UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

VIRGÍNIA DE ALENCAR MUNIZ GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS POROSAS À BASE DE QUITOSANA E
LAPONITA PARA TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE**

São Carlos

2018

VIRGÍNIA DE ALENCAR MUNIZ GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS POROSAS À BASE DE QUITOSANA E
LAPONITA PARA TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE**

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Aos meus pais, Jorge e Raquel, que me apoiam e embarcam em meus sonhos, são meu maior exemplo de amor e dedicação. Às minhas irmãs, Raquel e Priscilla, que me incentivam e acreditam em mim e aos meus sobrinhos, Luis Eduardo e Helena, por todos os momentos de felicidade e amor que me proporcionam.

AGRADECIMENTOS

Satisfação e pesar é o que sinto, apresentando esta tese. Satisfação, por saber que foi um trabalho inovador, com ótimos resultados e acima de tudo prazeroso. Custou-me noites mal dormidas, muitas preocupações, problemas, discussões, mas tudo enriqueceu meu crescimento profissional e pessoal. Pesar, pois esse é o final de mais um ciclo. Todo final gera alegria, tristeza, dúvidas e incertezas. É a mudança de ambiente que nos desafia.

Trabalhar no laboratório de Fotoquímica foi experimentar sensações enriquecedoras, sem adjetivos para descrevê-las. Agradeço o suporte de minha orientadora, Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro, por me ter permitido altos voos, sem jamais cortar minhas asas.

Aos meus amigos, colegas de laboratório, Bruno, Brenda, Mari, Marco, Joyce, Henrique, Silvano, Anderson (Delícia) e Fran pelos momentos de descontração, de ajuda mútua, sem competição. Com vocês aprendi o valor do trabalho em grupo. Agradeço em especial à amiga de lab Juliana (Ju), por toda a amizade, carinho e solidariedade. Compartilhamos quatro anos de estudo. Você foi fundamental na realização deste trabalho. Agradeço à amiga Dra. Alessandra Lima Poli Leves, técnica do laboratório de Fotoquímica, pessoa verdadeira, inteligente e grande companheira, com quem tive o prazer de conviver e aprender muito. Obrigada pelas discussões, ensinamentos, paciência, conselhos e amizade.

Às amigas Dany, Joice, Livia e Neinha que tornaram minha caminhada mais leve e prazerosa, transformando meus momentos de tristeza e angústia em alegria e comemoração.

Aos queridos amigos Faby, Ricardo, Sara, Guilherme, Gênisson, Régis, Airton, Dani, Thiago, Eri, Gued, Érika, Amanda, Lilian, Lucas, William, Bianca, Leandro e Fábio pelo companheirismo e amizade, em especial a meus extraordinários amigos e consultores Danilo e Andrea. Sem vocês, a ideia deste trabalho não teria saído do papel. Muito obrigada!

Aos meus pais postíços em São Carlos, tio Ari e tia Kátia. Vocês foram fundamentais!

Agradeço ao Márcio, técnico do MEV, que se tornou grande amigo. Muito obrigada por me encaixar de última hora nessa agenda lotada de análises. Obrigada principalmente pelos momentos de descontração nas horas das análises. Era sempre angustiante e alegre a discussão dos resultados de adesão celular deste trabalho. Valeu à pena.

Ao professor Andrei e a sua aluna Dayane do IQSC, pelo apoio, comprometimento e análise dos testes de viabilidade e adesão celular. Vocês foram muito importantes.

Ao professor Marlus e a sua aluna Camila da UNESP-Araraquara pelos ensaios de bioadesão e microbiológico, e posterior discussão.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida para a execução deste projeto.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela infraestrutura oferecida e a todos os seus funcionários que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

À amiga-irmã Priscilla, pela amizade, amor, companheirismo e paciência que sempre teve comigo. Seu apoio contribuiu imensamente para a realização deste projeto.

E, por último, meu profundo agradecimento às pessoas mais importantes de minha vida: minha família. Meus pais, pela dedicação, carinho, respeito, paciência, apoio e amor. Pai, obrigada por me auxiliar. Suas correções foram valiosas. Sem elas, este texto não teria ficado tão simples e claro. À minha irmã e aos meus sobrinhos, pelos momentos de alegria e de uma boa convivência.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem alcançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm, porém se afastam.”

Descartes

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”

Charlie Chaplin

RESUMO

As lesões de pele representam um grande desafio para os profissionais da saúde, sendo que os curativos mais modernos disponíveis atualmente são, em sua maioria, importados e de alto custo. Assim, existe a necessidade de criar recursos mais acessíveis à população. Pesquisas na área de regeneração de pele possuem como principal desafio o desenvolvimento de biomateriais efetivos que apresentem atividades biológicas como fungicida e bactericida e que possam ser produzidos por meio de tecnologia simples e de baixo custo. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de membranas porosas à base de nanocompósitos quitosana (QT)/laponita (lap) com potencial para serem utilizadas na regeneração da pele lesionada. Inicialmente, a quitosana comercial foi purificada e caracterizada em relação ao grau médio de acetilação e massa molar viscosimétrica média. As membranas porosas foram produzidas por liofilização de soluções contendo diferentes conteúdos de laponita. A influência da concentração de argila sobre as propriedades das membranas também foi estudada. A técnica de Difração de Raios-X (DRX) foi utilizada para a determinação da estrutura do nanocompósito preparado. As membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), por medidas de espessura, porosidade, grau de hidratação, e por análises termogravimétricas e mecânicas. Os resultados revelaram aumento na porosidade, diminuição no grau de hidratação e aumento da estabilidade térmica das membranas com o aumento da concentração de laponita. Foram realizados também teste *in vitro* para a avaliação da biocompatibilidade dos materiais como bioadesão, atividade antibacteriana, viabilidade e adesão celular. Os resultados obtidos demonstraram que as membranas porosas são biomaterias potencialmente úteis para utilização como curativos.

Palavras-chave: membranas porosas, quitosana, laponita, nanocompósito, liofilização, biomateriais, curativos.

ABSTRACT

Skin lesions represent a great challenge for health professionals, since the most modern wound dressings available today are imported and expensive. Thus, there is a need to achieve more accessible resources for the population. The main challenge of skin regeneration research is the development of effective biomaterials that present biological activities as fungicide and bactericide, combining simple and low cost manufacturing technologies. In this context, this work presents the development of porous membrane based on chitosan/laponite nanocomposite for potential application in skin regeneration. Firstly, the commercial chitosan was purified and characterized in relation to the average degree of acetylation and the average viscosity molar mass. The freeze-drying process was used to produce porous membranes with different content of clay. The influence of laponite concentration on the membrane properties was also evaluated. X-Ray Diffraction (XRD) was used to determine the structure of the nanocomposite. Porous membranes were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), thickness measurements, swelling capacity, thermogravimetric and mechanical analyses. The results revealed the increase in the porosity and in the thermal stability in addition to the decrease of the swelling capacity with the increase of clay content. *In vitro* tests were also carried out to evaluate the biocompatibility of the materials, such as: bioadhesion, antibacterial activity, viability and cell adhesion. Thereby, the results indicated that the porous membranes are biomaterials potentially useful as wound dressings.

Keywords: porous membranes, chitosan, laponite, nanocomposite, freeze-drying process, biomaterials, wound dressings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pele e tecido subcutâneo.	17
Figura 2 – Derme e epiderme (a) fotomicrografia da derme coberta pela epiderme (b) fotomicrografia de alta resolução da epiderme repousando sobre a camada papilar da derme.	18
Figura 3 – Diferentes estágios da cicatrização.	20
Figura 4-Tipos de curativos modernos.	22
Figura 5 – Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.	23
Figura 6 –Fórmula estrutural da quitosana com suas respectivas unidades.	24
Figura 7 – Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo (a) 1:1 e (b) 2:1.	26
Figura 8 – Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila hectorita.	28
Figura 9 – Esquema ilustrativo das diferentes disposições polímero-argila (laponita) na formação de nanocompósitos.	29
Figura 10 – Método de preparação de membranas porosas pela técnica de liofilização.	31
Figura 11 – Espectro de RMN ¹ H da quitosana comercial.	42
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície das membranas com ampliações de 200 e 500 vezes.	46
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura do corte transversal das membranas com ampliação de 300 vezes.	47
Figura 14 – Porosidade das membranas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).	48
Figura 15 –Difratogramas dos componentes individuais (quitosana e laponita) e das membranas QT, QT/1%lap, QT/2,5%lap, QT/5%lap e QT/10%lap.	50
Figura 16 -Capacidade de hidratação das membranas porosas.	51
Figura 17 – Capacidade de hidratação no equilíbrio das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).	51
Figura 18 – Perfis de degradação enzimática in vitro das membranas porosas na presença (a) e ausência (b) de lisozima em solução tamponante fosfato (pH 7,4) a 37 °C.	53
Figura 19 – Curvas de TG (a) e DTG (b) das membranas porosas sob atmosfera de nitrogênio.	54
Figura 20 – Valores de módulo de tensão na ruptura (a); porcentagem de alongamento (b) e módulo de elasticidade (c) das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).	55
Figura 21 –Valores de força de bioadesão (a) e trabalho de força de bioadesão (b) das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).	57
Figura 22 – Modo de ação da quitosana contra bactérias gram + (a) e gram – (b).	59
Figura 23 – Imagem ilustrativa dos ensaios antibacterianos realizados nas membranas porosas contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	60
Figura 24 – Estudo de viabilidade celular usando Balb/C 3T3 (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).	61
Figura 25 –Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT em diferentes tempos.	62
Figura 26 – Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/1%lap em diferentes tempos.	62

Figura 27 – Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/2,5% lap em diferentes tempos.	63
Figura 28 - Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/5% lap em diferentes tempos.	63
Figura 29 - Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/10% lap em diferentes tempos.	64
Figura 30 - Imagens adicionais de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana em diferentes tempos.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de massa molar viscosimétrica média e viscosidade intrínseca para as quitosanas comercial e purificada.	43
Tabela 2 - Espessura das membranas secas.....	44
Tabela 3 – Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas porosas.	54
Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) das membranas porosas frente a <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS

QC	Quitosana comercial
QP	Quitosana purificada
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
$\overline{GA}$	Grau médio de acetilação
$\overline{GD}$	Grau médio de desacetilação
$\overline{M}_v$	Massa molar viscosimétrica média
η	Viscosidade intrínseca
lap	Laponita
QT	Membrana composta apenas de quitosana
QT/1%lap	Membrana composta por quitosana e 1% de laponita
QT/2,5%lap	Membrana composta por quitosana e 2,5% de laponita
QT/5%lap	Membrana composta por quitosana e 5% de laponita
QT/10%lap	Membrana composta por quitosana e 10% de laponita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DRX	Difração de Raios-X
GH(%)	Grau de Hidratação
P(%)	Porosidade
PM(%)	Perda de massa
TGA	Análise Termogravimétrica
DTG	Análise Térmica Diferencial
T_{máx}	Temperatura de máxima degradação
DMA	Análise Dinâmico-Mecânica
TS	Tensão na ruptura
A	Alongamento máximo
ME	Módulo de elasticidade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Balb/C 3T3	Fibroblastos de camundongo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Pele.....	17
1.1.1 Epiderme	17
1.1.2 Derme	19
1.2 Lesões de pele	19
1.2.1 Cicatrização.....	20
1.2.2 Curativos	21
1.3 Quitina e Quitosana.....	23
1.4 Argila.....	25
1.4.1 Argilomineral	26
1.4.1.2 Laponita.....	27
1.5 Nanocompósitos poliméricos	28
1.6 Membranas porosas.....	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Materiais.....	34
3.2 Purificação da quitosana comercial.....	34
3.3 Membranas porosas de nanocompósito quitosana/laponita	34
3.4 Caracterizações	35
3.4.1 Quitosana comercial e purificada	35
3.4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	35
3.4.1.2 Viscosimetria.....	35
3.4.2 Membranas porosas.....	36
3.4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
3.4.2.2 Porosidade	36
3.4.2.3 Espessura.....	37
3.4.2.4 Grau de Hidratação.....	37
3.4.2.5 Degradação enzimática.....	37
3.4.2.6 Difração de Raios-X.....	38
3.4.2.7 Análise Termogravimétrica	38

3.4.2.8 Análise Mecânica	38
3.4.2.9 Ensaios <i>in vitro</i> de bioadesão	39
3.4.2.10 Estudos microbiológicos	39
3.4.2.11 Viabilidade Celular	40
3.4.2.12 Adesão celular	41
3.5 Análise estatística	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Caracterizações estrutural e viscosimétrica das quitosanas.....	42
4.2 Membranas porosas.....	44
4.2.1 Morfologia e Porosidade das membranas	44
4.2.2 Grau de hidratação	50
4.2.3 Degradação enzimática	52
4.2.4 Análise termogravimétrica	53
4.2.5 Análises mecânicas	54
4.2.6 Ensaios <i>in vitro</i> de bioadesão	57
4.2.7 Atividade antibacteriana.....	58
4.2.8 Viabilidade e adesão celular.....	60
5 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A	76

1 INTRODUÇÃO

A pele é a cobertura mais externa e o maior órgão do corpo humano. Atua na regulação da temperatura corpórea e na detecção de estímulos. Confere proteção contra micro-organismos, agentes químicos, impactos mecânicos, efeitos nocivos do sol e perda de líquidos.¹ Embora a pele possa se regenerar em caso de ferimentos leves, lesões severas expõem o organismo a uma série de agentes agressores, devido à dificuldade do reparo tecidual e requer maiores cuidados para diminuir os riscos para o paciente. As lesões são divididas em dois grupos: agudas e crônicas. As feridas agudas ocorrem por algum dano traumático à pele: queimaduras, incisões, cirurgias e escoriações. Geralmente esse tipo de lesão tem um tempo de cura mais curto em comparação às lesões crônicas. Estas, porém, são normalmente decorrentes de algum distúrbio metabólico causado por doenças como trombozes, edemas, diabetes ou pressão local prolongada e envolvem perda progressiva de tecido.²

As queimaduras são o quarto maior tipo de lesão de pele em número de ocorrências no mundo, no entanto a compilação de dados de incidências no Brasil é limitada. Em 2009, foram registradas 80607 internações por queimaduras de acordo com o SIH (Sistema de Informações Hospitalares), representando cerca de 9% do total de atendimentos de emergência em hospitais, enquanto que no SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade) foram registrados 2175 óbitos em decorrência de queimaduras.³

Os casos de pacientes com feridas crônicas também vêm aumentando, devido ao envelhecimento da população.⁴ No Brasil, não há dados que mencionem o panorama nacional de incidência e prevalência das feridas crônicas, apenas revelam o local de ocorrência das lesões, impacto psíquico, social e econômico.⁵

Apesar da variedade de curativos já comercializados, em especial os tradicionais, como compressas, gazes e algodão, esses são utilizados apenas para cobrir as feridas. Em determinados casos, esse tipo de curativo pode dificultar o processo de recuperação pelo fato de absorver elevado volume de exsudado, secar o leito da ferida e aderir à região lesionada, favorecendo o desenvolvimento de patógenos. Muitas vezes, esses curativos necessitam da utilização de géis para reduzir o ressecamento da ferida e aliviar a dor inerente à troca.² Assim, existe uma clara demanda por curativos que possam acelerar a cicatrização e reduzir riscos aos pacientes. Os curativos modernos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de superar essas limitações e incluem membranas, filmes finos, géis, loções, cremes e pomadas. Independentemente da forma, os curativos devem ser biocompatíveis, produzir ambiente em

que ocorra troca de gases e de fluidos, absorver exsudados de modo a não desidratar a pele, apresentar atividade biológica que iniba o desenvolvimento de fungos e bactérias e favorecer o processo de cicatrização.^{6,7} Os materiais empregados nos curativos devem ser produzidos a partir de técnicas simples e, preferencialmente, a partir de matérias primas de baixo custo.⁸

Biopolímeros, como quitosana e seus derivados, têm sido utilizados no desenvolvimento desses novos curativos por possuírem alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade.^{6,7,9} Além disso, possuem a propriedade de se associar ao tecido danificado, promovendo a cicatrização.¹⁰ Alguns curativos já desenvolvidos se mostraram eficazes, contudo a busca pelo curativo ideal se faz necessária.

Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas de materiais preparados à base de quitosana, a adição de nanopartículas de argila tem sido extensivamente empregada para a obtenção de novos materiais.^{11,12,13} Com a utilização de pequena quantidade de argila é possível formar nanocompósitos com características únicas para aplicação como curativo. Dentre esses novos materiais para aplicação como curativo, destacam-se as membranas porosas.

Membrana porosa é um exemplo de curativo moderno que apresenta elevada capacidade de intumescimento, alta permeabilidade de gases e de vapor de água, contém estruturas porosas interligadas que propiciam a adesão, crescimento e proliferação celular. Essas propriedades, somadas à alta estabilidade mecânica, tornam essas membranas adequadas ao tratamento de feridas.^{14,15}

Membranas de quitosana já são comercialmente disponíveis, como os produtos HemCon (HemCon, Portland, OR), curativos dentários produzidos apenas com quitosana que aderem à ferida e proporcionam uma barreira física para a proteção de sua superfície, e Chitoskin (SanguiBioTechGmbH, Witten, Alemanha), curativo produzido pela combinação de quitosana com gelatina bovina utilizado em feridas crônicas que liberam grande quantidade de exsudado. A mistura de quitosana com outros polímeros também tem sido explorada para o desenvolvimento de membranas a serem aplicadas como curativos.^{1,4,6,7,16} Embora na última década tenham sido descritas várias metodologias para o desenvolvimento de membranas à base de quitosana para aplicação em engenharia de tecido,^{12,17,18,19} pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento das mesmas com adição de argila para aplicação como curativos.

Dentro desse contexto, este trabalho apresenta o desenvolvimento e a caracterização de um novo material, a saber, membranas porosas à base de quitosana e laponita, para aplicação na recuperação de lesões de pele.

1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 16% do peso de uma pessoa e exerce diversas funções: regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra agentes externos.²⁰ Exerce também funções sensoriais de proteção ao calor, frio, pressão, dor e tato. A pele (Figura 1) é composta principalmente por duas camadas de tecido, a epiderme e a derme. A epiderme é a camada superficial da pele, consistindo em tecido epitelial. Ela resiste à abrasão na superfície e reduz a perda de água pela pele, repousando sobre a derme. A derme é responsável pela maior parte da resistência estrutural da pele.²¹

A pele repousa sobre o tecido subcutâneo, ou a hipoderme, uma camada de tecido conjuntivo frouxo. A hipoderme não faz parte da pele, mas conecta a pele à musculatura subjacente ao osso.²¹

Figura 1 – Pele e tecido subcutâneo.

Fonte: Adaptado de VANPUTTE, C. L.²¹

1.1.1 Epiderme

A epiderme, como camada mais superficial da pele, forma a principal barreira contra agentes externos. A epiderme não contém vasos sanguíneos, suas células vivas recebem nutrientes e excretam metabólitos pela difusão das substâncias entre a epiderme e os capilares

da derme (Figura 2). Dentre suas várias funções, as principais são: prevenir a perda de calor e de água e reduzir a infiltração de patógenos.²

Figura 2 – Derme e epiderme (a) fotomicrografia da derme coberta pela epiderme (b) fotomicrografia de alta resolução da epiderme repousando sobre a camada papilar da derme.

Fonte: Adaptado de VANPUTTE, C. L.²¹

A epiderme é composta por vários tipos celulares. A maior parte das células é chamada de queratinócitos, pois produz uma mistura proteica denominada queratina que torna a célula mais durável. Os queratinócitos conferem à epiderme sua capacidade de resistência à abrasão e à perda hídrica. A epiderme possui outras células: os melanócitos contribuem para a coloração da pele; as células de Langerhans fazem parte do sistema imune; e as células de Merkel, associadas às terminações nervosas, são responsáveis pela detecção do toque e da pressão superficial.²¹

Durante o processo de renovação celular, a morte das células produz uma camada externa rígida resistente à abrasão e forma uma barreira de permeabilidade. Este processo envolve várias camadas da epiderme, divididas em cinco regiões, ou estratos: estrato basal (porção mais profunda da epiderme), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. O último é o mais superficial estrato da epiderme.^{21,22}

1.1.2 Derme

A derme é um tecido conectivo que contém fibroblastos. O colágeno é a principal fibra desse tecido e dá sustentação à epiderme. A derme apresenta terminações nervosas, folículos pilosos, musculatura lisa, glândulas, vasos linfáticos e vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes à epiderme, além de remover resíduos e auxiliar na regulação térmica do corpo.²²

As terminações nervosas na derme são variadas em estrutura e função. Elas incluem sensores para dor, coceira, cócegas e sensações térmicas; receptores sensoriais dos folículos pilosos para o toque suave; corpúsculos de Pacini para a pressão profunda; corpúsculos de Meissner para detecção de estímulos simultâneos; corpúsculos de Ruffini para a sensação contínua de tato ou pressão.²¹

1.2 Lesões de pele

A lesão de pele pode ser descrita como um defeito ou rompimento da sua estrutura em consequência de dano físico ou térmico, de uma cirurgia e/ou de condição fisiológica. A gravidade da lesão varia de acordo com as camadas afetadas. Lesões superficiais afetam apenas a epiderme. Lesões profundas parciais envolvem a epiderme e a derme, incluindo vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e folículos capilares. Lesões profundas totais atingem os músculos e suas estruturas adjacentes.²³

Ferreira e colaboradores²⁴ descreveram como lesões complexas, as lesões agudas e crônicas de difícil cicatrização por apresentarem características únicas: perda extensiva de pele e glândulas associadas, infecção que resulta em perda de tecido, morte do tecido ou sinais de comprometimento da circulação e presença de patologia. Na maioria dos casos, essas lesões são tratadas apenas com procedimentos cirúrgicos.

As lesões de pele são classificadas de acordo com o processo de cicatrização. As feridas agudas são lesões que afetam o tecido, com formação mínima de cicatrizes e tempo de cura de 8 a 12 semanas. As causas primárias destas feridas são fatores externos como abrasões, cortes, penetração de objetos, incisões cirúrgicas, queimaduras, choques e contato com substâncias corrosivas.²⁵ Dentre as feridas agudas, as queimaduras são as lesões que causam maiores danos, uma vez que são de difícil tratamento, ocasionando perda extensa de fluidos e trauma ao paciente.²⁶

A cicatrização das feridas crônicas ocorre lentamente devido aos danos constantes ao tecido ou ao mau tratamento das lesões ou às condições fisiológicas como diabetes, infecções persistentes, trombozes, edemas e pressão local prolongada. Nesse tipo de ferida, podem ocorrer níveis elevados de substâncias que perpetuam a fase inflamatória, persistindo a não cicatrização por meses ou até anos. Úlceras por pressão e úlceras venosas são exemplos de feridas crônicas.^{10,23}

1.2.1 Cicatrização

A cicatrização é um processo biológico específico relacionado ao crescimento e à regeneração tecidual, envolvendo uma sequência complexa de eventos (Figura 3) como hemostase, inflamação, granulação e remodelação tecidual. A hemostase ocorre imediatamente após a lesão. Nesse processo formam-se coágulos, devido à agregação das plaquetas, responsáveis pela formação da fibrina, minimizando assim a perda de fluido corpóreo e servindo de suporte para o crescimento celular. No processo de inflamação, granulócitos e macrófagos (células inflamatórias) penetram na ferida, protegendo o tecido de partículas estranhas e induzem a migração celular. Na fase da granulação, ocorre a proliferação de fibroblastos e queratinócitos e a formação da matriz extracelular, fazendo com que o tecido da derme se reconstitua. Durante a remodelação tecidual, todos os processos ativados após a ferida começam a diminuir até cessar, ocorrendo assim a formação de novo tecido conectivo e novo sistema vascular.^{2,10,23,27}

Figura 3 – Diferentes estágios da cicatrização.

1.2.2 Curativos

Curativo é um termo amplo e consiste no conjunto de procedimentos que envolvem limpeza, desbridamento e aplicação de cobertura à ferida. No passado, utilizavam-se curativos tradicionais como bandagens à base de algodão ou lã, cuja principal função era manter a ferida seca, permitindo a evaporação do exsudado e prevenindo a entrada de bactérias nocivas. Entretanto, para uma cicatrização rápida e efetiva, deve-se manter um ambiente quente e úmido na ferida, de modo a mimetizar as condições fisiológicas da matriz extracelular, permitir trocas gasosas e impedir a permeação de micro-organismos, para que haja a migração, proliferação e organização das células. A concepção de curativos modernos se baseia na criação desse tipo de ambiente.^{2,27}

Os curativos modernos podem ser classificados de acordo com o tipo de contato que estabelecem com a lesão: curativos primários são usados em contato direto com o tecido lesado, curativos secundários são colocados sobre o curativo primário e curativos em ilha são os que possuem uma região central absorvente cercada por uma porção adesiva. Outra classificação divide os curativos de acordo com a sua atividade: inativos (gaze e outros tecidos), interativos (hidrocolóides e hidrogéis) e ativos (contêm em sua composição fatores de crescimento e inibidores de proteases).¹⁰

Atualmente são comercializados diversos tipos de curativos modernos, mas existem alguns pré-requisitos básicos a serem considerados nesse tipo de curativo: *i*) acelerar o processo de reparo tecidual; *ii*) possuir atividade antimicrobiana; *iii*) possuir atividade hemostática; *iv*) exibir atividade de desbridamento (remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos). Os curativos modernos incluem filmes finos, géis, espumas, hidrocolóides, loções/cremes e membranas (Figura 4).^{7,16}

Figura 4-Tipos de curativos modernos.

Fonte: Adaptado de [https://cdns.webareacontrol.com](https://cdns.webareacontrol.com;);
<http://shop.puolder.com>; <https://i.ebayimg.com>;
<https://www.advancedtissue.com>; <https://i1.wp.com>;
<https://www.smartpractice.com>.
 Acesso em: 06 de fevereiro de 2018.

Os filmes finos são bastante versáteis, podendo ser utilizados tanto como coberturas primárias quanto como secundárias. São indicados para tratamento de feridas superficiais minimamente exsudativas, proteção de feridas cirúrgicas sem complicações, fixação de catéteres e prevenção de lesões de pele por umidade excessiva ou atrito, como úlcera por pressão.²³

Hidrogel é um gel, formado por redes tridimensionais poliméricas que possuem alta capacidade de reter água. É utilizado como cobertura secundária devido à sua reduzida capacidade de absorção. É contra indicado em feridas exsudativas.⁶

As espumas possuem camadas adicionais que evitam aderência a feridas secas ou ainda camadas oclusivas que previnem perda de fluidos e contaminação bacteriana. Esse tipo de curativo mantém um ambiente úmido na ferida, promove isolamento térmico e possui alta capacidade de absorção, mas não é recomendado em feridas secas e/ou infeccionadas.²³

O hidrocolóide é formado por estrutura em bicamada. A camada interna pode ser composta por gelatina, pectina, carboximetilcelulose e/ou elastômeros. Por fora, ele é composto por uma camada à prova d'água. Esse tipo de curativo é recomendado para lesões com pouca formação de exsudado, pois adere em partes tanto úmidas quanto secas da ferida. Não é recomendado em lesões infeccionadas ou tecido necrosado.²

As loções e cremes são de fácil utilização. Desinfetam a ferida e, em geral, são baratos, mas sua troca tem que ser frequente, pois não contribui no processo de regeneração tecidual.⁸

Membranas porosas possuem estrutura tridimensional, com grande área superficial, adequada à adesão, migração e crescimento celular, além de possuir propriedades mecânicas adequadas para aplicação como curativos e substitutos temporários de pele. Esse tipo de curativo é constituído por biopolímeros, derivados de fontes renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis.¹⁵ Em alguns casos, os biopolímeros podem ser misturados com componentes ativos como agentes antimicrobianos e fatores de crescimento passíveis de liberação no ferimento.²⁸

Dentre os biopolímeros, a quitosana tem sido considerada um agente promissor para potencial aplicação na área biomédica e farmacêutica, por ser um polímero biocompatível, biodegradável, exibir baixa toxicidade e capacidade de formar géis, membranas e filmes.⁴

1.3 Quitina e Quitosana

A quitina (Figura 5), biomaterial duro e de cadeia rígida, pode ser encontrada na natureza na forma de microfibrilas cristalinas ordenadas presentes na estrutura do exoesqueleto de artrópodes e nas paredes celulares de fungos e leveduras. As principais fontes comerciais da quitina são as carapaças de caranguejos e camarões, nas quais a quitina representa 70% dos compostos orgânicos totais, estando associada a proteínas, pigmentos e carbonato de cálcio. Este polissacarídeo é altamente hidrofóbico e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos.^{29,30} Considerando-se a quantidade de quitina produzida anualmente em escala global, este composto é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, ao lado do amido, lignina e celulose.³¹

Figura 5 – Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.

Fonte: Autoria própria.

A principal reação de derivatização da quitina é a desacetilação: hidrólise dos grupos acetamido das unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcNAc) para gerar grupos amino, resultando no polímero conhecido como quitosana. Essa reação pode ocorrer tanto pela *via* enzimática quanto pela *via* química (sob condições ácidas ou básicas). O produto dessa reação será denominado quitosana somente se o conteúdo médio das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcN), definido como grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), for igual ou superior a 50% e se o polímero for solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos, como ácido clorídrico ou acético. A fórmula estrutural desse polissacarídeo (Figura 6) consiste em diferentes proporções de monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcNAc) unidos por ligações O-glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4).^{32,33}

Figura 6 –Fórmula estrutural da quitosana com suas respectivas unidades.

Fonte: Autoria própria.

A propriedade principal que diferencia os polímeros quitosana e quitina é a solubilidade, relacionada diretamente à quantidade de grupos amina presentes em suas estruturas. Quando protonados, esses grupos aumentam a solubilidade do polímero em meio aquoso, devido principalmente à repulsão eletrostática e ao aumento da solvatação de suas

cadeias.³² A quitosana, solúvel em ácidos orgânicos diluídos, como ácido acético, láctico, málico, fórmico, cítrico e em ácidos inorgânicos, pode ser preparada na forma de pó, fibras, filmes, géis, nanopartículas e membranas.^{34,35} Devido sua natureza policatiônica em pH abaixo de seis, a quitosana interage com uma gama de moléculas carregadas negativamente, como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos graxos, ácidos biliares e fosfolípídeos. Esse polissacarídeo também possui capacidade de sedimentar íons metálicos para a remoção dos mesmos de águas residuais.³⁶

Nas últimas décadas, a área de materiais biomédicos tem dado bastante atenção ao uso da quitosana em suas formulações para aplicações em engenharia de tecido, liberação controlada de fármacos e curativos.^{37,38} Os produtos naturais são mais recomendáveis na área biomédica, devido sua biocompatibilidade em comparação com os materiais sintéticos.⁴ Além disso, a quitosana é degradada enzimaticamente pela lisozima, que está presente nos fluídos do corpo humano.³⁹ Diversos estudos apontam para a quitosana como excelente agente na cicatrização de lesões, pois estimula a hemostasia e acelera a regeneração do tecido lesionado.^{40,41,42,43,44} O uso desse polímero na área de terapia de lesões promove a regeneração ordenada da pele, com deposição regular de fibras de colágeno, limitando a formação de cicatrizes e a retração do tecido.^{4,44} De acordo com Muzzarelli,⁴⁵ estudos feitos em feridas tratadas com quitosana indicaram que as fibras de colágeno formadas eram mais finas e mais maduras em relação às provenientes de cicatrização normal e seu arranjo era mais próximo ao encontrado na pele não lesionada. Em sete dias, as feridas estavam completamente reepitelizadas, os tecidos de granulação haviam sido substituídos por fibroses e os folículos capilares estavam quase cicatrizados.

Entretanto, curativos à base de quitosana pura podem apresentar propriedade mecânica inadequada àquela apresentada pela pele humana e resposta biológica insuficiente. Com o objetivo de melhorar essas características, o desenvolvimento de membranas à base de nanocompósitos pela combinação de polímeros biodegradáveis e nanopartículas de argila produz materiais com propriedades físicas otimizadas que, muitas vezes, satisfazem limitações nas aplicações em que o polímero puro não seria capaz.^{12,46}

1.4 Argila

O termo argila pode ser definido de diferentes formas dependendo da área científica em que é estudado. A definição clássica descreve a argila como um material inorgânico

natural, terroso, de fina granulação que, quando umedecido em água em quantidade adequada, adquire certa plasticidade.⁴⁷

Quanto à composição química, as argilas são formadas por alumino-silicatos e podem apresentar átomos de ferro e magnésio em suas estruturas. Esses minerais apresentam estruturas cristalinas perfeitas ou quase perfeitas e suas partículas possuem tamanhos iguais ou inferiores a 2 μm , o que resulta em uma grande área superficial disponível para interações com outras moléculas.⁴⁷

As argilas são constituídas principalmente por minerais (os argilominerais), podendo conter em suas estruturas proporções variadas de outros minerais como quartzo, feldspato, mica, hematita, calcita, além de matéria orgânica.⁴⁷

1.4.1 Argilomineral

Existem diversos tipos de argilominerais (ou filossilicatos) organizados em folhas (lamelas) e camadas, constituídos por tetraedros de silício ou alumínio e oxigênio e por octaedros de alumínio ou magnésio ou ferro ou lítio, oxigênio e hidroxilas. Sua classificação é feita de acordo com a maneira em que as folhas estão ligadas: o tipo camada 1:1 é formado pela combinação de uma folha octaédrica com uma folha tetraédrica e o tipo 2:1 ocorre na combinação de uma folha octaédrica com duas folhas tetraédricas, como apresentado na Figura 7. Essas folhas combinadas de diferentes maneiras formam as camadas que compõem o argilomineral. A sobreposição das lamelas forma partículas chamadas de tactóides.^{47,48}

Figura 7 – Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo (a) 1:1 e (b) 2:1.

Fonte: Adaptado de GOMES, C. F.⁴⁷

A distância d_{001} é chamada distância interlamelar ou distância interplanar basal, também utilizada para classificar as diferentes argilas. Quando há adsorção de moléculas de

água nos espaços interlamelares, essa distância se expande além do seu limite original podendo atingir até 40 Å no caso das esmectitas.^{47,48}

Esse processo é chamado de intumescimento e ocorre devido ao equilíbrio de ionização entre os cátions adsorvidos e as superfícies das partículas quando a argila é dispersa em água. Quanto maior a ionização da argila, maior a carga negativa livre das partículas em suspensão e, conseqüentemente, maior será a repulsão entre elas. Essa repulsão evita a aproximação e a aglomeração das partículas. Entretanto, essas partículas também estão sujeitas a forças de natureza atrativa (forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas). Quanto maior a concentração da suspensão, menor será a distância entre as partículas, aumentando assim a intensidade dessas forças, o que favorece o processo de floculação.^{48,49}

A extensão do intumescimento é dependente, dentre outros fatores, da força iônica do meio, da natureza do contra-íon, das energias de hidratação envolvidas e da carga da partícula de argila.⁴⁹

1.4.1.2 Laponita

Entre 1965 e 1970, as Indústrias Laporte desenvolveram e introduziram no mercado internacional uma hectorita sintética a partir de talco, a “Laponite B”, que possui a estrutura e também as propriedades tecnológicas idênticas à hectorita-Na natural, além de ser livre de impurezas.⁵⁰

A laponita é um silicato lamelar sintético com estrutura e composição similares a uma hectorita natural do grupo das esmectitas. Sua estrutura lamelar é do tipo 2:1 (duas folhas tetraédricas e uma central octaédrica) na forma de discos com aproximadamente 25 nm de diâmetro e 1nm de espessura (Figura 8). Alguns íons de magnésio localizados na folha central (octaédrica) são substituídos por íons de lítio, resultando em uma carga líquida negativa da lamela, balanceada por íons trocáveis de sódio localizados entre as lamelas.^{51,52} Os cátions adsorvidos são chamados de cátions trocáveis de argilominerais, ou seja, podem ser substituídos por outros íons ou moléculas. A medida quantitativa de cátions adsorvidos necessários para neutralizar as cargas negativas das camadas do filossilicato é denominada capacidade de troca catiônica (CTC). A CTC da laponita é 0,55 meq/1 g de laponita e sua fórmula química é $\text{Si}_8(\text{Mg}_{5,45}\text{Li}_{0,4})\text{H}_4\text{O}_{24}\text{Na}_{0,75}$.⁵³

Figura 8 – Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila hectorita.

Fonte: Adaptação de HARAGUCHI, K.⁵⁴

Para uma argila ser utilizada em preparações biomédicas e farmacêuticas, existem alguns requisitos importantes. Em especial, destacam-se a granulometria, o grau de pureza mineral, a quantidade de água adsorvida, composição química e contaminação microbiológica. Dentre os filossilicatos, apenas a caulinita, o talco, as esmectitas hectoritas e as argilas fibrosas são utilizadas em aplicações farmacêuticas e/ou cosméticas.⁵⁵

As argilas apresentam pequeno tamanho de partícula e grande área superficial. Por isso, têm sido utilizadas, nos últimos anos, para a síntese de materiais híbridos, possibilitando a formação de nanocompósitos, pois apresentam dimensão na escala nanométrica.⁵⁶

1.5 Nanocompósitos poliméricos

Nanocompósitos poliméricos são o resultado da combinação entre uma fase contínua (polímero) e uma fase descontínua (e.g., argila, metais, nanotubos de carbono, grafeno e grafite) em escala nanométrica.⁵⁷ A interação entre as nanoestruturas e a matriz polimérica produz materiais com propriedades mecânicas e funcionais otimizadas em comparação com os nanocompósitos convencionais.⁵⁸

Os nanocompósitos de polímero/argila apresentam propriedades físicas e químicas únicas, como o aumento da estabilidade térmica, redução da permeabilidade a gases e a líquidos, melhoria nas propriedades mecânicas, aumento da resistência à abrasão, dentre outros.⁵⁹ Esse tipo de material dispensa o uso de técnicas de fabricação com custos elevados e inconvenientes, comuns aos polímeros reforçados com fibras ou minerais micrométricos.

Além disso, apenas uma pequena fração volumétrica de argila alcança essas propriedades otimizadas em relação aos compósitos poliméricos.⁶⁰ Contudo, a formação de um nanocompósito não ocorre com qualquer mistura física entre um polímero e o silicato.⁶¹

Dependendo da natureza dos componentes empregados (filossilicatos e matriz polimérica) e do método de preparação, podem ocorrer diferenças importantes nas propriedades do nanocompósito. Três diferentes disposições polímero-argila (laponita) podem ser obtidas na formação de um nanocompósito (Figura 9).⁶²

Figura 9 – Esquema ilustrativo das diferentes disposições polímero-argila (laponita) na formação de nanocompósitos.

Fonte: Adaptado de PEROTTI, G. F.⁶³

Nos compósitos convencionais (Fig. 9a), as partículas de argila estão dispersas na matriz polimérica e as camadas de silicato não se separam. Quando uma pequena quantidade do polímero é inserida entre as camadas de silicato, ocorre a formação do nanocompósito intercalado (Fig. 9b), expandindo, assim, o espaço interlamelar da argila. Nanocompósito esfoliado (Fig. 9c) ocorre quando as camadas de argila estão separadas uma das outras e uniformemente dispersas na matriz polimérica.⁶² Para a maioria das aplicações, a completa esfoliação das lamelas da argila é o objetivo desejado no processo de formação dos nanocompósitos, pois dessa forma é possível produzir nanocompósitos com o maior aperfeiçoamento das propriedades.

Na área biomédica e biotecnológica, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos sobre a formação e caracterização de nanocompósitos de quitosana/argila para aplicação em engenharia de tecidos, regeneração óssea, curativos, dentre outros. Gaharwar e colaboradores⁴⁶ prepararam e caracterizaram membranas porosas de nanocompósitos à base de quitosana/laponita/PEO para aplicação em regeneração óssea. Liu e colaboradores¹² desenvolveram membranas porosas de nanocompósitos de quitosana/haloisita para aplicação em engenharia de tecidos. Jin e colaboradores³⁹ estudaram hidrogéis de nanocompósitos à base de quitosana/laponita/PEO para aplicação como curativo. Na literatura, existem dezenas de publicações sobre o desenvolvimento de hidrogéis de nanocompósitos à base de quitosana e argila para aplicação como curativos.^{39,64,65,66,67} Entretanto, a maioria das publicações referentes às membranas porosas à base de quitosana e argila tem como objetivo a aplicação em reparos de ossos, cartilagens e nervos. Assim, pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento das mesmas para aplicação como curativos.

1.6 Membranas porosas

Membrana porosa pode ser definida como uma estrutura artificial tridimensional, com grande área superficial, adequada à adesão, migração e crescimento celular.⁵⁸ Alta porosidade (acima de 50%), tamanho de poro adequado e interconectividade dos poros são requisitos fundamentais para aumentar a área superficial específica disponível para a fixação celular e o crescimento de tecidos, facilitando a distribuição uniforme das células e o transporte adequado de nutrientes.^{23,58} As propriedades mecânicas também são uma característica importante e devem ser similares às do tecido danificado. Além disso, a membrana também deve se degradar em componentes não tóxicos, que possam ser eliminados ou reabsorvidos pelo organismo, sendo que a taxa de degradação deve ser preferencialmente próxima à taxa de formação de tecido novo.⁶⁸

Como descrito anteriormente, um curativo ideal deve ser de fácil manuseio, apresentar aplicação e remoção indolor, deve fornecer proteção no local da ferida, manter ambiente úmido adequado para as feridas, permitir trocas gasosas e acelerar o processo de cicatrização. No entanto, embora haja uma variedade de curativos disponíveis atualmente, poucos satisfazem esses múltiplos propósitos.²³

As membranas porosas têm sido amplamente estudadas para serem aplicadas como curativos dérmicos, pois esse tipo de curativo se assemelha à matriz extracelular, servindo como modelo para a proliferação de células da pele e estimulando a regeneração tecidual.⁶⁹

Membranas porosas fabricadas a partir de nanocompósitos baseados em polímeros biodegradáveis têm sido desenvolvidas utilizando diferentes nanoestruturas e métodos de processamento. As técnicas incluem formação de espumas, liofilização, evaporação do solvente e posterior lixiviação das partículas, inversão de fases, gaseificação por alta pressão, eletrofiação, separação de fase induzida termicamente, dentre outras.⁵⁸

A obtenção de membranas pelo método de liofilização produz materiais com amplo tamanho de poros (20 a 200 μm) e alto grau de porosidade. Essa técnica (Figura 10) requer a preparação de uma emulsão homogênea que será congelada rapidamente sob nitrogênio líquido, para manter a estrutura da emulsão, e depois liofilizada, para a criação de poros que apresentem tamanho e interconectividade dependentes dos parâmetros do processo.⁷⁰

Figura 10 – Método de preparação de membranas porosas pela técnica de liofilização.

Fonte: Adaptado de JANIK, H.⁷⁰

Com essa técnica, obtêm-se dois tipos de poros: micro e macro. Microporos são formados pela remoção do solvente aquoso, enquanto que os macroporos são formados pela coalescência desses microporos, durante a homogeneização.⁷¹ A porosidade e o tamanho dos poros podem ser afetados pela concentração e viscosidade da solução polimérica. Assim, para a produção de membranas mais uniformes, o controle desses dois parâmetros é a chave para a homogeneidade desse material. As vantagens dessa técnica são a redução do uso de solventes tóxicos e a eliminação de demorados processos de secagem e lixiviação de componentes porosos. Entretanto, em alguns casos, pode haver instabilidade na homogeneização da emulsão, sendo necessária a utilização de surfactantes adequados.⁷² Para solucionar esse problema, membranas porosas de nanocompósitos à base de quitosana/argila têm sido utilizadas devido suas intensas interações interfaciais, ou seja, não há instabilidade nesse tipo de emulsão com a utilização desses dois sistemas.^{12,73}

Assim, torna-se clara a necessidade do desenvolvimento de novos curativos com propriedades cicatrizantes que sejam mais acessíveis à população. A produção de membranas

porosas de nanocompósitos quitosana/laponita aparece como alternativa de produção de curativos biodegradáveis e biocompatíveis. Dentro desse contexto, este trabalho estuda as relações entre propriedade, processamento e estrutura de membranas porosas, utilizando nanocompósitos de quitosana/laponita para aplicação como curativos e também avalia a toxicidade, a adesão celular e a atividade antimicrobiana dessas membranas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de membranas à base de quitosana e laponita, especialmente em termos de propriedades físico-químicas e mecânicas, visando a potencial aplicação das membranas resultantes no tratamento de lesões de pele.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as quitosanas de partida e purificada em relação ao grau médio de desacetilação e massa molar viscosimétrica média;
- Avaliar a influência da proporção mássica quitosana/laponita nas propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e térmicas das membranas;
- Avaliar a degradação enzimática das membranas com a utilização de lisozima;
- Analisar a bioadesão *in vitro* das membranas;
- Estudar a atividade antimicrobiana das membranas contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Analisar a citotoxicidade e adesão celular *in vitro* das membranas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A quitosana de baixo peso molecular foi adquirida da SigmaAldrich. A argila utilizada (laponita) foi adquirida da Laporte Industries (U.K). Os demais reagentes empregados nesse trabalho foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

3.2 Purificação da quitosana comercial

A quitosana foi purificada de acordo com a metodologia relatada por Signini e Campana-Filho⁷⁴ pela dissolução de 10,0 g de quitosana em 3,0 L de solução de ácido acético 3% (v/v), sob agitação mecânica por 24 h. Após a completa solubilização, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada e precipitada com solução de hidróxido de sódio concentrada. O precipitado foi decantado, lavado com água destilada até pH de aproximadamente 8. Em seguida, a quitosana foi seca em estufa a 35 °C e armazenada em dessecador contendo sílica. A quitosana purificada, chamada de QT, foi triturada em moinho criogênico (moinho criogênico CryoMill, Retsch) para obtenção de pó.

3.3 Membranas porosas de nanocompósito quitosana/laponita

Membranas de quitosana pura (QT) e com adição de laponita (lap) foram preparadas empregando diferentes proporções de laponita: 1, 2,5, 5 e 10% (QT/1% lap, QT/2,5% lap QT/5% lap e QT/10% lap). Essa metodologia foi utilizada com o objetivo de estudar os efeitos das concentrações da laponita na membrana produzida. Para isso, a quitosana purificada (0,5% m/v) foi dissolvida em solução de ácido acético 0,5% (v/v) sob agitação por 24 h até a completa solubilização. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva, através de membrana com diâmetro dos poros de 0,45 µm (*Millipore – White SCWP*), para a remoção de possíveis agregados. Após a filtração, a massa de laponita correspondente à proporção desejada foi adicionada à solução de quitosana, sendo então mantida sob agitação por mais 1 hora para a completa homogeneização da solução.

As soluções foram submetidas a banho ultrassônico por 10 min para a remoção de bolhas e, em seguida, vertidas em placas de poliestireno de 8,5 cm de diâmetro, para obtenção da altura fixa de $\approx 0,5$ cm, congeladas a - 80 °C (Ultra Low Temperature Freezer, modelo

U410 premium, New Brunswick) e, em seguida, liofilizadas (Liotop L101, Liobrás). As membranas liofilizadas foram neutralizadas com solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e lavadas com água deionizada para a remoção do excesso de sais. Após a lavagem, as membranas foram novamente congeladas e liofilizadas.

3.4 Caracterizações

3.4.1 Quitosana comercial e purificada

3.4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

As amostras para as análises de RMN de ^1H foram preparadas pela solubilização de aproximadamente 10 mg de amostra em 1,0 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v), sob agitação magnética constante, durante 24 horas, a 25 °C. Após a solubilização do polímero, a solução obtida foi transferida para o tubo de ressonância magnética. O espectro de RMN de ^1H foi obtido em espectrômetro modelo 400/54 Premium Shielded (marca Agilent Technologies) à temperatura de 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm).

3.4.1.2 Viscosimetria

Para determinar a viscosidade intrínseca da quitosana comercial (QC) e da quitosana purificada (QP), utilizou-se um viscosímetro automático Anton Paar modelo Lovis 2000 MCom (capilar de vidro de 1,59 mm de diâmetro e esfera de ouro), as amostras foram solubilizadas em solução tamponante ácido acético ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)/acetato de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). As soluções resultantes foram filtradas sob pressão positiva, através de membrana com diâmetro dos poros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP). Assim, a viscosidade intrínseca (η) da QT foi determinada a partir da extrapolação da curva de viscosidade reduzida versus a concentração à diluição infinita e a massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) foi calculada de acordo com a equação de Mark-Houwink (Equação 1), utilizando os parâmetros $K = 0,074 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,76$ para amostras com grau médio de desacetilação de 85%.⁷⁵

$$[\eta] = K. (\overline{M}_v)^\alpha \quad (1)$$

3.4.2 Membranas porosas

3.4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As morfologias das superfícies e das seções transversais das membranas foram analisadas empregando microscópio eletrônico de varredura digital, modelo ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (model 7060), utilizando corrente de feixe de 2,82 A e potência de 20 kV. Para a análise da superfície, as membranas foram cortadas na dimensão de 5 x 5 mm² e, para análise de fratura, as membranas foram intumescidas em água, congeladas em nitrogênio líquido, fraturadas com auxílio de um bisturi e liofilizadas novamente.

As amostras foram colocadas sobre fita adesiva de carbono em porta amostra de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro empregando metalizadora CoatingSystem BAL-TEC MED 020 (BALTEC, Liechtenstein).

3.4.2.2 Porosidade

A porosidade das membranas foi determinada pelo método de deslocamento de líquidos,^{76,77} em que o etanol foi escolhido por penetrar facilmente nos poros, porém sem afetar a estrutura das membranas. As membranas foram cortadas em quadrados de dimensões de 1 x 1 cm, secas, pesadas e imersas em 10,0 mL de etanol, sendo então submetidas a vácuo para forçar a entrada do etanol nos poros das membranas, até não haver mais liberação de bolhas de ar. As membranas foram então retiradas do etanol, sendo removido o excesso de líquido com auxílio de papel toalha e pesadas novamente. Esse processo foi realizado em triplicata. A porosidade das membranas foi então estimada empregando a Equação 2.

$$P(\%) = \frac{m_f - m_0}{\rho * v} * 100 \quad (2)$$

Sendo $P(\%)$ a porosidade das membranas em porcentagem, m_f a massa final (mg), m_0 a massa inicial (mg), ρ a densidade aparente do etanol e v o volume da amostra (mL), calculado através das medidas de espessura, comprimento e largura de cada membrana.

3.4.2.3 Espessura

A espessura das membranas foi determinada utilizando paquímetro digital (Digimess, modelo 110200 com precisão de 0,01 mm), sendo realizadas dez medições ao longo da extensão da membrana e o valor foi expresso por meio da média $\pm$ desvio padrão.

3.4.2.4 Grau de Hidratação

Visando a determinação da capacidade de hidratação das membranas, as mesmas foram cortadas em quadrados de dimensões de 1 x 1 cm, secas, pesadas e imersas em solução tamponante fosfato salino (PBS) (pH = 7,4) a 37 °C por diferentes períodos, no intervalo 1 – 1200 s. No tempo desejado, as membranas foram retiradas da solução tamponante, levemente comprimidas entre duas folhas de papel toalha para retirada do excesso de solução e pesadas imediatamente. As diferenças das massas das amostras antes e após o ensaio de hidratação forneceram os resultados referentes aos graus de hidratação dos materiais, conforme Equação 3.

$$GH(\%) = \frac{m_h - m_0}{m_0} * 100 \quad (3)$$

Sendo $GH(\%)$ o grau de hidratação em porcentagem, m_h a massa da membrana hidratada (mg) e m_0 a massa inicial da membrana (mg).

3.4.2.5 Degradação enzimática

As membranas foram cortadas em quadrados de dimensões de 1 x 1 cm, secas, pesadas (m_0) e imersas em solução tamponante fosfato salino (PBS) (pH = 7,4) contendo lisozima (10000 U mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por diferentes períodos (6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas). No tempo determinado, as membranas foram retiradas da solução, lavadas em água deionizada e liofilizadas. Após esse processo, as membranas foram pesadas novamente (m). Assim, a porcentagem de massa restante foi calculada utilizando a Equação 4.⁶

A degradação enzimática *in vitro* das membranas foi realizada em triplicata e para cada período avaliado foi realizado um ensaio do controle que correspondeu à exposição das membranas somente em tampão fosfato.

$$Massa\ Restante\ (\%) = \frac{m}{m_0} * 100 \quad (4)$$

3.4.2.6 Difração de Raios-X

Essa análise teve como objetivo avaliar a estrutura (intercalada ou esfoliada) da membrana de nanocompósito produzida, mediante o emprego de Difratorômetro de Raios-X para materiais em pó ou filmes, equipado com uma fonte de raios-X de cobre ($k\alpha = 1,5406\text{ \AA}$), operando a 40 kV e 40 mA. As medidas foram efetuadas utilizando-se um incremento de 0,02 graus e tempo de acumulação de 0,5 s por passo. A técnica de difração foi utilizada para a determinação do espaçamento interlamelar da argila laponita pura e das membranas de nanocompósitos quitosana/argila por meio da equação de Bragg (Equação 5).

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (5)$$

Em que, n é a ordem de difração, λ é o comprimento de onda da radiação incidente ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$), θ é o ângulo de difração e d corresponde ao espaço interlamelar.

3.4.2.7 Análise Termogravimétrica

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada empregando equipamento TGA-50 (Shimadzu). Aproximadamente 5 mg de amostra previamente seca a 30 °C, por 24 horas, foi colocada em porta-amostra de alumina e aquecida de 20 a 1000 °C, à razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹.

3.4.2.8 Análise Dinâmico-Mecânica

As propriedades mecânicas das membranas secas foram avaliadas utilizando análise dinâmico-mecânica no modo de tração, empregando equipamento TA instruments DMA Q800 e utilizando uma garra do tipo Tensionfilm. As amostras foram cortadas em formato

retangular, com dimensões 20 x 6,4 mm. O teste foi realizado com espaço entre garras de 5 mm, com rampa de força de 1 N min⁻¹ até 18 N e força de pré-carga de 0,01 N a 25 °C. As propriedades determinadas a partir das análises dinâmico-mecânicas no modo de tração foram: resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e alongamento máximo na ruptura (%).

3.4.2.9 Ensaios *in vitro* de bioadesão

A força bioadesiva, ou seja, a força necessária para destacar as membranas porosas da superfície da orelha do suíno foi avaliada *in vitro*, utilizando analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), no modo Adhesion Test.

Secções da orelha do suíno foram fixadas no suporte de acrílico, acessório do equipamento, e fixadas à mesa do analisador. As membranas foram fixadas, com o auxílio de fita dupla face Scotch® (3M™), na sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro. Antes do ensaio, a orelha foi previamente hidratada em solução tamponante fosfato (pH 6,8), à temperatura ambiente.

O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mms⁻¹) até que a superfície da orelha do suíno entrasse em contato com a amostra. Elas foram mantidas em contato durante 120 segundos e nenhuma força foi aplicada durante esse tempo. Em seguida, a sonda subiu à velocidade constante (0,5 mm s⁻¹) até ocorrer o destacamento da membrana da pele. A partir do gráfico de força *versus* tempo, gerado pelo software *Texture Exponent Lite*, determinou-se a força máxima de bioadesão, ou seja, a força necessária para separar a sonda da amostra. Assim, o trabalho de bioadesão foi calculado a partir da área sob a curva do gráfico gerado.⁷⁸

3.4.2.10 Estudos microbiológicos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada seguindo as recomendações do Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório (CLSI). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada empregando a técnica de microdiluição, seguindo o protocolo M7-A10 da CLSI (2015),⁷⁹ com modificações. Nos ensaios microbiológicos, foram utilizadas cepas de bactérias como *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Escherichia coli* (ATCC25922).

As bactérias foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland (10^8 cels mL^{-1}) em caldo MüellerHinton. As membranas porosas foram solubilizadas em solução tamponante ácido acético ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$)/acetato de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), a uma concentração de $2000 \mu\text{L mL}^{-1}$. Em uma placa de 96 poços, foram acrescidos $80 \mu\text{L}$ do meio MüellerHinton e $100 \mu\text{L}$ de cada amostra, seguidos de diluições seriadas (1000 a $7,81 \mu\text{L mL}^{-1}$). Essas placas foram incubadas em estufa microbiológica, a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, as placas foram analisadas visualmente pela adição do revelador resazurina. Assim, a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata e como controles positivos, foram utilizados a ampicilina, o caldo estéril (caldo MüellerHinton) e a solução tamponante.

3.4.2.11 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico, utilizando um sal de tetrazol e MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A linhagem utilizada foi Balb/C 3T3 clone A 31 (células de fibroblastos de camundongo), cultivada em meio DMEM (meio Dulbecco MEM), suplementado com 10% FBS (soro fetal bovino) e 1% de solução penicilina/estreptomicina, mantida em uma estufa a 37°C , 90% de umidade e atmosfera a 5% CO_2 .

As células foram transferidas para placas de 24 poços, na concentração de 3×10^5 células mL^{-1} , incubadas por 24 horas. Após esse período, foram adicionadas as diferentes membranas e o sistema foi incubado por mais 72 horas, para verificar a citotoxicidade dessas amostras. Após o tempo de incubação, foi adicionado o corante MTT ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), seguido da incubação por 3 horas.⁸⁰

Para solubilizar os cristais de formazan, foram adicionados o agente solubilizante SDS 10% (m/v) e o ácido acético glacial 0,6% (v/v) em DMSO, com incubação por 1 hora e posterior leitura no espectrofotômetro BiotekSynergy HT em 570 nm.

A esterilização das membranas foi realizada antes dos ensaios, em que as mesmas foram expostas por 2 horas à luz ultravioleta e incubadas por 24 horas em álcool 70%. As células de mamíferos utilizadas nos ensaios foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

3.4.2.12 Adesão celular

A adesão das células de fibroblastos de camundongo Balb/C 3T3 na membrana foi avaliada pelas imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura. As células foram inoculadas na concentração de 3×10^5 células mL^{-1} sobre o material e a morfologia celular foi observada nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas. Após o período de incubação, foi realizado o preparo da membrana para ser analisada *via* MEV (ZEISS LEO 440 - Cambridge/Inglaterra). As amostras foram lavadas duas vezes com PBS (solução tamponante fosfato salino) e fixadas com glutaraldeído (2,5%) por 1 hora.⁶ As amostras foram novamente lavadas com PBS e desidratadas usando uma série crescente de graduação de etanol de 30% a 80% por 10 min, 90% por 30 min e 100% por 90 min, e finalmente a adição e incubação do reagente HMDS (hexametildisilazano) por 15 min.

3.5 Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos através da média $\pm$ desvio padrão. A avaliação estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de múltiplos testes de comparação por meio do teste de *Tukey*, ao nível de 5% de confiança.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações estrutural e viscosimétrica das quitosanas

A análise do espectro de RMN de ^1H da quitosana foi realizada a fim de identificar as características estruturais da amostra, além de permitir a determinação do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$). As amostras de quitosana, a saber, quitosana comercial e quitosana purificada, apresentaram espectros de RMN ^1H muito semelhantes. Sendo assim, o espectro da Figura 11 é representativo para ambas as amostras de quitosana.

O espectro da quitosana (Figura 11) exibe um singlete centrado em 2,0 ppm característico dos hidrogênios metílicos de unidades GlcNAc; sinal em 3,2 ppm relacionado ao hidrogênio ligado ao carbono 2 da unidade GlcN; sinais sobrepostos entre 3,5 – 4,0 ppm, correspondendo aos hidrogênios H3 – H6 das unidades GlcN e o hidrogênio ligado ao C2 da unidade GlcNAc. Os sinais em 4,9 e 4,6 ppm são atribuídos aos hidrogênios H1 e H1', ligados ao carbono anomérico C1, referentes às unidades GlcN e GlcNAc, respectivamente.

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H da quitosana comercial.

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) calculado a partir da Equação 6⁸¹ para as quitosanas comercial e purificada foi de 85%.

$$\overline{GD} = \left(1 - \frac{A_{\text{CH}_3}/3}{A_{\text{H}_2-\text{H}_6}/6} \right) \times 100 \quad (6)$$

Sendo A_{CH_3} a área dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido das unidades GlcNAc e $A_{\text{H}_2-\text{H}_6}$ a área dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C(2) a C(6) do anel glicopiranosídico.

A massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) das quitosanas comercial (QC) e purificada (QP) foi determinada por viscosimetria. Os valores foram obtidos pela equação de Mark-Houwink (Eq. 2).

Com a determinação automática do tempo médio de deslocamento de uma esfera de ouro dentro do capilar de vidro em solvente puro (solução tamponante) e em soluções de quitosana de diferentes concentrações ($3,0 - 7,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) e da viscosidade intrínseca, a massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) pôde ser calculada. A Tabela 1 apresenta a viscosidade intrínseca (η) e a massa molar viscosimétrica média das quitosanas estudadas.

Tabela 1 – Valores de massa molar viscosimétrica média e viscosidade intrínseca para as quitosanas comercial e purificada.

Amostra	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	$\overline{M}_v$ (g mol ⁻¹) (x10 ³)
Quitosana comercial (QC)	404	82
Quitosana purificada (QP)	342	66

Conforme os dados da Tabela 1, os valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média da amostra QP são menores em comparação à quitosana comercial. A partir desses resultados, é possível afirmar que o processo de purificação resulta na diminuição da massa molar viscosimétrica média do polímero. De acordo com Signini e Campana-Filho,⁷⁴ no procedimento de purificação as frações excluídas podem corresponder a cadeias com graus de acetilação superior a 60% e de massas molares elevadas. A presença de materiais insolúveis nos produtos comerciais já foi relatada,⁸² exigindo, assim, a purificação para seu posterior uso.

4.2 Membranas porosas

4.2.1 Morfologia e Porosidade das membranas

Os dados relativos à espessura das membranas são apresentados na Tabela 2. De acordo com os dados, a espessura das membranas não apresentou diferença significativa ao nível de 5%. As membranas apresentaram espessura média de 1,13 a 1,41 mm.

Tabela 2 - Espessura das membranas secas.

Membrana	Espessura (mm)
QT	1,13 ± 0,11
QT/1% lap	1,13 ± 0,22
QT/2,5% lap	1,16 ± 0,35
QT/5% lap	1,41 ± 0,21
QT/10% lap	1,20 ± 0,30

Teste *Tukey* ao nível de 5% de confiança.

A literatura não aponta uma espessura ideal para membranas porosas, uma vez que essa propriedade depende da região do corpo a ser tratada. Mas, para um material ser aplicado como curativo, ele deve apresentar propriedades de fixação e crescimento de fibroblastos e que não seja um “implante permanente”. Portanto, os biomateriais para a fabricação de curativos devem ser biodegradados naturalmente *in vivos*. Assim, a espessura desses materiais deve apresentar estrutura mais fina que a da derme humana, cujo valor varia de 0,5 a 2,0 mm em função da idade, sexo do indivíduo e da área do corpo. Considerando essas informações, pode-se concluir que as membranas produzidas têm potencial para aplicação como curativos, visando à regeneração da pele lesionada.⁸³

A morfologia das superfícies e a das seções transversais foram analisadas por MEV e são apresentadas nas Figuras 12 e 13, respectivamente. As membranas exibem superfícies heterogêneas com aparentes variações de densidade, nas quais são observados poros aparentes com ampla distribuição de tamanho (Fig. 12). Apresentam também interconectividade dos poros (Fig. 13), propriedade importante para o transporte de nutrientes e de oxigênio para as células. Pelas micrografias (Fig. 12), é possível observar que as partículas de laponita estão uniformemente dispersas na membrana, ou seja, não há formação de partículas aglomeradas.

Essa distribuição uniforme da laponita na matriz polimérica é atribuída às suas interações interfaciais.⁸⁴

A adição de 1% de laponita na matriz polimérica não teve influência significativa na morfologia dessa membrana, entretanto, a amostra com conteúdo de laponita igual a 2,5% (QT/2,5%lap) é possível observar expressivo aumento do diâmetro médio dos poros e diminuição da interconectividade entre eles (Fig 13). Na amostra QT/5%lap (Fig. 12d), o aumento da quantidade de argila provocou aparente aumento do diâmetro médio dos poros e aumento na porosidade, quando comparada às outras amostras. Além disso, a membrana com maior concentração de laponita (QT/10%lap) resultou em uma matriz mais densa, com poros aparentes de menor tamanho. Porém, todos os tamanhos de poros, nas diferentes membranas apresentadas, são suficientemente grandes para possibilitar a proliferação celular, uma vez que o fibroblasto apresenta tamanho médio de 10 a 30 μm .¹²

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície das membranas com ampliações de 200 e 500 vezes.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura do corte transversal das membranas com ampliação de 300 vezes.

A microestrutura apropriada dos poros é o fator principal para a eficácia da membrana porosa, incluindo, assim, tamanho dos poros, porosidade, interconexão entre os poros e razão superfície/volume. A membrana deve ter acima de 50% de porosidade, possuir tamanho adequado de poros para facilitar a vascularização, migração e proliferação celular dentro dos poros e ser permeável para realizar as funções de transporte de nutrientes e remoção de resíduos.^{84,85,86} Além disso, a porosidade regula processos importantes para a regeneração tecidual, como a angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos), e permite o

crescimento de tecido novo e sua integração ao tecido saudável em torno da lesão, prevenindo a ocorrência de infecções.⁸⁷

Para estimar o grau de porosidade das membranas, foi utilizado o método de deslocamento de líquido e os valores obtidos estão apresentados na Figura 14. A membrana composta apenas por quitosana apresentou porosidade igual a $40,2 \pm 2,3\%$. As membranas com os menores conteúdos de laponita (1 e 2,5%) apresentaram valor similar de porosidade ($55,4 \pm 1,5\%$ e $55,5 \pm 2,8\%$). Observou-se que o maior valor de porosidade foi obtido pela amostra QT/5%lap ($61,5 \pm 3,7\%$). Entretanto, o maior conteúdo de argila ocasionou a diminuição da porosidade da amostra QT/10%lap ($47,5 \pm 0,33\%$) que pode ter ocorrido devido à alta concentração da argila, formando, assim, uma matriz mais densa. De maneira geral, esses resultados corroboram as análises de morfologia das membranas discutidas no item anterior.

A partir desses resultados, as membranas de nanocompósitos quitosana/argila produzidas exibiram porosidade acima de 50%, satisfazendo o requisito mínimo para aplicação em regeneração de tecido.⁸⁶

Figura 14 – Porosidade das membranas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste *Tukey* ao nível de 5% de confiança).

Valores de porosidade aparente similares foram relatados por Chen e colaboradores,⁸⁸ em cujo trabalho foram obtidas membranas de quitosana com PVA apresentando porosidade em aproximadamente 50% e essas amostras revelaram possuir grande potencial para aplicação como curativos.

As microestruturas das membranas foram investigadas por Difração de Raios-X (DRX). A Figura 15 apresenta os difratogramas dos componentes individuais (quitosana e laponita) e das membranas porosas. Nos difratogramas da quitosana pura e da membrana de quitosana, é possível observar dois picos alargados na região de $2\theta = 10,1^\circ$ e 20° . O primeiro pico corresponde a estrutura cristalina hidratada e o outro a estrutura amorfa da quitosana. Comportamento semelhante foi observado por Olad e Azhar,⁸⁴ em seus estudos sobre preparação e caracterização de membranas porosas à base de quitosana-gelatina com argila.

O pico em $2\theta = 5,4^\circ$, no difratograma da laponita pura, corresponde a um espaçamento interlamelar de $16,2 \text{ \AA}$ (valor calculado pela equação 5). Esse pico alargado apresentado no difratograma se deve ao pequeno tamanho das partículas da laponita, resultando em uma estrutura com baixa organização de empilhamento.

Para as membranas preparadas com 5 e 10% de argila, o pico de difração (001) foi deslocado de $5,4^\circ$ para $4,7^\circ$ e $4,3^\circ$, respectivamente, sugerindo a formação de estruturas intercaladas para essas amostras. Em meio ácido, o grupo NH_2 da quitosana é convertido em NH_3^+ , exibindo maior miscibilidade com a laponita. Portanto, tanto a hidrofiliabilidade como a natureza policatiónica da quitosana forçam o polímero a entrar nas camadas da argila por meio do processo de troca de cátions.⁸⁹

Em contrapartida, o desaparecimento do pico (001), para as membranas preparadas com 1 e 2,5% de argila, indica a formação de estrutura esfoliada, com a completa expansão do espaço interlamelar da laponita. Esses resultados indicam que a concentração do silicato influencia no nível de intercalação da argila.

Figura 15 –Difratogramas dos componentes individuais (quitosana e laponita) e das membranas QT, QT/1%lap, QT/2,5%lap, QT/5%lap e QT/10%lap.

4.2.2 Grau de hidratação

A capacidade de hidratação das membranas é fortemente dependente do tamanho e das condições de interconexão dos poros. Essa propriedade é muito importante para a absorção de líquido corporal e para a transferência de nutrientes e de metabólitos celulares. A hidratação facilita a infiltração das células nas membranas e o aumento do tamanho dos poros e da porosidade total.⁹⁰

Os curativos devem proporcionar equilíbrio e umidade na região da ferida, pois o ambiente com umidade controlada favorece a cicatrização, uma vez que evita a desidratação do tecido e subsequente morte celular, além de promover a angiogênese e auxiliar na remoção de tecido morto. Ademais, o curativo deve ser capaz de absorver exsudados e substâncias citotóxicas.⁹¹

Diante do exposto, as membranas porosas foram avaliadas quanto à capacidade de hidratação em PBS a 37 °C (Figuras 16 e 17). Na Figura 16, é possível observar que todas as membranas foram estáveis em tampão e atingiram rapidamente a máxima capacidade de hidratação. De acordo com os resultados, a adição de laponita afeta o grau de hidratação das membranas. A presença de argila reduziu o grau de hidratação das membranas devido à inibição da interação entre as macromoléculas do polímero com as moléculas de água, resultando na redução do grau de hidratação das membranas.^{46,84}

Resultados semelhantes foram obtidos por Zheng e colaboradores,¹⁸ nanocompósitos de quitosana-gelatina com argila produzidos neste trabalho apresentaram redução no grau de hidratação. Kabiri e colaboradores⁹² observaram que a formação de complexos quitosana-argila no interior de hidrogéis resultaram na diminuição do grau de hidratação.

No geral, os resultados mostraram que a capacidade de hidratação das membranas pode ser controlada pelo conteúdo de argila. Assim, é possível o desenvolvimento de curativos adequados para aplicação em feridas secas ou úmidas, de acordo com a capacidade de hidratação. De fato, devido à alta capacidade de absorção de água nas membranas produzidas, essas seriam indicadas para proteção de feridas altamente exsudativas.

Figura 16 -Capacidade de hidratação das membranas porosas.

Figura 17 – Capacidade de hidratação no equilíbrio das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).

4.2.3 Degradação enzimática

O estudo da degradação enzimática *in vitro* foi realizado para avaliar a estabilidade das membranas porosas no local da ferida quanto à possível ação da lisozima. A lisozima é um tipo de enzima de defesa que hidrolisa a ligação glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) entre as unidades N-acetilglucosamina e N-acetilmurâmico, atuando na quebra da parede celular de bactérias Gram-positivas.⁹³ Essa enzima está comumente presente em fluidos corpóreos como a saliva e a lágrima, além de ser encontrada livremente dissolvida em grande parte dos tecidos. Ela também está presente no exsudado da ferida em concentrações que variam entre 1000 e 5500 unidades mL⁻¹ e associada à resposta inflamatória no processo de cicatrização.^{93,94}

As curvas que correspondem aos perfis de degradação *in vitro* das membranas, na presença e ausência de lisozima, são apresentadas na Figura 18. Comparando essas curvas, é possível notar que não ocorreu degradação significativa nas membranas na presença ou ausência da enzima e nem dissolução das membranas em tampão fosfato. O ensaio de degradação revelou estabilidade física dos materiais quando em contato com a lisozima. Esse resultado pôde ser confirmado não apenas pelas curvas apresentadas na Figura 18, mas também em termos morfológicos, pois não foram observadas diferenças entre as superfícies das membranas antes e após a exposição à enzima.

Essa inatividade da lisozima pode ser atribuída ao baixo grau médio de acetilação ($\overline{GA} = 15\%$) da quitosana, pois sua atividade em substratos semelhantes à quitosana depende da ocorrência de sequência das unidades N-acetilglucosamina/N-acetilglucosamina.⁹⁵ Além disso, a presença de numerosos sítios carregados positivamente na cadeia desse polímero impede o reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima.⁹⁶

De acordo com os resultados obtidos por Tomihata e Ikada,⁹⁷ quitosanas com grau médio de acetilação de até 31% apresentaram significativa degradação enzimática mesmo em períodos curtos de exposição à lisozima, mas as quitosanas com grau médio de acetilação abaixo de 31% não sofreram degradação enzimática.

Figura 18 – Perfis de degradação enzimática in vitro das membranas porosas na presença (a) e ausência (b) de lisozima em solução tamponante fosfato (pH 7,4) a 37 °C.

4.2.4 Análise termogravimétrica

O principal uso da análise termogravimétrica (TGA) é estudar a estabilidade e a decomposição térmica dos materiais. As interações entre a quitosana e as partículas de laponita podem afetar o comportamento térmico das membranas. Assim, a estabilidade térmica das membranas foi investigada pelo perfil das curvas obtidas da TGA. Nas curvas de termogravimetria das membranas (Figura 19), pode ser observada a ocorrência de dois eventos térmicos importantes no intervalo de 25 a 400 °C.

O primeiro evento ocorre no intervalo de 25 a 112 °C e está relacionado à eliminação de água adsorvida nas membranas,¹² seguido da subsequente liberação das moléculas de água das esferas de hidratação dos cátions trocáveis de sódio da laponita.⁹⁸

O segundo evento ocorre no intervalo de 196 a 400 °C e registra maiores perdas de massa quando comparado ao primeiro estágio (Tabela 3), pois corresponde à eliminação de compostos voláteis de maior massa molar que a água, que são originados da degradação dos polímeros presentes nas membranas.¹² Os dados experimentais (Fig. 19 e Tab. 3) também mostram que as temperaturas de degradação térmica das membranas no segundo evento foram maiores, revelando que a presença de argila desloca o processo de degradação para temperaturas mais altas, indicando maior estabilidade térmica para as membranas que contém laponita.

Figura 19 – Curvas de TG (a) e DTG (b) das membranas porosas sob atmosfera de nitrogênio.

As curvas TG/DTG mostram também que o aumento do conteúdo de laponita nas membranas fez com que a oxidação e decomposição dos resíduos gerados no segundo evento ocorressem em temperaturas mais elevadas ($> 400^{\circ}\text{C}$), gerando maiores teores de resíduos na medida em que o conteúdo de laponita for maior. De acordo com os resultados, é possível concluir que a amostra QT/5%lap apresentou os melhores resultados, ou seja, esse conteúdo de laponita conferiu maior estabilidade térmica à membrana.

Tabela 3 – Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas porosas.

Amostra	Estágio 1			Estágio 2				Resíduo (%)
	Intervalo (°C)	T _{onset} (°C)	Perda de massa (%)	Intervalo (°C)	T _{onset} (°C)	Perda de massa (%)	T _{máx} (°C)	
Quitosana	25 - 107	74	9	199 - 398	254	50	283	14
Ch/1%Lap	25 - 100	72	8	205 - 398	259	43	288	28
Ch/2,5%Lap	25 - 107	75	8	201 - 401	263	45	289	31
Ch/5%Lap	25 - 116	77	9	202 - 416	267	45	292	31
Ch/10%Lap	25 - 112	76	9	196 - 400	264	42	291	33

4.2.5 Análises dinâmico-mecânicas

Membranas empregadas como curativos, além de fornecer suporte físico para a regeneração do tecido, devem apresentar desempenho mecânico adequado para resistir às tensões decorrentes de sua manipulação e dos movimentos do paciente.^{76,99} Diversos fatores podem contribuir para a resposta mecânica das membranas compostas por polímero e argila: o

tamanho de partícula dos componentes inorgânicos, as propriedades mecânicas inerentes ao polímero (conteúdo orgânico), as interações interfaciais entre os componentes da membrana, a proporção do conteúdo inorgânico/orgânico, tamanho de poros e porosidade.⁸⁴ Assim, as propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas por meio de testes de tração no estado seco, com o intuito de avaliar a influência do acréscimo de laponita na tensão (TS), alongamento máximo (A) e módulo de elasticidade (ME), sendo os seus valores médios apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Valores de módulo de tensão na ruptura (a); porcentagem de alongamento (b) e módulo de elasticidade (c) das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).

Em relação à tensão na ruptura, é possível observar que a presença de laponita resultou em um aumento de TS (Figura 20a), exceto para a amostra QT/2,5%lap. Esse aumento ocorreu devido à interação em nanoescala entre ambos os componentes (polímero e argila), aumentando a força necessária para promover o deslizamento das cadeias do polímero.⁶³ Esses resultados mostram que as interações entre a laponita e as cadeias de quitosana são favorecidas e resultam em membranas mais resistentes do que aquela contendo apenas

quitosana, exceto no que se refere à amostra contendo 2,5% de laponita. Essa redução de TS, da amostra QT/2,5% lap, pode ter sido ocasionada pelo tamanho e interconectividade dos poros, como apresentado nos resultados de MEV (Figuras 12 e 13). Essa membrana apresentou maior tamanho aparente dos poros e menor interconectividade entre eles. Com base nesses dados, pode-se inferir que as interações entre os componentes não foram tão favorecidas quando comparadas às outras membranas que contém laponita.

A Figura 20b apresenta os valores de alongamento das membranas. A partir desses valores, foi observado que, dentre todas as composições estudadas, a membrana contendo 2,5% de laponita apresentou maior alongamento ($7,28 \pm 0,92\%$). A adição de maior quantidade de argila (5 e 10%) resultou no decréscimo do alongamento das membranas e não foram observadas diferenças significativas entre as membranas de quitosana pura ($2,34 \pm 0,22\%$) e a que contém 1% de laponita ($2,83 \pm 0,64\%$). De maneira geral, esses resultados corroboram as análises de tensão na ruptura das membranas discutidas no parágrafo anterior.

O módulo de elasticidade, ou módulo de Young, está relacionado com a rigidez das membranas. Assim, valores maiores correspondem a materiais mais rígidos. As membranas contendo laponita apresentaram maiores valores de módulo de elasticidade quando comparadas à membrana QT, com exceção da membrana QT/2,5%lap. Em concordância com os resultados discutidos anteriormente, a inserção de laponita afetou mais fortemente o módulo de elasticidade das membranas.

As propriedades mecânicas da pele humana dependem da idade, sexo e região do corpo. O módulo de elasticidade varia entre 0,4 e 20 MPa, o alongamento entre 10 e 115% e a tração na ruptura entre 2,5 e 30MPa. Na literatura, não há consenso sobre valores ideais dessas propriedades para curativos de pele. Deve ser levada em conta a hidratação da membrana antes da aplicação na região do ferimento. Nesse sentido, apesar dos valores apresentados serem inferiores aos da pele humana, valores similares foram relatados por Liang *et al.*¹⁰⁰ e Kumar *et al.*⁶, em cujo trabalho a obtenção de membranas porosas à base de quitosana preparadas *via* liofilização apresentaram valores de propriedades mecânicas inferiores aos da pele humana. Mesmo assim, revelaram ser viáveis para aplicação como curativos *in vivo*. De acordo com os resultados e os dados expostos, é possível concluir que a amostra QT/5%lap apresentou melhores resultados, ou seja, esse conteúdo de laponita conferiu maior estabilidade mecânica à membrana.

4.2.6 Ensaios *in vitro* de bioadesão

Bioadesão se refere à capacidade de adesão de algumas macromoléculas sintéticas, biológicas ou hidrocoloidais a tecidos biológicos. Portanto, os sistemas poliméricos bioadesivos, utilizados como curativos, representam ferramenta promissora para o fornecimento de fármacos específicos para lesão, pois a bioadesão permite a imobilização de um fármaco no local de ação e o prolongamento do tempo de residência do fármaco, estabelecendo contato próximo com o epitélio. Dessa forma, se houver necessidade de utilização de fármacos na lesão, a utilização de curativo bioadesivo pode favorecer a absorção e a biodisponibilidade desses medicamentos.¹⁰¹ A bioadesão das membranas foi investigada com o intuito de avaliar a influência do acréscimo de laponita na força bioadesiva e no trabalho de força de bioadesão. Seus valores médios são apresentados na Figura 21.

Figura 21 –Valores de força de bioadesão (a) e trabalho de força de bioadesão (b) das membranas porosas (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).

Como pode ser observado na Fig. 21, as membranas contendo quitosana pura e baixo conteúdo de laponita (QT/1%lap) não apresentaram eficiência em relação ao trabalho e à força bioadesiva, quando comparadas às outras membranas. A partir da amostra QT/2,5%lap, observa-se o aumento progressivo do trabalho e da força de bioadesão de acordo com o aumento do conteúdo de laponita. Entretanto, os valores de trabalho de força de bioadesão para as amostras QT/2,5%lap e QT/5%lap não tiveram aumento expressivo como ocorreu na amostra QT/10% lap. Houve maior interação das proteínas presentes na membrana biológica (orelha do suíno) com a membrana porosa QT/10% lap.¹⁰¹

A literatura não aponta valores ideais de trabalho e força bioadesiva, uma vez que essas propriedades dependem da região do corpo a ser tratada. Durante os estudos de

bioadesão, as amostras QT/2,5%lap, QT/5%lap e QT/10%lap se mostraram firmemente fixadas à orelha do suíno, resultado confirmado também pelos valores apresentados na Fig. 21a, o que sugere que a adição de laponita reforçou a matriz polimérica, ou seja, tornando-a mais bioadesiva quando comparada à quitosana pura.

Valores similares foram relatados por Khan e colaboradores,¹⁰² filmes de quitosana produzidos nesse trabalho revelaram possuir grande potencial para aplicação como curativos.

4.2.7 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das membranas porosas foi avaliada contra as bactérias gram (+) *Staphylococcus aureus* e gram (-) *Escherichia coli*. Os testes foram feitos em triplicata para cada amostra e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) das membranas porosas frente a *S. aureus* e *E. coli*.

Cepas de Bactérias	CIM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)					
	QT	QT/1%lap	QT/2,5%lap	QT/5%lap	QT/10%lap	Ampicilina
<i>S. aureus</i>	125	125	125	125	125	0,488
<i>E. coli</i>	125	125	125	125	125	1,95

Analizando os resultados apresentados na Tabela 4, nota-se que todas as membranas apresentaram atividade antimicrobiana, mas não houve diferença nos valores de inibição para nenhuma amostra. Esse valor de $125 \mu\text{L mL}^{-1}$ é satisfatório, pois, em baixa concentração, as membranas já foram capazes de inibir o desenvolvimento bacteriano.

A partir desses resultados, é possível afirmar que a quitosana foi o fator determinante para a ação inibitória do crescimento das bactérias. No caso da *S. aureus* (Figura 22a), bactéria gram (+), o principal modo de ação está relacionado às interações eletrostáticas entre a quitosana e os ácidos teicóicos (presentes na membrana celular bacteriana), o que leva à perturbação de várias funções, resultando em morte celular.^{103,104} Em relação à *E. coli* (Figura 22b), bactéria gram (-), pode haver dois mecanismos diferentes para o modo de ação. O primeiro se refere ao efeito quelante da quitosana com diferentes cátions, resultando na perturbação da integridade da parede celular e na absorção de nutrientes importantes. O

segundo efeito leva em consideração as interações eletrostáticas da quitosana com as partes aniônicas do lipopolissacarídeo, presente na membrana externa, o que leva ao rompimento da membrana celular.^{103,105} Assim, as interações eletrostáticas entre a superfície aniônica celular são determinantes na atividade antibacteriana da quitosana.

Figura 22 – Modo de ação da quitosana contra bactérias gram + (a) e gram – (b).

Adaptado de Verlee, A.¹⁰³

A Figura 23 apresenta a imagem dos poços revelados com resazurina. A ausência de crescimento da bactéria apresentou coloração azulada e o crescimento da mesma apresentou coloração rosada.

Figura 23 – Imagem ilustrativa dos ensaios antibacterianos realizados nas membranas porosas contra *S. aureus* e *E. coli*.

Os ensaios antibacterianos realizados constataram que as membranas possuem potencial bactericida. Essa propriedade é importante quando se almeja a obtenção de um biomaterial para aplicação em diversos tipos de feridas em que a infecção por bactérias constitui um grande problema no processo de cicatrização.

4.2.8 Viabilidade e adesão celular

O estudo da viabilidade celular *in vitro* é importante para avaliação da biocompatibilidade dos materiais, para o desenvolvimento de estudos *in vivo* e para uso clínico. Fibroblastos, as células mais comuns presentes no tecido conectivo, desempenham papel essencial no processo de cicatrização das lesões, criando novas matrizes extracelulares e estruturas de colágeno como suporte às outras células relacionadas a uma cicatrização eficaz, além de retrair a ferida.^{106,107} Nesse sentido, visando avaliar a citotoxicidade das membranas porosas, células de fibroblastos de camundongo (Balb/C 3T3) foram utilizadas. Os dados de viabilidade celular são apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Estudo de viabilidade celular usando Balb/C 3T3 (médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey ao nível de 5% de confiança).

De acordo com a ISO 10993-5,¹⁰⁸ valores de viabilidade celular menores que 70% já se caracterizam como efeito citotóxico. Assim, nenhuma das membranas produzidas foi citotóxica, uma vez que as porcentagens de células viáveis permaneceram acima desse valor. Com o aumento do conteúdo de laponita, houve também aumento na viabilidade celular. Estudos mostram que a viabilidade, adesão e proliferação celular podem ser induzidas pela incorporação de nanopartículas de argila na matriz polimérica.^{109,110}

O estabelecimento de interações entre o biomaterial e as células é considerado fator vital para a regeneração tecidual. Esse fenômeno foi avaliado pelas imagens de MEV (Figura 25 a 29).

Figura 25 –Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT em diferentes tempos.

Figura 26 – Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/1%lap em diferentes tempos.

Figura 27 – Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/2,5%lap em diferentes tempos.

Figura 28 - Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/5%lap em diferentes tempos.

Figura 29 - Imagens de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana QT/10%lap em diferentes tempos.

As micrografias revelaram que as células aderiram às membranas porosas a partir de 3 horas de incubação, inclusive na membrana contendo apenas quitosana pura. Até 12 horas de incubação, as células aderidas tinham formato esférico. Após esse período, houve redução na quantidade de células, exceto para a amostra QT/5%lap. Pela micrografia dessa amostra (Fig. 25), é possível notar que, após 24 horas de incubação, as células têm formato mais alongado, típico de fibroblastos,¹¹¹ resultando em uma maior adesão. Esses resultados sugerem que a presença de laponita na proporção de 5% melhorou a adesão e a proliferação celular em comparação com as outras amostras. Embora sejam necessárias investigações *in vivo* adicionais para validar essa membrana (QT/5%lap), pode-se concluir que ela é potencial candidata a ser aplicada como curativo. Micrografias adicionais são apresentadas no APÊNDICE A.

5 CONCLUSÃO

Membranas porosas à base de quitosana e laponita, com potencial para serem empregadas como curativos dérmicos, foram produzidas através de metodologia simples (liofilização). Variações no conteúdo de laponita resultaram em membranas com diferentes morfologias, propriedades físico-químicas e térmicas. Além disso, o procedimento de preparo das membranas foi eficiente, sendo obtidos nanocompósitos de estruturas esfoliadas e intercaladas. O nível de intercalação e esfoliação se mostrou dependente da concentração da argila. O estudo da estabilidade térmica das membranas demonstrou que a quantidade de argila desloca o processo de degradação para temperaturas mais altas. Em relação às propriedades mecânicas, a adição de laponita resultou em membranas mais rígidas e menos flexíveis, exceto a amostra QT/2,5%lap.

Verificou-se o aumento na porosidade e diminuição no grau de hidratação, quando comparadas à membrana de quitosana pura.

O ensaio de degradação enzimática *in vitro* revelou estabilidade física dos materiais quando em contato com a lisozima, ou seja, não ocorreu degradação significativa nas membranas na presença ou ausência da enzima e nem dissolução das membranas em tampão fosfato.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de bioadesão revelaram que a adição de laponita reforçou a matriz polimérica, tornando-a mais bioadesiva quando comparada à quitosana pura. Os mesmos resultados foram obtidos no estudo de viabilidade celular em que quanto maior a concentração de laponita resultou em membranas menos citotóxicas.

A presença de argila não alterou a atividade antimicrobiana das membranas produzidas, sugerindo que a quitosana foi o fator determinante para a ação inibitória do crescimento das bactérias.

A membrana com 5% de laponita (QT/5%lap) apresentou o melhor resultado de adesão celular, não havendo diminuição na quantidade de células aderidas em função do tempo de incubação, além das células apresentarem formato mais alongado, típico de fibroblastos.

Com base em todos os resultados expostos, as membranas porosas apresentaram características satisfatórias para serem aplicadas como curativos. Ademais, a concentração de argila foi significativa para melhorar as propriedades das membranas porosas para aplicação na regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS

- 1 MOGHADDAM, A. S.; RAJI, A.; MAVAFFAGH, J.; YAZDI, A. T.; MAHMOUDI, M. Effects of Autologous Keratinocyte Cells Spray with and without Chitosan on Third Degree Burn Healing: An Animal Experiment. **Wounds**, v. 26, n. 4, p. 109-117, 2014.
- 2 ZARRINTAJ, P.; MOGHADDAM, A. S.; MANOUCHEHRI, S.; ATOUFI, Z.; AMIRI, A.; AMIRKHANI, M. A. *et al.* Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. **Nanomedicine**, v. 12, n. 19, p. 2403-2422, 2017.
- 3 GAWRYSZEWSKI, V. P.; BERNAL, R. T. I.; SILVA, N. N. D.; MORAIS NETO, O. L. D.; SILVA, M. M. A. D.; MASCARENHAS, M. D. M. *et al.* Atendimentos decorrentes de queimaduras em serviços públicos de emergência no Brasil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, p. 629-640, 2012.
- 4 STEPHEN-HAYNES, J.; GIBSON, E.; GREENWOOD, M. Chitosan: a natural solution for wound healing. **Journal of Community Nursing**, v. 28, n. 1, p. 48-53, 2014.
- 5 MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393-408, 2003.
- 6 SUDHEESH KUMAR, P. T.; LAKSHMANAN, V.-K.; ANILKUMAR, T. V.; RAMYA, C.; RESHMI, P.; UNNIKRISHNAN, A. G. *et al.* Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 5, p. 2618-2629, 2012.
- 7 ARCHANA, D.; DUTTA, J.; DUTTA, P. K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 193-203, 2013.
- 8 PEREIRA, R. F.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L.; BARTOLO, P. J. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 603-621, 2013.
- 9 SILVA, A. R. P. D.; MACEDO, T. L.; COLETTA, D. J.; FELDMAN, S.; PEREIRA, M. D. M. Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 21, p. 964-973, 2016.
- 10 WIEGAND, C.; HIPLER, U.-C. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n. 2, p. 1-13, 2010.
- 11 GABRIEL, J. S.; GONZAGA, V. A. M.; POLI, A. L.; SCHMITT, C. C. Photochemical synthesis of silver nanoparticles on chitosans/montmorillonite nanocomposite films and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, n. Supplement C, p. 202-210, 2017.

- 12 LIU, M.; WU, C.; JIAO, Y.; XIONG, S.; ZHOU, C. Chitosan-halloysite nanotubes nanocomposite scaffolds for tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 15, p. 2078-2089, 2013.
- 13 ORDIKHANI, F.; DEHGHANI, M.; SIMCHI, A. Antibiotic-loaded chitosan–Laponite films for local drug delivery by titanium implants: cell proliferation and drug release studies. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 12, p. 269, 2015.
- 14 CLASEN, C.; WILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and Characterization of Chitosan Membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3210-3222, 2006.
- 15 LEE, S.-Y.; KAMARUL, T. NO, carboxymethyl chitosan enhanced scaffold porosity and biocompatibility under e-beam irradiation at 50kGy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 115-122, 2014.
- 16 ABOU-OKEIL, A.; SHETA, A. M.; AMR, A.; ALI, M. A. Wound dressing based on nonwoven viscose fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 658-666, 2012.
- 17 LIU, M.; ZHANG, Y.; WU, C.; XIONG, S.; ZHOU, C. Chitosan/halloysite nanotubes bionanocomposites: Structure, mechanical properties and biocompatibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 566-575, 2012.
- 18 ZHENG, J. P.; WANG, C. Z.; WANG, X. X.; WANG, H. Y.; ZHUANG, H.; YAO, K. D. Preparation of biomimetic three-dimensional gelatin/montmorillonite–chitosan scaffold for tissue engineering. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 9, p. 780-788, 2007.
- 19 VYAS, V.; KAUR, T.; THIRUGNANAM, A. Chitosan composite three dimensional macrospheric scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1946-1954, 2017.
- 20 ROSIQUE, R. G.; ROSIQUE, M. J.; FARINA JUNIOR, J. A. Curbing Inflammation in Skin Wound Healing: A Review. **International Journal of Inflammation**, v. 2015, p. 316235, 2015.
- 21 VANPUTTE, C. L.; REGAN, J. L.; RUSSO, A. F. *Seeley's Essentials of Anatomy & Physiology*. 9th. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2016.
- 22 ARNOLD, H. L. J.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. *Doenças de Pele de Andrews. Dermatologia Clínica*. 8. ed. São Paulo: Manole, 1994.
- 23 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.
- 24 FERREIRA, M. C.; TUMA JÚNIOR, P.; CARVALHO, V. F.; KAMAMOTO, F. Complex wounds. **Clinics**, v. 61, p. 571-578, 2006.

- 25 PERCIVAL, N. J. Classification of Wounds and their Management. **Surgery - Oxford International Edition**, v. 20, n. 5, p. 114-117, 2002.
- 26 IURK, L. K.; OLIVEIRA, A. F.; GRAGNANI, A.; FERREIRA, L. M. Evidências no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 95-99, 2010.
- 27 GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314, 2008.
- 28 YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Modern wound dressings: Manufacturing and properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 2, p. 85, 2006.
- 29 HEIN, S.; WANG, K.; STEVENS, W. F.; KJEMS, J. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. **Materials Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 1053-1061, 2008.
- 30 GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.
- 31 DURKIN, C. A.; MOCK, T.; ARMBRUST, E. V. Chitin in Diatoms and Its Association with the Cell Wall. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 1038-1050, 2009.
- 32 SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46-58, 2013.
- 33 RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, n. 3, p. 397-430, 2008.
- 34 DE SILVA, R. T.; PASBAKHS, P.; GOH, K. L.; CHAI, S.-P.; ISMAIL, H. Physico-chemical characterisation of chitosan/halloysite composite membranes. **Polymer Testing**, v. 32, n. 2, p. 265-271, 2013.
- 35 XIE, D. F.; MARTINO, V. P.; SANGWAN, P.; WAY, C.; CASH, G. A.; POLLET, E. *et al.* Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nano-biocomposites. **Polymer**, v. 54, n. 14, p. 3654-3662, 2013.
- 36 AHMAD, M.; AHMED, S.; SWAMI, B. L.; IKRAM, S. Adsorption of Heavy Metal Ions: Role of Chitosan and Cellulose For Water Treatment. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 6, p. 280-289, 2015.
- 37 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

38 AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 27-37, 2016.

39 JIN, Q.; SCHEXNAILDER, P.; GAHARWAR, A. K.; SCHMIDT, G. Silicate Cross-Linked Bio-Nanocomposite Hydrogels from PEO and Chitosan. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 10, p. 1028-1035, 2009.

40 KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.

41 FODA, N. H.; EL-LAITHY, H. M.; TADROS, M. I. Implantable Biodegradable Sponges: Effect of Interpolymer Complex Formation of Chitosan With Gelatin on the Release Behavior of Tramadol Hydrochloride. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 1, p. 7-17, 2007.

42 LEE, D. W.; LIM, H.; CHONG, H. N.; SHIM, W. S. Advances in Chitosan Material and its Hybrid Derivatives: A Review. **The Open Biomaterials Journal**, v. 1, p. 10-20, 2009.

43 NIEKRASZEWICZ, A. Chitosan medical dressings. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 13, n. 6(54), p. 16-18, 2005.

44 DAI, T.; TANAKA, M.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 7, p. 857-879, 2011.

45 MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.

46 GAHARWAR, A. K.; SCHEXNAILDER, P. J.; JIN, Q.; WU, C.-J.; SCHMIDT, G. Addition of Chitosan to Silicate Cross-Linked PEO for Tuning Osteoblast Cell Adhesion and Mineralization. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 11, p. 3119-3127, 2010.

47 GOMES, C. F. *Argilas: o quê são e para que servem*. Fundação Calouste Gulbenkian, 1988.

48 NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R. A.; CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v. 23, p. 818-824, 2000.

49 SANTOS, S. P. *Ciência e Tecnologia de Argilas*. 2. ed. São Paulo, Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda, 1989.

50 COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. D. S.; SANTOS, H. D. S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Química Nova**, v. 30, p. 146-152, 2007.

- 51 LIU, J.; LEE, J.-B.; KIM, D.-H.; KIM, Y. Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 302, n. 1, p. 276-279, 2007.
- 52 HILL, E. H.; ZHANG, Y.; WHITTEN, D. G. Aggregation of cationic p-phenylene ethynylenes on Laponite clay in aqueous dispersions and solid films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 449, p. 347-356, 2015.
- 53 KOTAL, M.; BHOWMICK, A. K. Polymer nanocomposites from modified clays: Recent advances and challenges. **Progress in Polymer Science**, v. 51, p. 127-187, 2015.
- 54 HARAGUCHI, K. Synthesis and properties of soft nanocomposite materials with novel organic/inorganic network structures. **Polymer Journal**, v. 43, p. 223, 2011.
- 55 LÓPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C.; CEREZO, P. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1, p. 51-63, 2007.
- 56 KOWALSKA, M.; GÜLER, H.; COCKE, D. L. Interactions of clay minerals with organic pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 141, n. 1, p. 223-240, 1994.
- 57 CHIU, C.-W.; HUANG, T.-K.; WANG, Y.-C.; ALAMANI, B. G.; LIN, J.-J. Intercalation strategies in clay/polymer hybrids. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 3, p. 443-485, 2014.
- 58 ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 11, p. 2126-2146, 2010.
- 59 PALUSZKIEWICZ, C.; STODOLAK, E.; HASIK, M.; BLAZEWICZ, M. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 4, p. 784-788, 2011.
- 60 RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; NG, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5814-5822, 2006.
- 61 SINHA RAY, S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: A review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 28, n. 11, p. 1539-1641, 2003.
- 62 XU, Y.; REN, X.; HANNA, M. A. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 4, p. 1684-1691, 2006.

63 PEROTTI, G. F.; TRONTO, J.; BIZETO, M. A.; IZUMI, C. M. S.; TEMPERINI, M. L. A.; LUGÃO, A. B. *et al.* Biopolymer-clay nanocomposites: cassava starch and synthetic clay cast films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 320-330, 2014.

64 SIROUSAZAR, M.; KOKABI, M.; HASSAN, Z. M. In Vivo and Cytotoxic Assays of a Poly(vinyl alcohol)/Clay Nanocomposite Hydrogel Wound Dressing. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 22, n. 8, p. 1023-1033, 2011.

65 AGUZZI, C.; SANDRI, G.; BONFERONI, C.; CEREZO, P.; ROSSI, S.; FERRARI, F. *et al.* Solid state characterisation of silver sulfadiazine loaded on montmorillonite/chitosan nanocomposite for wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 152-157, 2014.

66 UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: novel wound dressing material with antibacterial properties. **Cellulose**, v. 20, n. 2, p. 589-596, 2013.

67 SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; AGUZZI, C.; MORI, M. *et al.* Montmorillonite–chitosan–silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 970-977, 2014.

68 KHAN, F.; AHMAD, S. R. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 4, p. 395-421, 2013.

69 DOS SANTOS, D. M.; LEITE, I. S.; BUKZEM, A. D. L.; DE OLIVEIRA SANTOS, R. P.; FROLLINI, E.; INADA, N. M. *et al.* Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 110-121, 2018.

70 JANIK, H.; MARZEC, M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 586-591, 2015.

71 GRINBERG, O.; BINDERMAN, I.; BAHAR, H.; ZILBERMAN, M. Highly porous bioresorbable scaffolds with controlled release of bioactive agents for tissue-regeneration applications. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1278-1287, 2010.

72 WHANG, K.; THOMAS, C. H.; HEALY, K. E.; NUBER, G. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. **Polymer**, v. 36, n. 4, p. 837-842, 1995.

73 DEPAN, D.; VENKATA SURYA, P. K. C.; GIRASE, B.; MISRA, R. D. K. Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 5, p. 2163-2175, 2011.

74 SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, p. 63-68, 1998.

75 KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 477-488, 2007.

76 IKEDA, T.; IKEDA, K.; YAMAMOTO, K.; ISHIZAKI, H.; YOSHIZAWA, Y.; YANAGIGUCHI, K. *et al.* Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 8, 2014.

77 LI, L.; ZUO, Y.; ZOU, Q.; YANG, B.; LIN, L.; LI, J. *et al.* Hierarchical Structure and Mechanical Improvement of an n-HA/GCO–PU Composite Scaffold for Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 40, p. 22618-22629, 2015.

78 FONSECA-SANTOS, B.; FUNAGOSHI, E. E.; OLIVEIRA, J. R. S. D.; SACRAMENTO, L. V. S. D.; SANTOS, A. G. D.; LEONARDI, G. R. *et al.* Organic cocoa extract -loaded surfactant-based systems intended to skin bioadhesion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, 2017.

79 CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

80 JITHENDRA, P.; RAJAM, A. M.; KALAIVANI, T.; MANDAL, A. B.; ROSE, C. Preparation and Characterization of Aloe Vera Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 15, p. 7291-7298, 2013.

81 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, 1996.

82 OTTEY, M. H.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 1996.

83 MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v. 22, n. 4, p. 331-336, 2001.

84 OLAD, A.; FARSHI AZHAR, F. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 40, n. 7, Part A, p. 10061-10072, 2014.

85 ELSNER, J. J.; KRAITZER, A.; GRINBERG, O.; ZILBERMAN, M. Highly porous drug-eluting structures: From wound dressings to stents and scaffolds for tissue regeneration. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 239-270, 2012.

- 86 GOVINDAN, R.; KUMAR, G. S.; GIRIJA, E. K. Polymer coated phosphate glass/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 74, p. 60188-60198, 2015.
- 87 JI, C.; ANNABI, N.; KHADEMHOSEINI, A.; DEHGHANI, F. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1653-1664, 2011.
- 88 CHEN, C.; LIU, L.; HUANG, T.; WANG, Q.; FANG, Y. E. Bubble template fabrication of chitosan/poly(vinyl alcohol) sponges for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 188-193, 2013.
- 89 WANG, S. F.; SHEN, L.; TONG, Y. J.; CHEN, L.; PHANG, I. Y.; LIM, P. Q. *et al.* Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 1, p. 123-131, 2005.
- 90 LI, J.; SUN, H.; SUN, D.; YAO, Y.; YAO, F.; YAO, K. Biomimetic multicomponent polysaccharide/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 885-894, 2011.
- 91 FIELD, C. K.; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1, Supplement, p. S2-S6, 1994.
- 92 KABIRI, K.; MIRZADEH, H.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J. Chitosan modified MMT-poly(AMPS) nanocomposite hydrogel: Heating effect on swelling and rheological behavior. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2548-2556, 2010.
- 93 NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 3, p. 157-168.
- 94 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.
- 95 SHU, X. Z.; ZHU, K. J.; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 19-28, 2001.
- 96 RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R.; SALDÑA-KOPPEL, D. A.; QUIÑONES-OLVERA, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15, 2015.
- 97 TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567-575, 1997.

98 DE OLIVEIRA, M. J. A.; PARRA, D. F.; AMATO, V. S.; LUGÃO, A. B. Hydrogel membranes of PVAI/ clay by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 84, p. 111-114, 2013.

99 MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127-136, 2014.

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

101 CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2013.

102 KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 303-311, 2000.

103 VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268-283, 2017.

104 RAAFAT, D.; BARGEN, K. V.; HAAS, A.; HANS-GEORGE, S. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Applied and Environment Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.

105 CREMAR, L.; GUTIERREZ, J.; MARTINEZ, J.; MATERON, L.; GILKERSON, R.; XU, F. *et al.* Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. **Nanomedicine Journal**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2018.

106 KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 392, 2006.

107 WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998-1008, 2007.

108 ISO10993-5. International Organization for Standardization, Biological Evaluation of Medical Devices Part 5:Tests for In Vitro Cytotoxicity 2009.

109 GAHARWAR, A. K.; SCHEXNAILDER, P.; KAUL, V.; AKKUS, O.; ZAKHAROV, D.; SEIFERT, S. *et al.* Highly extensible bio-nanocomposite films with Direction-dependent properties. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 3, p. 429-436, 2010.

110 SCHEXNAILDER, P. J.; GAHARWAR, A. K.; BARTLETT II, R. L.; SEAL, B. L.; SCHMIDT, G. Tuning Cell Adhesion by Incorporation of Charged Silicate Nanoparticles as Cross-Linkers to Polyethylene Oxide. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 12, p. 1416-1423, 2010.

111 GOTOH, Y.; TAMADA, Y. In vitro study of initial cell attachment to the surfaces coated with conjugates consisting of silk fibroin and chitooligosaccharides. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 74, p. 39-43, 2005.

APÊNDICE A

Figura 30 - Imagens adicionais de MEV de cultura de células Balb/C 3T3 na membrana em diferentes tempos.