZ-ORTIZ, Á.; MORENO, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. **Chemical Society Reviews**, v. 34, n. 2, p. 164–178, 2005.

DE VRIEZE, S.; VAN CAMP, T.; NELVIG, A.; HAGSTRÖM, B.; WESTBROEK, P.; DE

- CLERCK, K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 5, p. 1357–1362, 8 mar. 2009.
- DEGEN, T.; SADKI, M.; BRON, E.; KÖNIG, U.; NÉNERT, G. The HighScore suite. **Powder Diffraction**, v. 29, n. S2, p. S13–S18, 30 dez. 2014.
- DEITZEL, J. .; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; BECK TAN, N. . The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261–272, 1 jan. 2001.
- DESBRIÈRES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, n. 1, p. 21–28, jul. 1996.
- DIEZ-PASCUAL, A. M.; DIEZ-VICENTE, A. L. Electrospun fibers of chitosan-grafted polycaprolactone/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blends. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 4, p. 600–612, 2016.
- EDWARDS, C.; MARKS, R. Bioengineering of the Skin Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375–380, 1995.
- ELSABEE, M. Z.; NAGUIB, H. F.; MORSI, R. E. Chitosan based nanofibers, review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 7, p. 1711–1726, 1 out. 2012.
- ERCAN, D.; DEMIRCI, A. Enhanced human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor coupled with online recovery system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 68–74, 15 jun. 2015.
- FAIZULOEV, E.; MAROVA, A.; NIKONOVA, A.; VOLKOVA, I.; GORSHKOVA, M.; IZUMRUDOV, V. Water-soluble N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride as a nucleic acids vector for cell transfection. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 4, p. 1088–94, 1 ago. 2012.
- FENNESSEY, S. F.; FARRIS, R. J. Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. **Polymer**, v. 45, n. 12, p. 4217–4225, maio 2004.
- FERNANDES, J. S.; GENTILE, P.; MARTINS, M.; NEVES, N. M.; MILLER, C.; CRAWFORD, A.; PIRES, R. A.; HATTON, P.; REIS, R. L. Reinforcement of poly-L-lactic acid electrospun membranes with strontium borosilicate bioactive glasses for bone tissue

engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 168–177, 15 out. 2016.

FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1121–1131, 1 mar. 2003.

FREY, M. W. Electrospinning cellulose and cellulose derivatives. **Polymer Reviews**, v. 48, n. 2, p. 378–391, maio 2008.

GAWANDE, M. B.; SHELKE, S. N.; ZBORIL, R.; VARMA, R. S. Microwave-assisted chemistry: Synthetic applications for rapid assembly of nanomaterials and organics. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 4, p. 1338–1348, 15 abr. 2014.

GE, H.-C.; LUO, D.-K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1351–1356, 23 maio 2005.

GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 3, p. 279–282, 1 jan. 1986.

GENG, X.; KWON, O. H.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5427–5432, 1 set. 2005.

GHARIBI, R.; YEGANEH, H.; GHOLAMI, H.; HASSAN, Z. M. Aniline tetramer embedded polyurethane/siloxane membranes and their corresponding nanosilver composites as intelligent wound dressing materials. **RSC Adv.**, v. 4, n. 107, p. 62046–62060, 2014.

GHARIBI, R.; YEGANEH, H.; REZAPOUR-LACTOEE, A.; HASSAN, Z. M. Stimulation of Wound Healing by Electroactive, Antibacterial, and Antioxidant Polyurethane/Siloxane Dressing Membranes: In Vitro and in Vivo Evaluations. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 43, p. 24296–24311, 2015.

GHASEMI-MOBARAKEH, L.; PRABHAKARAN, M. P.; MORSHED, M.; NASR-ESFAHANI, M.-H.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 34, p. 4532–4539, 2008.

GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, S. M.; MAJETICH, G. Application of

commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 41, p. 4945–4948, 1 jan. 1986.

GIL-CASTELL, O.; BADIA, J. D.; STRÖMBERG, E.; KARLSSON, S.; RIBES-GREUS, A. Effect of the dissolution time into an acid hydrolytic solvent to taylor electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds. **European Polymer Journal**, v. 87, p. 174–187, 2017.

GUPTA, K. K.; KUNDAN, A.; MISHRA, P. K.; SRIVASTAVA, P.; MOHANTY, S.; SINGH, N. K.; MISHRA, A.; MAITI, P. Polycaprolactone composites with TiO₂ for potential nanobiomaterials: tunable properties using different phases. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 37, p. 12844, 2012.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, 12 dez. 2015.

HARNETT, E. M.; ALDERMAN, J.; WOOD, T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 1, p. 90–97, 2007.

HASSIBA, A. J.; EL ZOWALATY, M. E.; NASRALLAH, G. K.; WEBSTER, T. J.; LUYT, A. S.; ABDULLAH, A. M.; ELZATAHRY, A. A. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 715–737, 2016.

HAYATI, I.; BAILEY, A. I.; TADROS, T. F. Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids. I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 117, n. 1, p. 205–221, 1 maio 1987.

HE, C.; NIE, W.; FENG, W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. **J. Mater. Chem. B**, v. 2, n. 45, p. 7828–7848, 29 out. 2014.

HEJNA, A.; FORMELA, K.; SAEB, M. R. Processing, mechanical and thermal behavior assessments of polycaprolactone/agricultural wastes biocomposites. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 725–733, 2015.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by ¹H NMR Spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 87–94, 1991.

HU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 185, n. 1, p. 12–21, 10 jul. 2014.

HUANG, J.; CHENG, Z.-H.; XIE, H.-H.; GONG, J.-Y.; LOU, J.; GE, Q.; WANG, Y.-J.; WU, Y.-F.; LIU, S.-W.; SUN, P.-L.; MAO, J.-W. Effect of quaternization degree on physiochemical and biological activities of chitosan from squid pens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, n. 0, p. 545–550, set. 2014.

IGNATOVA, M. G.; MANOLOVA, N. E.; TOSHKOVA, R. A.; RASHKOV, I. B.; GARDEVA, E. G.; YOSSIFOVA, L. S.; ALEXANDROV, M. T. Electrospun Nanofibrous Mats Containing Quaternized Chitosan and Polylactide with In Vitro Antitumor Activity against HeLa Cells. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1633–1645, 2010.

ILLY, N.; ROBITZER, M.; AUVERGNE, R.; CAILLOL, S.; DAVID, G.; BOUTEVIN, B. Synthesis of water-soluble allyl-functionalized oligochitosan and its modification by thiol-ene addition in water. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 39–48, 2014.

ISO10993–5. International Organization for Standardization, Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. v. 5, p. 32, 2009.

JHALA, D.; RATHER, H.; VASITA, R. Polycaprolactone-chitosan nanofibers influence cell morphology to induce early osteogenic differentiation. **Biomater. Sci.**, v. 4, n. 11, p. 1584–1595, 2016.

JOSHI, M. K.; TIWARI, A. P.; PANT, H. R.; SHRESTHA, B. K.; KIM, H. J.; PARK, C. H.; KIM, C. S. In Situ Generation of Cellulose Nanocrystals in Polycaprolactone Nanofibers: Effects on Crystallinity, Mechanical Strength, Biocompatibility, and Biomimetic Mineralization. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19672–19683, 2015.

JUSSILA, J.; LEPPÄNIEMI, A.; PARONEN, M.; KULOMÄKI, E. Ballistic skin simulant. **Forensic Science International**, v. 150, n. 1, p. 63–71, 2005.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, maio 2006.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical microwave synthesis for organic chemists**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

KAPPE, C. O.; PIEBER, B.; DALLINGER, D. Microwave effects in organic synthesis: Myth or reality? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 4, p. 1088–1094, 2013.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 31 jan. 2010.

KHAN, R. A.; BECK, S.; DUSSAULT, D.; SALMIERI, S.; BOUCHARD, J.; LACROIX, M. Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced poly(caprolactone) composites: Effect of gamma radiation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 5, p. 3038–3046, 2013.

KI, C. S.; KIM, J. W.; HYUN, J. H.; LEE, K. H.; HATTORI, M.; RAH, D. K.; PARK, Y. H. Electrospun three-dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 6, p. 3922–3928, 15 dez. 2007.

KUMAR, P.; VASITA, R. Understanding the relation between structural and mechanical properties of electrospun fiber mesh through uniaxial tensile testing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 26, 10 jul. 2017.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.

LEE, J. M.; CHAE, T.; SHEIKH, F. A.; JU, H. W.; MOON, B. M.; PARK, H. J.; PARK, Y. R.; PARK, C. H. Three dimensional poly(ϵ -caprolactone) and silk fibroin nanocomposite fibrous matrix for artificial dermis. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 758–767, 1 nov. 2016.

LI, S.-D.; LI, P.-W.; YANG, Z.-M.; PENG, Z.; QUAN, W.-Y.; YANG, X.-H.; YANG, L.; DONG, J.-J. Synthesis and characterization of chitosan quaternary ammonium salt and its application as drug carrier for ribavirin. **Drug Delivery**, v. 21, n. 7, p. 548–552, 12 nov. 2014.

LIANG, D.; LU, Z.; YANG, H.; GAO, J.; CHEN, R. Novel Asymmetric Wettable AgNPs/Chitosan Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 6, p. 3958–3968, 2016.

LING, Y.; LUO, Y.; LUO, J.; WANG, X.; SUN, R. Synthesis optimization of quaternized chitosan and its action as reducing and stabilizing agent for gold nanoparticles. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 1194–1200, 2013.

LIU, B.; WANG, X.; YANG, B.; SUN, R. Microwave-assisted synthesis of quaternized carboxymethyl chitosan in aqueous solution and its thermal behavior. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 227–234, 2012.

LOUBAKI, E.; OUREVITCH, M.; SICSIC, S. Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. characterization of modified chitosan by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. **European Polymer Journal**, v. 27, n. 3, p. 311–317, 1991.

LUO, J.; WANG, X.; XIA, B.; WU, J. Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Under Microwave Irradiation. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 47, n. 9, p. 952–956, 30 jul. 2010.

MALHEIRO, V. N.; CARIDADE, S. G.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. New poly(ε-caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 418–428, 2010.

MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H. C.; ITO, E. N.; GREGORSKI, K. S.; ROBERTSON, G. H.; OFFEMAN, R. D.; WOOD, D. F.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Electrospun nanofibers of poly(vinyl alcohol) reinforced with cellulose nanofibrils. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 3, p. 231–242, 1 set. 2008.

MELE, E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 28, p. 4801–4812, 13 jul. 2016.

MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 1 jun. 2017.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 6, p. 1013–1051, 1 jun. 2008.

MUBYANA, K.; KOPPES, R. A.; LEE, K. L.; COOPER, J. A.; CORR, D. T. The influence of specimen thickness and alignment on the material and failure properties of electrospun polycaprolactone nanofiber mats. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 104, n. 11, p. 2794–2800, 1 nov. 2016.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of**

Biological Macromolecules, 20 jul. 2017.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

NARAYANAN, G.; AGUDA, R.; HARTMAN, M.; CHUNG, C.-C.; BOY, R.; GUPTA, B. S.; TONELLI, A. E. Fabrication and Characterization of Poly(ϵ -caprolactone)/ α -Cyclodextrin Pseudorotaxane Nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 1, p. 271–9, 11 jan. 2016.

NEAMNARK, A.; SANCHAVANAKIT, N.; PAVASANT, P.; BUNAPRASERT, T.; SUPAPHOL, P.; RUJIRAVANIT, R. In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 166–172, 2007.

NGO, D.-H.; VO, T.-S.; NGO, D.-N.; KANG, K.-H.; JE, J.-Y.; PHAM, H. N.-D.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Biological effects of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 200–216, 1 out. 2015.

NINAN, N.; FORGET, A.; SHASTRI, V. P.; VOELCKER, N. H.; BLENCOWE, A. Antibacterial and Anti-Inflammatory pH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 42, p. 28511–28521, 2016.

NISTA, S. V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial nanofibers of chitosan-alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 222–228, 20 ago. 2015.

NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 3, p. 157–168, dez. 2005.

NORDTVEIT, R. J.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 2, p. 163–167, 1996.

NUCHTER, M.; ONDRUSCHKA, B.; BONRATH, W.; GUM, A. Microwave assisted synthesis - a critical technology overview. **Green Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 128–141, 2004.

OHKAWA, K. Nanofibers of cellulose and its derivatives fabricated using direct electrospinning. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, p. 9139–54, 19 maio 2015.

OSORIO-MADRAZO, A.; DAVID, L.; TROMBOTTO, S.; LUCAS, J.-M.; PENICHE-COVAS, C.; DOMARD, A. Kinetics Study of the Solid-State Acid Hydrolysis of Chitosan: Evolution of the Crystallinity and Macromolecular Structure. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1376–1386, 10 maio 2010.

PAILLER-MATTEI, C.; BEC, S.; ZAHOUANI, H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, n. 5, p. 599–606, jun. 2008.

PAVINATTO, A.; FIAMINGO, A.; BUKZEM, A. D. L.; SILVA, D. S.; SANTOS, D. M.; SENRA, T. A. D.; FACCHINATTO, W. M.; CAMPANA FILHO, S. P. Chemically Modified Chitosan Derivatives. In: PAVINATTO, A.; FIAMINGO, A.; BUKZEM, A. DE L.; DE SOUZA E SILVA, D.; DOS SANTOS, D. M.; SENRA, T. A. D.; FACCHINATTO, W. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. (Ed.). **Frontiers in Biomaterials**. [s.l.] BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2017. 3p. 107–132.

PELIPENKO, J.; KRISTL, J.; JANKOVÍ, B.; BAUMGARTNER, S.; KOCBEK, P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 125–134, 1 nov. 2013.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M. Chapter 25 - Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In: GANDINI POLYMERS AND COMPOSITES FROM RENEWABLE RESOURCES, M. N. B. B. T.-M. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 517–542.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 5, p. 1197–1211, 13 maio 2006.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 1 jul. 2009.

PRADO, H. J.; MATULEWICZ, M. C. Cationization of polysaccharides: A path to greener derivatives with many industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 52, n. 1, p. 53–75, 2014.

RAYLEIGH, Lord. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. **Philosophical Magazine Series 5**, v. 14, n. 87, p. 184–186, 28 set. 1882.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, n. 10, p. 2387–2425, 13 maio 2008.

RIEGER, K. A.; BIRCH, N. P.; SCHIFFMAN, J. D. Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing - a review. **J. Mater. Chem. B**, v. 1, n. 36, p. 4531–4541, 2013.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, jul. 2006.

ROJO, E.; PERESIN, M. S.; SAMPSON, W. W.; HOEGER, I. C.; VARTIAINEN, J.; LAINE, J.; ROJAS, O. J. Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. **Green Chem.**, v. 17, n. 3, p. 1853–1866, 2015.

RUIHUA, H.; BINGCHAO, Y.; ZHENG, D.; WANG, B. Preparation and characterization of a quaternized chitosan. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 2, p. 845–851, 2012.

SENDA, T.; HE, Y.; INOUE, Y. Biodegradable blends of poly(ϵ -caprolactone) with α -chitin and chitosan: specific interactions, thermal properties and crystallization behavior. **Polymer International**, v. 51, n. 1, p. 33–39, 2002.

SENRA, T. DA; SANTOS, D. M.; DESBRI??RES, J.; CAMPANA-FILHO, S. P. Extensive N-methylation of chitosan: Evaluating the effects of the reaction conditions by using response surface methodology. **Polymer International**, v. 64, n. 11, p. 1617–1626, 1 nov. 2015.

SHAHVERDI, S.; HAJIMIRI, M.; ESFANDIARI, M. A.; LARIJANI, B.; ATYABI, F.; RAJABIANI, A.; DEHPUR, A. R.; GHAREHAGHAJI, A. A.; DINARVAND, R. Fabrication and structure analysis of poly(lactide-co-glycolic acid)/silk fibroin hybrid scaffold for wound dressing applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 345–355, 1 out. 2014.

SHENOY, S. L.; BATES, W. D.; FRISCH, H. L.; WNEK, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: Good solvent, non-specific

polymer-polymer interaction limit. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3372–3384, 25 abr. 2005.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229 LP-258, 23 dez. 2009.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 35, n. 9, p. 473–477, 1 set. 2017.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plastic surgery international**, v. 2013, p. 146764, 24 jul. 2013.

SONG, D. W.; KIM, S. H.; KIM, H. H.; LEE, K. H.; KI, C. S.; PARK, Y. H. Multi-biofunction of antimicrobial peptide-immobilized silk fibroin nanofiber membrane: Implications for wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 39, p. 146–155, 15 jul. 2016.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. In vitro evaluation of N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 103–109, 11 fev. 2011.

SOSNIK, A.; GOTELLI, G.; ABRAHAM, G. A. Microwave-assisted polymer synthesis (MAPS) as a tool in biomaterials science: How new and how powerful. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 1050–1078, 1 ago. 2011. 001255>. Acesso em: 20 out. 2017.

SPINELLI, V. A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium(VI) ion. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, n. 3, p. 347–352, nov. 2004.

SUGIHARA, T.; OHURA, T.; HOMMA, K.; IGAWA, H. H. The extensibility in human skin: variation according to age and site. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 44, n. 6, p. 418–422, 1991.

SUN, B.; LONG, Y. Z.; ZHANG, H. D.; LI, M. M.; DUVAIL, J. L.; JIANG, X. Y.; YIN, H. L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 5, p. 862–890, maio 2014.

SVIRSHCHEVSKAYA, E. V.; ZUBAREVA, A. A.; BOYKO, A. A.; SHUSTOVA, O. A.; GRECHIKHINA, M. V.; SHAGDAROVA, B. T.; VARLAMOV, V. P. Analysis of toxicity and biocompatibility of chitosan derivatives with different physico-chemical properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 483–490, 10 set. 2016.

TAN, H.; MA, R.; LIN, C.; LIU, Z.; TANG, T. Quaternized Chitosan as an Antimicrobial Agent: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action and Biomedical Applications in Orthopedics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1854–1869, 16 jan. 2013.

TAYLOR, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 280, n. 1382, p. 383–397, 28 jul. 1964.

TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 313, n. 1515, p. 453–475, 2 dez. 1969.

TAYLOR, G.; VAN DYKE, M. D. The force exerted by an electric field on a long cylindrical conductor. **Proceedings of the Royal Society of London, Series A (Mathematical and Physical Sciences)**, v. 291, n. 1425, p. 145–158, 5 abr. 1966.

TER HORST, B.; CHOUHAN, G.; MOIEMEN, N. S.; GROVER, L. M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 28 jun. 2017.

VALENTE, T. A. M.; SILVA, D. M.; GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H.; SANTOS, J. D.; SENCADAS, V. Effect of sterilization methods on electrospun poly(lactic acid) (PLA) fiber alignment for biomedical applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3241–3249, 10 fev. 2016.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, n. 3, p. 91–110, 1995.

VAN OSS, C. J.; CHAUDHURY, M. K.; GOOD, R. J. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. **Chemical Reviews**, v. 88, n. 6, p. 927–941, 1 set. 1988.

VANPUTTE, C.; REGAN, J. RUSSO, A. **Anatomia e fisiologia de seeley**. 10. ed. [s.l.: s.n.]

VATANKHAH, E.; SEMNANI, D.; PRABHAKARAN, M. P.; TADAYON, M.; RAZAVI, S.; RAMAKRISHNA, S. Artificial neural network for modeling the elastic modulus of electrospun polycaprolactone/gelatin scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 709–721, fev. 2014.

VERHEUL, R. J.; AMIDI, M.; VAN STEENBERGEN, M. J.; VAN RIET, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation

and in vitro biological properties of trimethylated chitosans. **Biomaterials**, v. 30, n. 18, p. 3129–35, jun. 2009.

WANG, J.; WANG, L.; YU, H.; ZAIN-UL-ABDIN; CHEN, Y.; CHEN, Q.; ZHOU, W.; ZHANG, H.; CHEN, X. Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 333–344, 1 jul. 2016.

WANG, X.; DING, B.; LI, B. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. **Materials Today**, v. 16, n. 6, p. 229–241, 1 jun. 2013.

WASIKIEWICZ, J. M.; YEATES, S. G. “Green” molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, n. 4, p. 863–867, abr. 2013.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WIEGAND, C.; HIPLER, U.-C. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n. 2, p. 1–13, 26 ago. 2010.

WONGWANAKUL, R.; JIANMONGKOL, S.; GONIL, P.; SAJOMSANG, W.; MANIRATANACHOTE, R.; AUEVIRIYAVIT, S. Biocompatibility study of quaternized chitosan on the proliferation and differentiation of Caco-2 cells as an in vitro model of the intestinal barrier. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32, n. 1000460758, p. 92–107, 28 jan. 2016.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, out. 2010.

WU, J.; SU, Z.-G.; MA, G.-H. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, n. 1–2, p. 1–11, 6 jun. 2006.

WU, J.; WEI, W.; WANG, L.-Y.; SU, Z.-G.; MA, G.-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2220–2232, maio 2007.

XIAO, B.; WAN, Y.; WANG, X.; ZHA, Q.; LIU, H.; QIU, Z.; ZHANG, S. Synthesis and

characterization of N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride for potential application in gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 91, n. 0, p. 168–174, 2012a..

XU, R.; XIA, H.; HE, W.; LI, Z.; ZHAO, J.; LIU, B.; WANG, Y.; LEI, Q.; KONG, Y.; BAI, Y.; YAO, Z.; YAN, R.; LI, H.; ZHAN, R.; YANG, S.; LUO, G.; WU, J. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24596, 18 abr. 2016.

XU, T.; XIN, M.; LI, M.; HUANG, H.; ZHOU, S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 931–936, 23 jul. 2010.

XU, Y.; DU, Y.; HUANG, R.; GAO, L. Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 5015–5022, dez. 2003.

XU, Y.; ZOU, L.; LU, H.; KANG, T. Effect of different solvent systems on PHBV/PEO electrospun fibers. **RSC Adv.**, v. 7, n. 7, p. 4000–4010, 16 jan. 2017..

XUE, J.; XIE, J.; LIU, W.; XIA, Y. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 8, p. 1976–1987, 15 ago. 2017.

YAN, D.; HU, S.; ZHOU, Z.; ZEENAT, S.; CHENG, F.; LI, Y.; FENG, C.; CHENG, X.; CHEN, X. Different chemical groups modification on the surface of chitosan nonwoven dressing and the hemostatic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 6 set. 2017..

YEO, M. G.; KIM, G. H. Preparation and Characterization of 3D Composite Scaffolds Based on Rapid-Prototyped PCL/ β -TCP Struts and Electrospun PCL Coated with Collagen and HA for Bone Regeneration. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 5, p. 903–913, 2012.

YEVlampieva, N. P.; GUBAREV, A. S.; GORSHKOVA, M. Y.; OKRUGIN, B. M.; RYUMTSEV, E. I. Hydrodynamic Behavior of Quaternized Chitosan at Acidic and Neutral pH. **Journal of Polymer Research**, v. 22, n. 9, p. 1–9, 2015.

YOO, H.-J.; KIM, H.-D. Synthesis and properties of waterborne polyurethane hydrogels for wound healing dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85B, n. 2, p. 326–333, 2008.

ZAHEDI, P.; REZAEIAN, I.; RANAEI-SIADAT, S.-O.; JAFARI, S.-H.; SUPAPHOL, P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 2, p. n/a-n/a, 1 fev. 2009.

ZAIDI, Z.; LANIGAN, S. W. Skin: Structure and Function. In: **Dermatology in Clinical Practice**. London: Springer London, 2010. p. 1–15.

ZELENY, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. **Physical Review**, v. 3, n. 2, p. 69–91, 1 fev. 1914.

ZHANG, S.; ZHANG, H.; WANG, L.; LIU, X.; WU, Y. Microwave-assisted synthesis of chitosan biguanidine hydrochloride and its regulation on InsR and GLUT2 in insulin resistant HepG2 cells. **RSC Adv.**, v. 7, n. 17, p. 10108–10117, 3 fev. 2017.

ZHAO, S.; WU, X.; GUO, W.; DU, Y.; YU, L.; TANG, J. N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a novel delivery system for Parathyroid Hormone-Related Protein 1–34. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1–2, p. 269–273, 30 jun. 2010.

ZHOU, X.; WANG, H.; ZHANG, J.; LI, X.; WU, Y.; WEI, Y.; JI, S.; KONG, D.; ZHAO, Q. Functional poly(ϵ -caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 54, p. 128–137, 1 maio 2017.

ZHU, D.; CHENG, H.; LI, J.; ZHANG, W.; SHEN, Y.; CHEN, S.; GE, Z.; CHEN, S. Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 79–84, 1 abr. 2016.

ZHU, Y.-J.; CHEN, F. Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 12, p. 6462–6555, 25 jun. 2014.