ANDREA DE LACERDA BUKZEM

Membranas porosas à base de carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico) para o tratamento de lesões de pele

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos

2018

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, Salmen e Scheila, às minhas irmãs, Soraya e Flavia e ao meu marido, Danilo, por estarem sempre presentes, me dando todo amor, carinho e suporte necessários.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir ter chegado até aqui, sempre me dando amor e forças para continuar em frente.

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

Ao professor Dr. Eduardo Rezende Triboni, da Escola de Engenharia de Lorena - Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo/USP, por fornecer as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).

Ao professor Dr. Andrei Leitão e MSc. Daiane Yukie Tezuka, do Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED), localizada no Instituto de Química de São Carlos (IQSC), pela análise de viabilidade celular.

Ao meu marido, Danilo, por estar sempre presente, me apoiando em todos os momentos. Obrigada por todo amor, carinho, amizade, companheirismo, incentivo e dedicação ao longo de todos os anos em que estamos juntos. Sua presença foi fundamental nessa caminhada.

Aos meus pais, Salmen e Scheila, e minhas irmãs, Soraya e Flávia por todo amor, carinho, confiança e incentivo em mim investidos ao longo de toda a minha vida. Sem vocês, não teria chegado até aqui, muito obrigada!

Aos meus amigos de laboratório: Ana, Anderson, Daniella, Deyvid, Filipe, Gleyce, Joice, Lucas, Patrícia, Rachel, Roberta, Thamires, Tatiane, Tonimar, Virgínia e William.

Aos funcionários da Central de Análises Químicas (CAQI) do IQSC e do grupo de Físico-Química Orgânica, em especial, ao Dr. Luiz Antônio Ramos, Dr. Marcio de Paula, MSc. André Luiz e Dra. Sylvana Miguel Agostinho, pela gentileza e eficiência nas análises.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Química de São Carlos, pela excelente infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

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

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a produção de membranas porosas à base de carboximetilquitosana (CMQ) para serem empregadas no tratamento de lesões de pele. Inicialmente, β -quitina extraída de gládios de lula foi submetida a processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS), resultando em quitosana com grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) 63 % e massa molecular média viscosimétrica ($\overline{Mv}$) $10,3 \pm 0,4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Carboximetilquitosana (CMQ) foi sintetizada sob condição heterogênea a partir da reação entre quitosana DAIUS e ácido monocloracético em meio alcalino por 4 horas a 30 °C, resultando em CMQ com graus médios de substituição e de desacetilação ($\overline{GS}$) = 1,1 e $\overline{GD}$ = 70 %, respectivamente. Na segunda etapa do presente estudo, membranas porosas à base de CMQ e poli (álcool vinílico) (PVA) foram preparadas através de processo de liofilização de soluções aquosas de CMQ e PVA, ou de blendas contendo diferentes proporções mássicas CMQ/PVA, a saber 75/25, 50/50, 25/75. As membranas foram caracterizadas quanto a morfologia, porosidade, capacidade de hidratação e propriedades mecânicas e térmicas (TG). Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da reticulação com genipina nas propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas. Os resultados dessa etapa revelaram que os materiais obtidos apresentaram superfícies porosas e poros interligados, exibindo elevadas porosidade e capacidade de hidratação. Foi observado que a presença de PVA nas blendas poliméricas resultou em materiais pouco solúveis em meio aquoso e termicamente mais estáveis quando comparados às membranas CMQ e PVA. Os ensaios de tração revelaram que blendas ricas em PVA resultaram em membranas mais resistentes, porém menos sujeitas a alongamento. De maneira geral, o processo de reticulação permitiu a obtenção de membranas estáveis em meio aquoso e também mais porosas e resistentes. Contudo, as membranas reticuladas apresentaram menores estabilidade térmica, capacidade de absorção de água e de alongamento. Os resultados obtidos nessa etapa do estudo indicaram que, as membranas que apresentaram maior potencial para aplicação como curativo para lesões de pele foram a composta somente por CMQ reticulada com genipina (R(CMQ)) e aquela não-reticulada constituída por CMQ/PVA na proporção mássica de 25/75 ((CMQ/PVA)_{25/75}). Com o objetivo de potencializar a sua utilização no tratamento de lesões de pele e conferir novas propriedades às membranas R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75}, nanopartículas de ZnO ou de TiO₂ foram adicionadas a essas formulações em diferentes proporções em relação à massa total de polímero, a saber 1 %, 2,5 % e 5 %, totalizando quatro novos conjuntos de amostras. Além das caracterizações físico-químicas e mecânicas, os quatro novos conjuntos de membranas também

foram submetidos a ensaios *in vitro* de suscetibilidade à degradação enzimática e de citotoxicidade em relação à linhagem de células de fibroblastos Balb/C 3T3 clone A 31. Os resultados dessa etapa revelaram que a incorporação de nanopartículas resultou em membranas com poros mais definidos e com maior capacidade de absorção de água. Em relação às propriedades térmicas e mecânicas, os conjuntos se comportaram de maneiras diferentes de acordo com a natureza e o teor de nanopartículas e em função do material de partida. Por outro lado, a presença de nanopartículas nas membranas não afetou a susceptibilidade à degradação enzimática, sendo verificado que apenas a composição da matriz polimérica influenciou a estabilidade das membranas. As membranas compostas somente por CMQ reticuladas com genipina degradaram completamente após quatro dias, ao passo que as amostras contendo PVA, independentemente da presença de nanopartículas, foram apenas parcialmente susceptíveis à ação da enzima. Por fim, todas as amostras, com exceção da amostra R(CMQ)_5ZnO, se mostraram atóxicas em relação a fibroblastos Balb/C 3T3 clone A 31. De forma geral, as membranas constituídas por CMQ/PVA contendo nanopartículas de ZnO ou de TiO₂ exibiram características físico-químicas, mecânicas e biológicas mais promissoras quando considerada a potencial aplicação desses materiais como curativos para lesões de pele.

Palavras-chave: biomateriais, membranas porosas, carboximetilquitosana, poli (álcool vinílico).

ABSTRACT

This work aimed to produce porous carboxymethylchitosan-based membranes to be used in the treatment of skin lesions. Thus, β -chitin extracted from squid pens was subjected to ultrasound assisted deacetylation (USAD process), resulting in USAD chitosan with acetylation degree ($\overline{GD}$) 63% and viscosity-average molecular weight ($\overline{Mv}$) $10.3 \pm 0.4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Carboxymethylchitosan (CMCh) was synthesized under heterogeneous condition from the reaction between USAD chitosan and monochloroacetic acid in alkaline medium for 4 hours at 30 °C, resulting in CMCh with average degrees of substitution and deacetylation ($\overline{GS}$) = 1,1 and $\overline{GD} = 70 \%$, respectively. In the second step of the present study, porous membranes based on CMCh and polyvinyl alcohol (PVA) were produced by freeze-drying aqueous solutions of CMQ and PVA, or blends containing different weight ratios CMCh/PVA, namely 75/25, 50/50, 25/75. The membranes were characterized with respect to morphology, porosity, hydration capacity and mechanical and thermal properties (TG). Additionally, the effects of crosslinking with genipin on the physicochemical and mechanical properties of membranes were evaluated. The results of this step revealed that the materials presented porous surfaces and interconnected pores, exhibiting high porosity and swelling capacity. It was observed that the presence of PVA in the polymer blends employed to produce the CMCh/PVA membranes resulted in materials poorly soluble in aqueous medium and thermally more stable as compared to CMCh and PVA membranes. Thus, the membrane prepared from the blends with lower content of PVA showed higher thermal stability when compared to the CMCh membrane. The tensile tests showed that from PVA rich blends, the membranes were more resistant were produced, but less subject to elongation as compared to the CMCh membrane. In general, the crosslinking process allowed to obtain membranes stable in aqueous media, and also more porous and more resistant. However, the crosslinked membranes presented lower thermal stability, water absorption capacity and elongation. The results obtained in this stage of the study indicated that the membranes that presented the greatest potential for application as a curative for skin lesions were composed only of CMCh reticulated with genipine (R(CMCh)) and the non-reticulated CMCh/PVA mass ratio of 25/75 ((CMCh/PVA)_{25/75}). In order to potentiate its use in the treatment of skin lesions and confer new properties on R(CMCh) and (CMCh/PVA)_{25/75} membranes, ZnO or TiO₂ nanoparticles were added to these formulations in different proportions in relation to the total polymer mass, to know, 1%, 2.5% and 5%, totaling four new sets of samples. In addition to the physicochemical and mechanical characterization, the four new membrane sets were also submitted to *in vitro* enzymatic degradation and susceptibility

tests with respect to the Balb / C 3T3 fibroblast cell line clone A 31. The results of this step revealed that the incorporation of nanoparticles resulted in membranes with more defined pores and with greater water absorption capacity. Regarding the thermal and mechanical properties, the assemblies behaved differently according to the nature and content of nanoparticles and as a function of the membrane composition. The presence of nanoparticles in the membranes did not affect the susceptibility to enzymatic degradation, being verified that only the composition of the polymer matrix influenced the stability of the membranes. Membranes composed only of CMCh crosslinked with genipine completely degraded after four days, whereas samples containing PVA, regardless of the presence of nanoparticles or crosslinking with genipine, were not susceptible to the action of the enzyme. Finally, all samples, except for sample R(CMCh)_5ZnO, were shown to be nontoxic in relation to Balb / C 3T3 fibroblasts clone A 31. In general, membranes consisting of CMCh/PVA containing ZnO nanoparticles or of TiO₂ exhibited the most promising physical-chemical, mechanical and biological characteristics when considering the potential application of these materials as curatives for skin lesions.

Keywords: biomaterials; porous membranes; carboxymethylchitosan; poly (vinyl alcohol).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática simplificada da estrutura da pele.....	19
Figura 2 – Estrutura idealizada da quitosana, em que “n” corresponde ao número de unidades GlcN e “n-1” refere-se às unidades GlcNAc.	26
Figura 3 - Exemplos de reações de carboximetilação de quitosana que levam à produção de derivados <i>O</i> -, <i>N</i> -, <i>N,O</i> - e <i>N,N</i> - substituídos.	29
Figura 4 - Mecanismo da reação de carboximetilação da quitosana: (i) alcalinização e (ii) eterificação (R=H ou CH ₂ COONa).	30
Figura 5 - Estrutura química do poli (álcool vinílico) (PVA).	32
Figura 6 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina em meio ácido ou neutro...	34
Figura 7 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina em meio alcalino.	35
Figura 8 - Espectros no infravermelho de beta-quitina, quitosana DAIUS e carboximetilquitosana na forma ácida (CMQH).	56
Figura 9 - Espectro de ¹ H RMN de (a) quitosana DAIUS e (b) <i>N,O</i> -carboximetilquitosana (CMQ).	57
Figura 10 - Espectro de RMN ¹³ C de carboximetilquitosana na forma sódica (CMQNa).	58
Figura 11 - (a) Espectros de FTIR-ATR das membranas R(CMQ) (1); R(CMQ/PVA) _{50/50} (2); CMQ (3); (CMQ/PVA) _{50/50} (4) e PVA (5). (b) Espectros no intervalo 1750 cm ⁻¹ - 800 cm ⁻¹ . ..	61
Figura 12 - Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície com ampliação de 100 vezes: (a) CMQ; (b) R(CMQ); (c) (CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅ ; (d) R(CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅ ; (e) (CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀ ; (f) R(CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀ ; (g) (CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ ; (h) R(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ ; (i) PVA.	63
Figura 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura do corte transversal com ampliação de 250 vezes: (a) CMQ; (b) R(CMQ); (c) (CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅ ; (d) R(CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅ ; (e) (CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀ ; (f) R(CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀ ; (g) (CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ ; (h) R(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ ; (i) PVA.	64
Figura 14 – Valores médios da porosidade das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.	66
Figura 15 - Capacidade de hidratação das membranas de CMQ/PVA (a) não-reticuladas e (b) reticuladas com genipina.	67

Figura 16 - Capacidade de hidratação no equilíbrio das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.	68
Figura 17 - Curvas de TG das membranas de CMQ/PVA (a) não reticuladas e (c) reticuladas com genipina e DTG das membranas de CMQ/PVA (b) não reticuladas e (d) reticuladas com genipina.	69
Figura 18 - (a) Valores de módulo de tensão na ruptura; (b) porcentagem de alongamento e (c) elasticidade das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.	71
Figura 19 – Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras R(CMQ) sem e com a adição de nanopartículas de ZnO.....	76
Figura 20 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras R(CMQ) sem e com a adição de nanopartículas de TiO ₂	77
Figura 21 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras (CMQ/PVA) _{25/75} sem e com a adição de nanopartículas de ZnO.....	79
Figura 22 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras (CMQ/PVA) _{25/75} sem e com a adição de nanopartículas de TiO ₂	80
Figura 23 - Espectros de energia dispersiva (EDX) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	82
Figura 24 - Média do valor de Zn ou Ti detectado em 3 pontos diferentes das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	82
Figura 25 – Valores médios da porosidade dos conjuntos de membranas R(CMQ) com nanopartículas de ZnO (a) e TiO ₂ (c) e (CMQ/PVA) _{25/75} com nanopartículas de ZnO (b) e TiO ₂ (d).....	83
Figura 26 - Capacidade de hidratação (a – d) e capacidade de hidratação no equilíbrio (e - h) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	85
Figura 27 - Curvas de TG (a, c, e, g) e DTG (b, d, f, h) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	88
Figura 28 – Valores de tensão na ruptura das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	91
Figura 29 - Valores de alongamento das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	92

Figura 30 - Valores de módulo de elasticidade das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	93
Figura 31 - Curva de perda de massa das membranas em função do tempo de incubação a 37 °C em tampão fosfato (pH = 7,4) na ausência e na presença de lisozima.	95
Figura 32 - Viabilidade celular de fibroblastos nas membranas R(CMQ) (a) e (CMQ/PVA) _{25/75} (b) com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA e a execução de reticulação com genipina.	44
Tabela 2 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA, a execução de reticulação com genipina e quantidade de nanopartículas adicionadas.	46
Tabela 3 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA e quantidade de nanopartículas adicionadas.	47
Tabela 4 - Viscosidades intrínsecas ($[\eta]$), massas moleculares médias viscosimétrica (M_v) e graus médios de polimerização viscosimétrica (GP) de quitosana DAIUS e carboximetilquitosana (CMQ).	59
Tabela 5 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas de CMQ/PVA reticuladas e não reticuladas com genipina.	70
Tabela 6 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO ₂	89

SUMÁRIO

Apresentação	15
Motivação e Contextualização.....	16
Capítulo 1 –Revisão Bibliográfica	18
1 Revisão Bibliográfica	19
1.1 Lesões de pele.....	19
1.2 Processo de cicatrização	20
1.3 Curativos utilizados no tratamento de lesões de pele.....	23
1.4 Membranas porosas	24
1.5 Carboximetilquitosana.....	26
1.6 Poli (álcool vinílico) – PVA	31
1.7 Genipina como agente reticulante	33
1.8 Nanopartículas metálicas, propriedades antimicrobianas e de cicatrização das membranas à base de CMQ	35
2 Objetivos.....	38
Capítulo 2 – Experimental.....	39
3 Materiais e métodos.....	40
3.1 Materiais	42
3.2 Quitosana DAIUS.....	42
3.3 Carboximetilquitosana.....	43
3.4 Membranas de carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico)	44
3.5 Produção das membranas com nanopartículas de ZnO ou TiO ₂	45
3.5.1 Membranas R(CMQ) com nanopartículas de ZnO ou TiO ₂	45
3.5.2 Membranas (CMQ/PVA) _{25/75} com nanopartículas de ZnO ou TiO ₂	46
3.6 Caracterizações.....	47
3.6.1 Caracterização estrutural dos polímeros.....	47
3.6.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	47

3.6.1.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	47
3.6.1.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono	48
3.6.2	Caracterizações Físico-Químicas	48
3.6.2.1	Viscosidade Intrínseca.....	48
3.6.2.2	Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	49
3.6.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
3.6.2.4	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	50
3.6.2.5	Porosidade	50
3.6.2.6	Capacidade de Hidratação	51
3.6.2.7	Análise Termogravimétrica	51
3.6.3	Análises Mecânicas	51
3.6.4	Degradação enzimática.....	52
3.6.5	Citotoxicidade.....	52
Capítulo 3 – Quitosana, CMQ e Membranas CMQ/PVA com e sem reticulação com genipina		54
4	Resultados e Discussão.....	55
4.1	Caracterização estrutural dos polímeros.....	55
4.1.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	55
4.1.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	56
4.2	Caracterizações Físico-Químicas	59
4.2.1	Viscosidade Intrínseca.....	59
4.2.2	Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	60
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	62
4.2.4	Porosidade	65
4.2.5	Capacidade de Hidratação	66
4.2.6	Análise Termogravimétrica	69

4.3	Análises Mecânicas	70
5	Conclusões Parciais	73
Capítulo 4 - Membranas R(CMQ) e (CMQ/PVA) _{25/75} com nanopartículas de ZnO e TiO ₂		74
6	Resultados e Discussão.....	75
6.1	Caracterizações Físico-Químicas	75
6.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	75
6.1.2	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	81
6.1.3	Porosidade	82
6.1.4	Capacidade de Hidratação	84
6.1.5	Análise Termogravimétrica	87
6.2	Análises Mecânicas	90
6.3	Degradação enzimática.....	94
6.4	Citotoxicidade.....	95
7	Conclusões Parciais	97
Conclusões e Perspectivas		99
Conclusões e Perspectivas		100
8	Referências Bibliográficas.....	102

Apresentação

Com o objetivo de facilitar a organização e compreensão do presente estudo, esta tese foi dividida em 4 capítulos. No primeiro capítulo são apresentados o referencial teórico e os objetivos. O segundo capítulo descreve a metodologia empregada ao longo do trabalho. O terceiro capítulo contempla a síntese de carboximetilquitosana (CMQ) e o estudo da obtenção de membranas porosas à base de CMQ e poli (álcool vinílico) (PVA), submetidas ou não ao processo de reticulação com genipina. Após análise dos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, as duas amostras que apresentaram propriedades físico-químicas interessantes considerando sua possível aplicação como curativos para lesões de pele, foram selecionadas para a elaboração e caracterização de membranas porosas contendo diferentes concentrações de nanopartículas de ZnO ou TiO₂, conforme descrito no capítulo 4. Ao final são apresentadas as conclusões mais importantes do estudo realizado.

Motivação e Contextualização

A pele é o maior órgão do corpo humano representando cerca de 15% da massa corporal de um adulto e é responsável por diversas funções no corpo humano, tais como proteção contra agentes externos, regulação da temperatura corpórea, funções sensitiva e metabólica, além de excreção de substâncias (TCHEMTCHOUA et al., 2011; TRINCA et al., 2017). O rompimento da estrutura da pele desencadeia uma série de processos fisiológicos voltados para a regeneração do local lesionado, porém, em algumas situações como, por exemplo, a perda de região extensa de pele ou doenças crônicas, a capacidade autorregenerativa da pele é afetada, sendo necessário o uso de curativos para favorecer o processo de cicatrização (PATRULEA et al., 2015).

Os curativos tradicionais atuam principalmente absorvendo o excesso de exsudatos e fornecendo proteção mecânica. Contudo, esses materiais não são capazes de manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida e fornecer proteção contra infecções, além de não estimular o processo de cicatrização. Diante disso, diversos estudos têm sido realizados visando ao desenvolvimento de novos materiais curativos à base de polímeros sintéticos, naturais ou da combinação de ambos, que apresentem propriedades que propiciem a cicatrização de maneira rápida e efetiva (GU et al., 2009; TAN et al., 2015; TCHEMTCHOUA et al., 2011; TRINCA et al., 2017). Dentre as técnicas empregadas na produção de materiais a serem utilizados como curativos, a liofilização possibilita a obtenção de materiais com elevada porosidade, o que facilita a permeação de gases, o transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio de umidade no leito da ferida favorecendo, portanto, o processo de cicatrização (GEIDOBLE; WINTER, 2013; MACKENZIE, 1988; SALGADO et al., 2012; TRINCA et al., 2017).

A *N,O*-carboximetilquitosana é um derivado aniônico de quitosana solúvel em ampla faixa de pH geralmente sintetizado sob condição heterogênea a partir da reação entre quitosana e ácido monocloroacético em meio alcalino. Esse derivado é biocompatível, biodegradável e apresenta atividade antimicrobiana e ação hemostática, o que o torna uma matéria prima promissora a ser utilizada na produção de membranas porosas potencialmente aplicáveis como curativos empregando a técnica de liofilização (ANITHA et al., 2009; JAYAKUMAR et al., 2010; UPADHYAYA et al., 2013). No entanto, membranas porosas compostas somente por carboximetilquitosana não possuem propriedades mecânicas adequadas e estabilidade em meio aquoso, o que limita a aplicação desses materiais como curativos (FIAMINGO; CAMPANA-FILHO, 2016).

Visando melhorar a estabilidade e as propriedades mecânicas de membranas porosas à base de carboximetilquitosana, diversas estratégias têm sido adotadas como a combinação com polímeros sintéticos ou o uso de agentes reticulantes. Poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético com potencial para ser utilizado na elaboração de materiais a serem empregados como curativos em função de ser biocompatível, biodegradável e possibilitar a obtenção de estruturas com propriedades mecânicas adequadas (KAMARUL et al., 2014; TRINCA et al., 2017). A genipina é um agente reticulante natural extraído de frutas de *Gardenia jasminoides* J. Ellis (gardênia) ou frutos imaturos de *Genipa americana* L. (genipapo) que é amplamente utilizada para a produção de materiais biocompatíveis à base de quitosana e seus derivados conferindo estabilidade em meio aquoso e propriedades mecânicas adequadas para que esses materiais sejam utilizados como curativos (AUSTERO et al., 2012; BISPO et al., 2010; MUZZARELLI, 2009b; ORYAN et al., 2018).

As propriedades antimicrobianas e de estímulo à cicatrização de membranas porosas à base de carboximetilquitosana podem ser potencializadas pela incorporação de nanopartículas de óxidos metálicos, tais como nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) (ORYAN; SAHVIEH, 2017). O ZnO possui alta estabilidade, propriedades antibacterianas e não-toxicidade, além de propiciar a migração de queratinócitos em direção ao local da ferida, promovendo a reepitelização e cicatrização melhorada (LIU; KIM, 2012; SUDHEESH KUMAR et al., 2012). Já o TiO₂, além de possuir efeito bactericida, é capaz de acelerar o processo de coagulação sanguínea e estimular o desenvolvimento de células associadas ao processo de regeneração tecidual (MOHANDAS et al., 2017; PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Nesse contexto, este trabalho foi dedicado ao desenvolvimento de membranas porosas à base de CMQ e PVA, reticuladas ou não com genipina, com o objetivo de obter materiais estáveis em água, com elevadas porosidade e capacidade de hidratação. Também foram produzidas membranas contendo nanopartículas de ZnO ou TiO₂, que foram caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas, estabilidade diante da ação de lisozima e viabilidade celular em relação a fibroblastos.

Capítulo 1 –Revisão Bibliográfica

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Lesões de pele

A pele consiste no maior órgão do corpo humano, o qual o reveste e protege em toda sua superfície, e representa cerca de 15 % da massa total do corpo. Esse órgão forma uma barreira física e química protetora contra impactos mecânicos, desidratação, toxinas e invasão de microrganismos, além de ser responsável pela regulação da temperatura corpórea e apresentar função sensitiva. A pele é formada por duas camadas principais, epiderme e derme, sendo estas sustentadas pela hipoderme (Figura 1) (KORRAPATI et al., 2016; MOGHADDAM; RAJI; YAZDI, 2014).

Figura 1 – Representação esquemática simplificada da estrutura da pele

Fonte: Adaptado de Zaidi e Lanigan (2010).

A epiderme é a camada mais externa e é composta principalmente de queratinócitos. Essa camada também apresenta, intercaladas entre os queratinócitos, células com ações na produção de melanina (melanócitos), percepção sensorial (células de Merkel) e função imunológica (Langerhans e outras células). As principais funções da epiderme são proteção contra impactos externos, atuar como barreira contra micro-organismos e a manutenção da hidratação da pele (TCHEMTCHOUA et al., 2011; ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

A derme é localizada abaixo da epiderme e é separada dessa camada pela membrana basal, sendo constituída por matriz extracelular, a qual é rica em colágeno, elastina, hialuronano e proteoglicanos. Nessa camada há também vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos incorporados em uma densa rede de tecido conjuntivo. Os fibroblastos, principal tipo celular presente na derme, são responsáveis pela maior parte da síntese dos componentes da matriz extracelular. Esta camada fornece principalmente força física e elasticidade para a pele, além

de suportar a extensa vasculatura, sistema linfático e feixes nervosos (PAUL; SHARMA, 2004; PROW et al., 2011; ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

Além das camadas que compõem a pele, existem ainda alguns apêndices na pele, como as unidades pilossebáceas (foliculos capilares e glândulas sebáceas associadas) e glândulas sudoríparas (PROW et al., 2011).

A hipoderme, localizada abaixo da derme, é composta basicamente por tecido adiposo, e, além de ser suporte para a epiderme e derme, auxilia no processo de termorregulação do corpo, sendo a principal responsável pelo isolamento e absorção de choque (PAUL; SHARMA, 2004; TCHEMTCHOUA et al., 2011).

Danos ou perda da integridade da pele podem ocorrer por vários motivos, incluindo trauma agudo, feridas crônicas e intervenções cirúrgicas. Uma das razões mais comuns para a grande perda de pele é o trauma térmico, em que áreas substanciais da pele são danificadas, muitas vezes sem a possibilidade de regeneração (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2010).

As feridas são geralmente classificadas como: *i*) feridas sem perda de tecidos, por exemplo, em cirurgias e *ii*) feridas com perda de tecidos, como queimaduras, ferimentos causados por traumatismos, escoriações ou eventos secundários em doenças crônicas (como estase venosa, úlceras diabéticas ou de pressão) e feridas iatrogênicas, ou seja, feridas resultantes de procedimentos ou tratamentos médicos, tais como locais doadores de enxertos de pele. As feridas também são classificadas conforme as camadas atingidas pela lesão, sendo que as feridas superficiais envolvem apenas a epiderme, as feridas de espessura parcial envolvem a epiderme e também a derme, e as feridas de espessura total também envolvem a gordura subcutânea ou tecidos mais profundos (PAUL; SHARMA, 2004).

1.2 Processo de cicatrização

O processo de cicatrização de feridas é um mecanismo concertado desencadeado imediatamente após o corpo sofrer lesões, sendo realizado em etapas sobrepostas. É um processo pelo qual os tecidos danificados ou destruídos pela lesão são removidos e a integridade do tecido é restaurada. O reparo do tecido lesionado é realizado pela regeneração espontânea do tecido dérmico ou pelo reparo do tecido conjuntivo. Ambos ocorrem independentemente do tipo de lesão e o processo de regeneração depende de vários fatores, dentre eles o tipo da lesão, sua profundidade, a quantidade de exsudado liberado e até mesmo a condição médica da pessoa (MOHANDAS et al., 2017; QIN, 2016).

O modo de reparo é determinado principalmente pela profundidade do tecido envolvido. Em lesões menores envolvendo a epiderme, a regeneração tecidual é imediata, com a

reepitelização ocorrendo dentro de 7 a 10 dias. No entanto, em feridas que envolvem perda de tecido dérmico e anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas, a reepitelização e regeneração não podem ocorrer prontamente, de modo que o corpo depende da formação de tecido conjuntivo para preencher o déficit de tecido da ferida. Esta reparação geralmente é realizada em diferentes estágios, que incluem hemostasia, inflamação, proliferação de tecido conjuntivo, contração, reepitelização e remodelação, sendo que essas fases são complexas e sobrepostas, ocorrendo de forma contínua durante todo o processo de cicatrização (PAUL; SHARMA, 2004; QIN, 2016).

O primeiro estágio da cicatrização da ferida, denominado hemostasia, é um mecanismo que atua na prevenção do excesso de perda de sangue no local da ferida através da formação de um coágulo sanguíneo e uma matriz provisória no local da ferida, que se inicia imediatamente após a lesão e se completa após algumas horas. Nesta etapa ocorre acúmulo de plaquetas e formação de um coágulo de fibrina. As plaquetas liberam vários fatores de crescimento que recrutam e permitem a migração de células para preencher o hiato tecidual com um coágulo sanguíneo composto por citocinas e fatores de crescimento, levando ao estancamento sanguíneo (MOHANDAS et al., 2017; REINKE; SORG, 2012).

A fase inflamatória é ativada durante a fase de hemostasia e dura aproximadamente 4 dias. A inflamação é marcada pela ativação de células imunes para defender a ferida contra as substâncias estranhas presentes no local através da infiltração de neutrófilos e macrófagos (MOHANDAS et al., 2017; REINKE; SORG, 2012). A ação dos neutrófilos é crucial nos primeiros dias após a lesão, porque sua capacidade de fagocitose e secreção de protease mata as bactérias locais e ajuda a degradar o tecido necrótico, agindo como um “limpador de feridas”. Neutrófilos cheios de bactérias e detritos são o pus presente no leito da ferida. Embora apareçam primeiro, os neutrófilos duram pouco mais de 6 horas. Macrófagos aparecem no local da ferida aproximadamente 48 horas após a lesão, removendo os detritos necróticos, ou estranhos, e bactérias (QIN, 2016; REINKE; SORG, 2012). Estas células iniciam dois aspectos importantes da cura: angiogênese e fibroplasia. A angiogênese, que é a formação de vasos sanguíneos, e a formação de gemas capilares, que começam aproximadamente 3 dias após o ferimento, sendo que ambas são essenciais para suprir as necessidades metabólicas do processo de regeneração. Já a fibroplasia, que é a formação de tecido fibroso e a síntese de colágeno, começa do terceiro ao quinto dia após a lesão (HANNA; GIACOPELLI, 1997).

O estágio seguinte é a proliferação, em que as células fibroblásticas sofrem rápida divisão, secretam colágeno e uma nova matriz extracelular é formada. Esta fase começa no final da fase inflamatória e dura até 3 semanas (aproximadamente 3 a 21 dias após a lesão). O foco

principal desta etapa do processo de cicatrização é cobrir a superfície da ferida através da formação de tecido de granulação e também a restauração da rede vascular. A produção de colágeno causa um aumento na resistência à tração da ferida entre os dias 5 e 15 após a lesão. A contração da ferida, que ocorre simultaneamente ao processo de proliferação, ajuda a reduzir o tamanho do defeito e aproxima as bordas da ferida, levando a um aumento gradual na resistência à tração (HANNA; GIACOPELLI, 1997; MOHANDAS et al., 2017; REINKE; SORG, 2012).

O processo de reepitelização também ocorre na fase proliferativa. Isto envolve a proliferação e migração de células epiteliais sobre o tecido de granulação para ligar as bordas da ferida. Reepitelização é essencial para a cicatrização de feridas, pois as novas células epiteliais representam uma barreira à invasão microbiana e ajudam a prevenir a perda de fluidos. Esta etapa ocorre rapidamente em uma ferida superficial, mas requer um tempo maior em feridas mais profundas. Na cicatrização de feridas superficiais, a reepitelização ocorre concomitantemente com a deposição de tecido conjuntivo. Já na cicatrização de feridas mais complexas, este processo é retardado até que o local da ferida seja preenchido com tecido de granulação. Como as células epiteliais devem migrar sobre a superfície da ferida, a rapidez da migração é fortemente afetada pelo tipo de superfície. As células epiteliais só podem migrar sobre uma superfície de ferida úmida e vascularizada e são inibidas por uma superfície de ferida seca ou necrosada (HANNA; GIACOPELLI, 1997; QIN, 2016).

Por fim, a fase final da cicatrização de feridas é chamada fase de maturação ou remodelação, começando em aproximadamente 21 dias após a lesão e se estendendo em até 1 a 2 anos após a lesão. A contração da ferida e o aumento gradual na resistência à tração são observados à medida que essa fase progride. Durante a remodelação, as fibras de colágeno recém-depositadas, que eram inicialmente mal organizadas, são progressivamente substituídas por fibras que se alinham em uma orientação específica ditada pelo ambiente e pelas forças mecânicas que se desenvolvem na região ferida, restaurando a resistência mecânica da pele. A resistência máxima à tração é alcançada no final da fase de maturação e é geralmente cerca de 80% da tração original do tecido não lesionado, dependendo da quantidade de colágeno sintetizado e pela extensão em que ocorreu a reticulação entre os feixes de colágeno. Por fim, as fibras de colágeno amadurecem e a ferida cicatriza com formação de cicatriz. Ocasionalmente, no processo de remodelação, pode ocorrer um desequilíbrio, resultando em formação anormal de cicatriz, como cicatriz hipertrófica ou quelóide. Em geral, a cicatrização de feridas é um processo bem coordenado, porém, alguns fatores sistêmicos como idade avançada, desnutrição, diabetes, doença renal, dentre outros, podem ser prejudiciais ao

desenvolvimento eficaz deste processo (HANNA; GIACOPELLI, 1997; HARDING; MORRIS; PATEL, 2002; MOHANDAS et al., 2017; QIN, 2016; TCHEMTCHOUA et al., 2011).

1.3 Curativos utilizados no tratamento de lesões de pele

O processo de regeneração da pele geralmente ocorre de forma espontânea, como apresentado anteriormente, porém, em lesões de pele mais complexas, muito extensas e/ou profundas, este processo pode ser prejudicado, sendo então necessário o uso de curativos para auxiliar a cicatrização e proteger a lesão (PATRULEA et al., 2015).

Estudos iniciados ainda na década de 1960, demonstraram que feridas ocluídas, que mantêm o local da lesão úmido e protegido, cicatrizam muito mais rápido do que as feridas secas e expostas ao ar. Uma ferida aberta, que está diretamente exposta ao ar, desidrata-se formando uma crosta ou escara, que atua como barreira mecânica para a migração das células epidérmicas, que são forçadas a se mover em um nível mais profundo de tecido, prolongando o processo de cicatrização. A umidade no local da ferida evita a formação desta crosta (PAUL; SHARMA, 2004). Entretanto, um curativo não deve permitir o acúmulo excessivo de líquido no leito da ferida devido ao risco de infecção, já que a infecção bacteriana pode tornar o processo de cicatrização inviável, podendo evoluir para septicemia e até mesmo levar o paciente a óbito (MI et al., 2001).

Durante as últimas décadas, um grande esforço foi feito para tornar o processo de cicatrização de feridas menos doloroso e mais rápido. Para tanto, a segurança do paciente, a eficiência clínica e a facilidade na manipulação e aplicação de curativos com capacidade de mimetizar as propriedades nativas da pele têm sido consideradas durante o desenvolvimento de novos curativos (MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015).

Existem várias formas de classificar os tipos de curativos. Pereira e colaboradores (2013) dividem esses materiais em duas classes: *i*) curativos tradicionais, que representam os produtos mais convencionais utilizados no tratamento de lesões cutâneas, constituem uma barreira protetora contra bactérias e microrganismos, porém absorvem grandes quantidades de exsudado, secando o leito da ferida e retardando o processo de cicatrização; *ii*) curativos modernos, que vêm sendo desenvolvidos para superar as limitações dos curativos tradicionais, são capazes de criar e manter um ambiente quente e úmido, proporcionando condições ideais para o processo de cicatrização. Já Paul e Sharma (2004) classificam os curativos como: *i*) curativos passivos, que são ditos tradicionais, como as compressas de gaze e tule; *ii*) curativos interativos, em geral produzidos com materiais poliméricos, sendo em sua maioria

transparentes, permeáveis ao vapor de água e oxigênio, porém impermeáveis às bactérias; *iii*) curativos bioativos, os quais fornecem substâncias ativas na cicatrização de feridas.

Atualmente, o foco das pesquisas tem sido o desenvolvimento de curativos modernos, ou bioativos, chamados de curativos ideais, com o objetivo de suprir as limitações existentes nos produtos que já são vendidos no mercado e incluem membranas, filmes finos e hidrogéis. Independentemente da forma, os materiais empregados nos curativos devem ser produzidos a partir de técnicas simples e, preferencialmente, a partir de matérias-primas de baixo custo. Adicionalmente, esses materiais devem ser fáceis de manipular, biocompatíveis, exibir boa adesão ao leito da ferida, possuir propriedades mecânicas adequadas, produzir ambiente em que ocorra troca de gases e de fluidos, absorver exsudatos de modo a não desidratar a pele, apresentar atividade biológica que iniba o desenvolvimento de fungos e bactérias, e favorecer o processo de cicatrização (ABOU-OKEIL et al., 2012; ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013; PEREIRA et al., 2013).

Muitos dos curativos comercializados atualmente, seja como hidrogéis, espumas, filmes ou outros formatos, têm vários dos requisitos necessários para serem os chamados curativos ideais para feridas, porém, seja por serem frágeis, ou caros, ou difíceis de aplicar, ou terem uma baixa taxa de absorção ou até mesmo a incapacidade de combater infecções, nenhum foi capaz de reunir todas as características necessárias de um curativo ideal (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002; KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

1.4 Membranas porosas

Membranas porosas consistem em exemplos de curativos bioativos que apresentam elevada capacidade de intumescimento, permeabilidade elevada ao vapor de água e a gases, estruturas porosas interligadas que propiciam a adesão, crescimento e proliferação celular, além de propriedades mecânicas adequadas para aplicação como curativos (CLASEN; WILHELMS; KULICKE, 2006; LEE; KAMARUL, 2014).

Membranas porosas de base polimérica podem ser produzidas através de criação de poros artificialmente (BELLINI et al., 2012; BEPPU et al., 2004) ou através de técnicas como eletrofiação (DOS SANTOS et al., 2018; NASERI et al., 2014), impressão 3D (LIU; CHANG; LIN, 2015), liofilização (FIAMINGO; CAMPANA-FILHO, 2016; MADIHALLY; MATTHEW, 1999; ZHAO et al., 2015), dentre outras. Como a técnica de liofilização de solução polimérica foi a escolhida para a produção de membranas porosas neste trabalho, é mais detalhadamente abordada a seguir.

O processo de liofilização geralmente envolve três etapas: *i*) congelamento visando a conversão de água em gelo; *ii*) sublimação do gelo e; *iii*) remoção de parte ou de toda a água que não foi convertida em gelo por difusão e dessorção (GEIDOBLE; WINTER, 2013; MACKENZIE, 1988). Embora a etapa de congelamento seja de extrema importância, a transformação de água em gelo não pode ser controlada diretamente, sendo necessário controlar a temperatura em que a solução aquosa super-resfriada forma o gelo espontaneamente, podendo gerar um produto mais uniforme durante a etapa de secagem (GEIDOBLE; WINTER, 2013).

A etapa de congelamento determina a morfologia e a distribuição dos cristais de gelo formados e, conseqüentemente, determina a forma, tamanho, distribuição e interconectividade dos poros originados pela sublimação da água congelada durante o processo. A escolha entre um congelamento rápido ou lento é feita de acordo com as características do produto desejado, porém, geralmente, quanto mais rápido o congelamento, mais demorado o processo de liofilização e mais bem definidos são os poros do produto final (ELIA; BARRESI, 1998).

Durante o processo de congelamento da solução polimérica, cristais de água são formados e expandidos na solução, portanto, a cadeia polimérica se concentra na interface entre os cristais de gelo e a solução, e se alinha ao longo da direção de crescimento desses cristais até o completo congelamento da solução. A remoção do gelo por sublimação leva ao aparecimento de espaços, ou poros, criando uma arquitetura semelhante a uma esponja, com cadeias poliméricas interconectadas entre si (BERRETTA; BUMGARDNER; JENNINGS, 2016; WANG et al., 2017).

Estes poros criam uma grande área superficial no material formado, criando vazios no interior e na superfície das membranas, permitindo que elas atuem auxiliando na regeneração tecidual. A porosidade do material possui implicações diretas sobre sua funcionalidade como curativo, uma vez que está diretamente relacionada a propriedades essenciais da célula, como nutrição, proliferação, migração para vascularização do tecido, além da formação do novo tecido (LOH; CHOONG, 2013; SUDHEESH KUMAR et al., 2012). Além disso, uma elevada porosidade pode facilitar o controle do equilíbrio de umidade no leito da ferida, evitando uma provável infecção, além de permitir a transferência de nutrientes e passagem do oxigênio, fundamentais para a regeneração do tecido lesionado (LIANG et al., 2016).

As membranas porosas de base polimérica podem ser produzidas a partir de polímeros naturais, tais como celulose e seus derivados (FU; ZHANG; YANG, 2013; LIN et al., 2013), alginato (SHALUMON et al., 2011), queratina (HAMASAKI et al., 2008), gelatina (NASERI et al., 2014) e quitosana e seus derivados (ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013; GIRI et al., 2012), polímeros sintéticos, como o poli (álcool vinílico) (PVA) (KAMOUN et al., 2015), poli

(ácido láctico (PLA) (LEBOURG; ANTÓN; RIBELLES, 2008), policaprolactona (PCL) (LEBOURG; ANTÓN; RIBELLES, 2008) e poliuretana (CHEN et al., 2011), além de misturas de polímeros sintéticos e naturais (JAIKUMAR et al., 2015; KAMARUL et al., 2014; LEE; KAMARUL, 2014; SABAA et al., 2015; ZHAO et al., 2012).

Membranas de quitosana já são comercialmente disponíveis, tais como os produtos HemCon (HemCon, Portland, OR), desde 2003, e Chitoskin (SanguiBioTech GmbH, Witten, Alemanha), desde 2004 (CLASEN; WILHELMS; KULICKE, 2006). O uso de derivados de quitosana, como a carboximetilquitosana (CMQ), também tem sido explorado para o desenvolvimento de membranas a serem aplicadas como curativos (LEE; KAMARUL, 2014; UPADHYAYA et al., 2014). Como CMQ é objeto de estudo do presente trabalho, no próximo tópico serão abordados as principais características desse polímero, como ele é obtido e sua aplicação na produção de membranas porosas.

1.5 Carboximetilquitosana

Quitosana é um biopolímero catiônico encontrado naturalmente em algumas espécies de fungos, mas geralmente é produzida a partir da desacetilação da quitina, que é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, presente em exoesqueletos de crustáceos, insetos e moluscos. É um polissacarídeo linear composto por unidades 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4), distribuídas aleatoriamente, com predomínio de unidades GlcN (Figura 2), sendo que o número médio de unidades *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) na cadeia do polímero é chamado de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e seu complemento (número de unidades GlcN), de grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) (FIAMINGO et al., 2016; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008; RINAUDO, 2006; SANTOS et al., 2003).

Figura 2 – Estrutura idealizada da quitosana, em que “n” corresponde ao número de unidades GlcN e “n-1” refere-se às unidades GlcNAc.

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

Embora a quitosana seja insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, é altamente solúvel em soluções ácidas diluídas, pois contém grupos amino primários ($pK_a \approx 6,3$), que em meio ácido são protonados e se tornam positivamente carregados, tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em soluções aquosas moderadamente ácidas (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017).

A quitosana vem sendo bastante estudada devido às suas interessantes propriedades físicas, químicas e biológicas, por ser biocompatível, biodegradável e possuir baixa toxicidade. Também apresenta atividades fungicida, antimicrobiana, mucoadesiva e hemostática, podendo atuar como um acelerador de cicatrização de feridas. Além destas propriedades, quitosana possui a capacidade de formar géis, filmes, fibras e membranas, sendo empregada em diversas aplicações nas áreas de cosméticos, alimentícia, farmacêutica, biomédica, agrícola, biotecnológica, além de engenharia de tecidos (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; JAYAKUMAR *et al.*, 2010; PATRULEA *et al.*, 2015; SANPUI *et al.*, 2008).

Outra interessante característica da quitosana visando ao desenvolvimento de curativos é a capacidade de promover a adequada formação de tecido de granulação acompanhada de angiogênese e deposição regular de finas fibras de colágeno. Alguns dos principais efeitos bioquímicos das quitinas e quitosanas são a ativação de fibroblastos, a produção de citocinas e a estimulação da síntese de colágeno tipo IV (MUZZARELLI, 2009a).

Porém, todas estas características da quitosana são controladas por fatores intrínsecos, incluindo a fonte de quitosana, seu grau médio de polimerização ($\overline{GP}$), massa molar média e grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) (AHMED; IKRAM, 2016). Desta forma, é comum encontrar em fontes bibliográficas o termo quitosanas, no plural, para se referir a este polímero, pois não existe uma estrutura fixa ou características específicas que definam a quitosana de forma geral (KUMAR *et al.*, 2004).

Porém, devido à baixa solubilidade em água, quitosana tem suas aplicações limitadas a meios aquosos ácidos. A derivatização deste polímero, com a introdução de grupos funcionais que visam sanar este problema e, ao mesmo tempo, conferir novas propriedades, ou até mesmo potencializar as já existentes, surge como uma alternativa interessante e eficiente (PAVINATTO *et al.*, 2017; WAHID *et al.*, 2017).

A quitosana possui três grupos funcionais principais sobre os quais são realizadas reações, a saber: grupo $-NH_2$ ligado ao C2 e os grupos $-OH$ ligados aos carbonos C3 e C6. Dentre as várias reações possíveis de serem realizadas, pode-se citar a inserção de grupos

aminos quaternários, (como nos casos dos derivados *N,N,N*-trimetilquitosana (TMQ) e *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana), grupos alquilas (como nos casos dos derivados palmitoilquitosana e carboxilquitosana) e grupos carboximetila (como nos casos dos derivados *O*- ou *N*-carboximetilquitosana) (RINAUDO, 2006).

No caso da reação de carboximetilação, os três grupos funcionais citados são reativos e a escolha das condições reacionais e do agente de eterificação permitem a preparação de *N*-, *O*-, *N,O*- ou *N,N*- carboximetilquitosana (Figura 3) (MUZZARELLI; MUZZARELLI, 2005). Na reação de carboximetilação da quitosana com ácido monocloroacético, é possível obter *O*- ou *N*-substituição, sendo que em meio fortemente alcalino, por exemplo solução aquosa NaOH 40 % ou concentrações mais elevadas, e temperaturas baixas, é predominante a *O*-substituição. Quando o meio permanece alcalino, porém, se a temperatura for ambiente ou superior, pode ocorrer tanto *O*- quanto *N*-substituição, ocorrendo reação nos grupos OH dos carbonos (C6 e C3) e também nos grupos NH₂ (ligado ao carbono C2), produzindo preferencialmente produto *N,O*-substituído. Já em meio ligeiramente alcalino (pH = 8,0 - 8,5), a *N*-substituição é favorecida, podendo ocorrer mono ou di-substituição. Uma maneira de obter CMQ com substituição apenas no grupo amino, tanto mono quanto dissustituída, é reagindo a quitosana com ácido glioxílico reduzindo-se em seguida o produto formado com NaBH₄, em que varia-se principalmente a razão quitosana/ácido para obtenção de *N* ou *N,N*-CMQ. Ao final da reação é possível determinar o grau médio de substituição ($\overline{GS}$) da CMQ obtida, que consiste na fração do grupo carboxílico por unidade (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; JIMTAISONG; SAEWAN, 2014; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010; RINAUDO et al., 1992).

Figura 3 - Exemplos de reações de carboximetilação de quitosana que levam à produção de derivados *O*-, *N*-, *N,O*- e *N,N*- substituídos.

Fonte: Adaptado de Upadhyaya et al. (2013) e Mourya, Inamdar e Tiwari (2010).

No presente trabalho, foi realizada a carboximetilação de quitosana em condições que favorecem *N,O*-substituição, sendo que esta síntese é realizada em duas etapas: a alcalinização e a eterificação. Na etapa de alcalinização, a quitosana é tratada com solução de hidróxido de sódio na presença de isopropanol que atua simultaneamente como agente intumescedor e diluente, facilitando a penetração do NaOH, que age como agente desprotonante, na estrutura da quitosana. Na segunda etapa, o ácido monocloroacético é adicionado ao meio reacional promovendo a eterificação do álcali quitosana (Figura 4). Geralmente a ordem de substituição, neste caso, é C6-OH > C3-OH > C2-NH₂ (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

Figura 4 - Mecanismo da reação de carboximetilação da quitosana: (i) alcalinização e (ii) eterificação (R=H ou CH₂COONa).

Fonte: Autoria própria.

Durante a reação de carboximetilação pode ocorrer paralelamente formação de glicolato de sódio pela reação entre o ácido monocloroacético e o hidróxido de sódio (Equação 1). O glicolato é eliminado na etapa de purificação através da lavagem com misturas etanol/água do derivado carboximetilado.

A reação de carboximetilação resulta em derivado de quitosana (CMQ) que é solúvel em meios aquosos neutro e alcalino ($\text{pH} > 7$), havendo porém uma separação de fases em decorrência do balanço entre cargas positivas e negativas no polímero, ocorrendo precipitação do produto em diferentes intervalos de faixa de pH ácidos, dependendo do grau médio de carboximetilação (ABREU; CAMPANA-FILHO; CAMPANA FILHO, 2005; FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; RINAUDO, 2006).

A carboximetilquitosana (CMQ) além de ser um polímero biodegradável que exibe baixa toxicidade, tem várias vantagens sobre a quitosana, como propriedade antioxidante potencializada, melhor biocompatibilidade, maior atividade antibacteriana, também sendo capaz de formar géis, membranas e filmes. Esse derivado de quitosana tem sido bastante explorado em diversas aplicações, como em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (BUKZEM et al., 2016; UPADHYAYA et al., 2013; WAHID et al., 2017).

Estas propriedades já apresentadas, juntamente com sua propriedade hidratante, sua capacidade de promover a proliferação dos fibroblastos da pele e de inibir a proliferação de fibroblastos quelóides, fazem da CMQ um excelente biomaterial para a cicatrização de feridas e no controle de quelóide (FAN et al., 2006; UPADHYAYA et al., 2013; ZHENG et al., 2011).

Além disso, membranas que possuem sítios ativos, como no caso da CMQ, possuem ainda vantagens como sensibilidade ao pH, capacidade bioadesiva, capacidade de absorção de água, biodegradabilidade controlável, não toxicidade dos produtos finais de degradação, potencial de liberação controlada de fármacos, além de facilidade de administração (KONG, 2012; VAGHANI et al., 2012).

Porém, a aplicação de biomateriais preparados a partir de biopolímeros, como quitosana e derivados, é limitada significativamente devido às suas propriedades mecânicas inadequadas que apresentam, principalmente resistência mecânica. Nos últimos anos, esforços consideráveis têm sido focados no desenvolvimento de novos métodos para obter membranas à base de biopolímeros com resistência mecânica elevada. Uma das estratégias possíveis para contornar essa limitação é o uso de blendas poliméricas, em que polímeros sintéticos, porém biocompatíveis, que apresentem propriedades mecânicas adequadas, são empregados juntamente com biopolímeros com propriedades biológicas interessantes (BAO et al., 2014). Como o poli (álcool vinílico) (PVA) foi o polímero escolhido para promover o adequado suporte mecânico às membranas estudadas neste trabalho, no próximo tópico serão abordados suas principais características e sua aplicação na produção de membranas porosas.

1.6 Poli (álcool vinílico) – PVA

Misturas de polímeros naturais e sintéticos com potencial uso como biomateriais representam uma nova classe de materiais que vêm atraindo a atenção de pesquisadores. Os biopolímeros apresentam boa biocompatibilidade, mas geralmente possuem propriedades mecânicas inadequadas, como baixa resistência, além de alto custo de produção. Para superar essas desvantagens, blendas entre polímeros com propriedades diferentes entre si são desenvolvidas (RAFIQUE et al., 2016). As propriedades da mistura de polímeros são uma soma das propriedades químicas, físicas, mecânicas e morfológicas dos polímeros que a constitui isoladamente. As vantagens de cada polímero podem ser combinadas ao produzir uma blenda polimérica, assim, ao combinar polímeros hidrofílicos, um sintético e outro a partir de uma fonte natural, pode-se produzir uma classe de redes híbridas com novas propriedades mais interessantes para a aplicação desejada (BISPO et al., 2010; SHEN; RUAN; GAO, 2009).

Algumas propriedades mecânicas de membranas compostas apenas de CMQ, como resistência à tração, tenacidade ou elasticidade, não são adequadas para algumas aplicações biomédicas, como seu uso em curativos ou até mesmo como substituto de tecidos da pele. Desta forma, a combinação deste polímero natural com o poli (álcool vinílico) (PVA), um polímero sintético, gerando uma blenda polimérica biodegradável, desperta interesse por ser um material promissor devido à sua ampla gama de propriedades químicas, físicas e biológicas (BISPO et al., 2010).

A principal razão pela escolha da blenda PVA/CMQ é que ambos os polímeros são biocompatíveis, solúveis em água, biodegradáveis e não-tóxicos. Ao combinar o PVA com a CMQ, pode haver uma melhoria nas propriedades e no custo de produção (RAFIQUE et al., 2016).

O poli (álcool vinílico) (PVA) (Figura 5), é um polímero sintético, produto de polimerização radicalar de acetato de vinila seguida por hidrólise dos grupos acetato (JAIKUMAR et al., 2015; MOHAMED; ELELLA; SABAA, 2015).

Figura 5 - Estrutura química do poli (álcool vinílico) (PVA).

Esse polímero, além de ser atóxico, biocompatível e hidrossolúvel, também é estável química e termicamente (SANTOS et al., 2016), e tem sido intensivamente investigado, tanto isolado quanto em blendas poliméricas, para diversas aplicações em Engenharia de Tecidos, como na reconstrução e regeneração de cartilagens e produção de órgãos artificiais, para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos, e também de curativos, pois proporciona ambiente favorável à cicatrização de feridas (SABAA et al., 2015).

No entanto, observou-se que o poli (álcool vinílico) (PVA) exibe baixa adesão celular quando empregado isoladamente, o que desfavorece seu emprego como biomaterial, especialmente no caso de curativos (LEE; KAMARUL, 2014). Entretanto, diversos estudos recentes mostram que membranas à base de quitosana e seus derivados, como a CMQ, e de PVA apresentam significativa melhora da adesão celular e das propriedades mecânicas quando comparadas às membranas de PVA (KAMARUL et al., 2014; LEE; KAMARUL, 2014; WANG et al., 2007).

1.7 Genipina como agente reticulante

Com o objetivo de empregar membranas compostas de CMQ e PVA como curativo para lesão de pele, é importante considerar que o dispositivo deve ser insolúvel em meio aquoso, pois através dele serão ministrados soro fisiológico, ou até mesmo alguns medicamentos, e a absorção de exsudato também não deve resultar em dissolução (PEREIRA et al., 2014). Nesse sentido, a execução de reação que leve à reticulação covalente dos polímeros constituintes do curativo é alternativa interessante, pois promove a insolubilização, aumenta a rigidez do material e sua rugosidade superficial, favorecendo a colonização e proliferação de células regenerativas (HILLBERG; HOLMES; TABRIZIAN, 2009). De fato, é conhecido que agentes que promovem a reticulação covalente estabilizam os polímeros, impedindo sua dissolução, aumentando sua estabilidade química e melhorando suas propriedades mecânicas (AUSTERO et al., 2012).

Dentre vários reticulantes amplamente empregados, a genipina é o que possui a menor toxicidade, sendo até 10000 vezes menos tóxica que o glutaraldeído e tem sido amplamente utilizada como um anti-inflamatório (CHEN et al., 2004; HILLBERG; HOLMES; TABRIZIAN, 2009; KUMARI; DUTTA, 2010). A genipina é um produto natural, isolado a partir dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides* Ellis (BISPO et al., 2010). Esse agente reticulante reage com a quitosana de maneiras diferentes conforme o pH do meio reacional. Assim, em condições ácidas e neutras, a reação se dá por meio de ataque nucleofílico do grupamento amino da quitosana ao átomo de carbono olefínico em C3 da genipina, o que resulta em abertura do anel de di-hidropirano para formar amina heterocíclica gerando uma função aldeído na molécula. A aldoxila reage então com a amina secundária recém-formada gerando um novo heterociclo. Por fim, ocorre uma substituição nucleofílica no éster da genipina por uma amina primária da quitosana, levando à formação de metanol. No produto final, são formadas cadeias curtas com algumas unidades de genipina que atuam como pontes de reticulação, dando maior rigidez e sustentação à membrana (Figura 6) (GONSALVES; ARAÚJO, 2011; LUO et al., 2015; MUZZARELLI, 2009b).

Figura 6 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina em meio ácido ou neutro.

Fonte: Gonsalves e Araújo (2011).

Em condições básicas, inicialmente ocorre a homopolimerização da genipina, em seguida ocorre reação de abertura de anel através de ataque nucleofílico do OH⁻ presente na solução aquosa, formando grupos aldeídos intermediários que, posteriormente, são submetidos à condensação aldólica. Os grupos aldeído terminais da genipina polimerizada sofrem então uma reação de base de *Schiff* com os grupos amino da quitosana para formar redes reticuladas. Portanto, as redes de quitosana reticuladas com genipina, sintetizadas em meio fortemente básico, consistem de cadeias de quitosana e pontes de reticulação longas de genipina polimerizada (Figura 7) (MI; SHYU; PENG, 2005).

Figura 7 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina em meio alcalino.

Fonte: Gonsalves e Araújo (2011).

1.8 Nanopartículas metálicas, propriedades antimicrobianas e de cicatrização das membranas à base de CMQ

Como observado anteriormente, é sabido que um curativo ideal deve apresentar características como proteger a ferida contra danos físicos e invasão de microrganismos, prevenir a perda de líquidos corporais ao mesmo tempo em que evita o acúmulo de exsudatos, permitir troca gasosa, ser confortável ao paciente, ser durável, não-tóxico, não aderente, não irritante, não retardar ou inibir qualquer etapa do processo de cicatrização, além de ser compatível com agentes terapêuticos tópicos (MORGADO et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

Porém, uma característica de fundamental importância é a capacidade do curativo de proteger as feridas de contaminação externa, exercendo efeitos bactericidas suficientes para evitar ou inibir a infecção, uma vez que infecções nas superfícies das feridas causam frequentemente cicatrização tardia, além de aumentarem o risco de septicemia, principal causa de morte relacionada com feridas graves (GUTHA et al., 2017; PEREIRA et al., 2014).

A quitosana e seus derivados apresentam atividade antimicrobiana contra os patógenos microbianos devido a essas moléculas serem carregadas positivamente em $\text{pH} < 6.5$ (como pode ocorrer em infecções epidérmicas), sendo que essas cargas estão localizadas nos grupos amino. Essas cargas positivas associam-se às cargas negativas das paredes celulares e membranas plasmáticas das células microbianas, o que causa aumento da permeabilidade do envelope celular bacteriano, levando a dano osmótico e fluxo do conteúdo citoplasmático (incluindo íons e proteínas) para fora da célula microbiana (GUTHA et al., 2017; PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013). Esses efeitos antimicrobianos, porém, são controlados por fatores intrínsecos, incluindo a fonte de quitosana, seu grau médio de polimerização, massa molar e grau médio de desacetilação, podendo haver maior ou menor atividade de acordo com as características da amostra utilizada (AHMED; IKRAM, 2016).

Tanto a quitosana quanto seus derivados podem ter sua atividade antimicrobiana melhorada com a adição de nanopartículas metálicas, que favorecem esta atividade sem afetar a viabilidade de células normais. Além disso, a adição destas nanopartículas favorece propriedades que aceleram os processos de cicatrização de feridas através da regulação das etapas de inflamação e reepitelização. O mecanismo de ação antimicrobiana das nanopartículas metálicas é dependente da concentração e ocorre principalmente através da formação de radicais livres, sendo dependentes também do tipo de íons metálicos que formam, além da massa molecular e do grau de desacetilação da quitosana a que estão associadas (MOHANDAS et al., 2017).

O óxido de zinco (ZnO) tem atraído grande interesse devido à sua atividade fotocatalítica, alta estabilidade, atividade antibacteriana e não-toxicidade. Estudos anteriores demonstraram que o ZnO exibe atividades antimicrobianas em um amplo espectro de bactérias, além de exercer efeitos biocidas também em espécies fúngicas e virais. Foi mostrado que, em uma escala de tamanho < 100 nm e na concentração apropriada, nanopartículas de ZnO possuem atividade antibacteriana potente, mas não tem efeito adverso nas células normais, sendo inclusive aprovado como um material seguro pela FDA (Food and Drug Administration). Além disso, os íons Zn^{2+} liberados podem aumentar a migração de queratinócitos em direção ao local da ferida e promover a reepitelização e cicatrização melhorada (LIU; KIM, 2012;

MOHANDAS et al., 2017; SUDHEESH KUMAR et al., 2012; ULLAH; ZAINOL; IDRUS, 2017).

Nanopartículas de ZnO atuam através de múltiplos mecanismos para combater microrganismos, tornando improvável que estes se tornem resistentes. Estes mecanismos são os seguintes: *i*) as nanopartículas de ZnO ligam-se fortemente às membranas celulares bacterianas e destroem tanto os lipídios como as proteínas da membrana, o que pode causar a morte celular; *ii*) as nanopartículas de ZnO geram íons Zn^{2+} e espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que danificam a célula bacteriana além de desempenharem um papel importante na proliferação e adesão celular (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; ULLAH; ZAINOL; IDRUS, 2017).

Além do ZnO, outro óxido de metal que também vem despertando bastante interesse atualmente é o dióxido de titânio. Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) desempenham um papel fundamental para melhorar as propriedades mecânicas do curativo, a eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e se mostraram capaz de acelerar o processo de coagulação sanguínea, para o controle da hemorragia e de cicatrização de feridas, além de estimular o crescimento celular. As nanopartículas de TiO_2 também atuam contra vírus e esporos bacterianos. Porém, nanopartículas de TiO_2 , em concentrações elevadas, podem se tornar citotóxicas. No entanto, os problemas de toxicidade relacionados ao TiO_2 foram reduzidos pela incorporação na matriz de quitosana ou de seus derivados (ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013; MOHANDAS et al., 2017; PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) também empregam pelo menos dois mecanismos antimicrobianos, portanto a probabilidade de desenvolvimento de resistência à nanopartículas de TiO_2 é baixa. Esses mecanismos incluem: *i*) Em um processo chamado fotocatalise, após exposição à radiação UV e UVA o TiO_2 gera espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\bullet OH$), que danificam as membranas das células bacterianas, comprometendo assim a funcionalidade da membrana e, por vezes, causando a morte celular; *ii*) As nanopartículas de TiO_2 também têm efeitos bactericidas na ausência de irradiação, sugerindo que elas atuem por outros mecanismos não relacionados à fotocatalise (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Por fim, como tanto o ZnO quanto o TiO_2 absorvem e refletem a radiação UV, eles também podem ser usados como filtros UV para reduzir o efeito prejudicial causado pela radiação UV no tecido lesionado da pele, levando a maior proteção da lesão (HOLMES et al., 2016).

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é a produção de membranas de carboximetilquitosana (CMQ) e poli (álcool vinílico) (PVA), reticuladas ou não com genipina, com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ou dióxido de titânio (TiO₂), e a sua caracterização, especialmente em termos de propriedades físico-químicas e mecânicas, visando a avaliação da potencial aplicação das membranas resultantes na regeneração de lesões pele.

Nesse sentido, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Produção de quitosana *via* processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (DAIUS) aplicado à beta-quitina extraída de gládios de lulas (*Doryteuthis spp.*);
- Síntese de *N,O*-carboximetilquitosana (CMQ) por reação entre quitosana e ácido monocloroacético em meio alcalino;
- Caracterização estrutural e físico-química de quitosana e CMQ;
- Avaliação da influência da proporção mássica CMQ/PVA nas propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas das membranas;
- Avaliação dos efeitos da reticulação com genipina nas propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas das membranas;
- Avaliação dos efeitos da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ou de dióxido de titânio (TiO₂) nas propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas das membranas;
- Avaliação da citotoxicidade das membranas com nanopartículas incorporadas em sua estrutura em relação a fibroblastos.

Capítulo 2 – Experimental

3 Materiais e métodos

Este trabalho está dividido em 4 capítulos, conforme apresentado anteriormente. O capítulo a seguir, denominado Experimental, apresenta a metodologia empregada ao longo deste estudo, ao passo que os capítulos 3 e 4 contemplam resultados e discussão, além de breve conclusão de cada etapa realizada. Com o objetivo de facilitar a compreensão deste estudo, o fluxograma abaixo apresenta resumidamente a metodologia empregada e as caracterizações realizadas em cada etapa.

Inicialmente, como consta no bloco 1, houve o preparo da amostra de CMQ, sendo também descritas a extração da quitina de gládios de lulas e as caracterizações de quitina, quitosana e CMQ. Em seguida, foram produzidas membranas porosas de CMQ, PVA e de blendas poliméricas CMQ/PVA nas proporções 75/25, 50/50 e 25/75 (bloco 2). Foram realizadas caracterizações estruturais, físico-químicas e mecânicas destas amostras. Os resultados destas análises estão apresentados no Capítulo 3.

Após análises dos resultados obtidos nesta primeira etapa, 2 amostras foram selecionadas para incorporação de nanopartículas de ZnO e TiO₂ (bloco 3), sendo que as membranas obtidas, além das análises realizadas anteriormente, também foram caracterizadas quanto à susceptibilidade à lisozima e citotoxicidade. Os resultados desta etapa do trabalho estão descritos no capítulo 4. Os procedimentos e caracterizações realizadas em todas as etapas do trabalho estão descritos nos itens a seguir.

Fluxograma 1 - Diagrama representando as etapas correspondentes à preparação e caracterização dos polímeros de partida e das membranas à base de CMQ.

3.1 Materiais

O poli (álcool vinílico) (PVA) ($M_w = 130.000$; 99 % hidrolisado), foi adquirido da Sigma-Aldrich. A genipina, empregada como agente reticulante, foi adquirida da Challenge Bioproducts Co. Ltd. (China). As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) (diâmetro médio ≈ 15 nm) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Triboni, da Escola de Engenharia de Lorena - Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo/USP. Já as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) (diâmetro médio ≈ 20 nm) foram adquiridas da Evonik Industries (Alemanha). Os demais reagentes empregados neste trabalho foram obtidos comercialmente e usados sem purificação prévia.

3.2 Quitosana DAIUS

Beta-quitina foi extraída de gládios de lulas da espécie *Doryteuthis spp.*, cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP). Os gládios foram submetidos ao processo de lavagem com água para remoção do excesso de carne presente, sendo, em seguida, secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 48 h a 30°C.

Os gládios secos foram triturados em moinho de facas (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi) e o material resultante da moagem foi desproteínizado conforme metodologia proposta por Chaussard e Domard (2004). Assim, aproximadamente 200 g de gládios moídos foram suspensos em três litros de solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹ e mantido sob agitação mecânica a 350 rpm, durante 18 h à temperatura ambiente. A suspensão resultante foi filtrada e o sólido lavado até a neutralidade das águas de lavagem. O material sólido obtido (beta-quitina) foi seco em estufa com circulação de ar durante 48h, a 30°C e, em seguida, moído em micromoinho de facas e peneirado de maneira a obter material com granulometria entre 0,125 – 250 μ m.

Quitosana foi produzida através da desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS) da beta-quitina conforme metodologia proposta por Fiamingo *et al.* (2016). Inicialmente 5 g de beta-quitina foram suspensos em 50 mL de solução aquosa NaOH 40 % (m/v) contida em reator de vidro encamisado disposto no interior da caixa de isolamento acústico do dispositivo ultrassônico Hielscher modelo UP400S. Em seguida, sonotrodo de 22 mm de diâmetro foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na suspensão de beta-quitina, que foi mantida sob agitação magnética constante a $60 \pm 0,2$ °C e potência do ultrassom de 200 W durante 50 min.

Após esta etapa, a suspensão foi transferida para um béquer de polipropileno contendo cubos de gelo de água destilada e mantida à baixa temperatura, sendo em seguida neutralizada com ácido clorídrico concentrado. A suspensão foi filtrada e o sólido obtido foi lavado extensivamente com soluções etanol/água 75 %, 80 %, 90 % e, por fim, com etanol absoluto. A quitosana obtida foi seca a 30 °C em estufa com circulação forçada de ar por 72 h.

3.3 Carboximetilquitosana

A síntese de carboximetilquitosana foi realizada em duas etapas, a saber alcalinização e eterificação, conforme a literatura (CHEN; PARK, 2003). A alcalinização foi conduzida a 30 °C em reator de vidro encamisado acoplado a banho termostatizado, no qual solução de NaOH 50 % (m/v) foi adicionada à suspensão de 10 g de quitosana em 100 mL de isopropanol/água (4/1 v/v), de maneira a resultar em razão molar NaOH/quitosana 6/1, que foi mantida sob agitação magnética por 1 hora.

A etapa de eterificação foi realizada empregando solução de ácido monocloroacético (AMC), observando razão molar AMC/quitosana 3/1. Assim, 15 g de ácido monocloroacético foram dissolvidos em 20 g de isopropanol, a solução resultante foi então adicionada à suspensão de quitosana em solução aquosa de NaOH/isopropanol e a reação procedeu por 4 h a 30 °C.

Após a reação, o sólido foi filtrado e suspenso em etanol absoluto, sendo em seguida neutralizado com ácido clorídrico. O sólido foi filtrado novamente, lavado várias vezes com etanol 80 % e, por fim, com etanol absoluto, sendo em seguida seco à temperatura ambiente.

Na etapa de purificação, a carboximetilquitosana foi dissolvida em água destilada sendo que a solução resultante (1,0 g L⁻¹) foi filtrada sob pressão positiva através de membranas com diâmetros médios dos poros de 0,45 µm (Millipore – White SCWP). À solução filtrada foi adicionada solução aquosa de NaCl 0,2 mol L⁻¹, permanecendo a solução sob agitação durante aproximadamente 1 h. Em seguida foi adicionado etanol 95% em porções de 100 mL sob forte agitação até precipitação do polímero. Após essa etapa, o sólido foi filtrado e lavado com soluções de etanol a 75%, 80%, 90% (v/v), etanol absoluto e seco em estufa a 30 °C. Desta forma, foi obtida carboximetilquitosana na forma sódica (CMQNa), a qual foi utilizada para realização de todas as análises, com exceção de Espectroscopia no infravermelho, para a qual foi realizada a conversão para a forma ácida (CMQH) de modo a destacar a banda da carbonila de ácido daquelas de amida. Para isso, CMQNa foi dispersa em etanol e o pH foi ajustado para 1 empregando HCl e a suspensão foi mantida sob agitação por 1 h para completa conversão para a forma ácida. Em seguida, a CMQ foi filtrada, lavada extensivamente e seca em estufa a 30 °C, resultando em CMQH.

3.4 Membranas de carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico)

Membranas de carboximetilquitosana (CMQ) e poli (álcool vinílico) (PVA) foram preparadas empregando diferentes proporções mássicas CMQ/PVA (m/m), a saber 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 e 0/100, mantendo a concentração de sólidos totais em 0,5 %, com e sem reticulação com genipina. Para isto, a massa correspondente de PVA para cada razão CMQ/PVA foi dissolvida no volume final de água a 80 °C por 6 horas. A solução foi esfriada sendo em seguida adicionada massa de CMQ correspondente à proporção desejada, sendo então mantida sob agitação por mais 18 horas para completa homogeneização da solução. Para a produção das membranas reticuladas, solução de genipina foi adicionada à solução contendo CMQ/PVA para resultar em concentração final de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina, mantida sob agitação por meia hora e, posteriormente, em repouso por 24 horas para ocorrência da reticulação. Para efeito de comparação, as amostras não reticuladas também foram mantidas em repouso por 24 horas. No caso da membrana contendo apenas PVA não foi realizada a reação de reticulação com genipina.

Na etapa subsequente, as soluções foram submetidas a tratamento em banho ultrassônico por 10 min para remoção de bolhas e, em seguida, vertidas em placas de petri de 8,5 cm de diâmetro, para obter altura fixa de $\approx 0,5 \text{ cm}$, congeladas a -80 °C (Ultra Low Temperature Freezer, modelo U410 premium, New Brunswick) e em seguida liofilizadas (Liotop L101, Liobrás). As membranas liofilizadas foram lavadas inicialmente com etanol absoluto e em seguida com água destilada para remover o excesso de álcool, genipina e de sais. Após a lavagem, as membranas foram novamente congeladas e liofilizadas e identificadas conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA e a execução de reticulação com genipina.

Amostra	CMQ (%)	PVA (%)	Genipina (mol L^{-1})
CMQ	100	0	0
(CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅	75	25	0
(CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀	50	50	0
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅	25	75	0
PVA	0	100	0
R(CMQ)	100	0	2,5
R(CMQ/PVA) ₇₅₋₂₅	75	25	2,5
R(CMQ/PVA) ₅₀₋₅₀	50	50	2,5
R(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅	25	75	2,5

3.5 Produção das membranas com nanopartículas de ZnO ou TiO₂

Conforme obtido ao final do bloco 2, descrito anteriormente no item 3.4, dentre as membranas produzidas, as que apresentaram propriedades físico-químicas mais promissoras para serem empregadas como curativos para lesões de pele (propriedades descritas detalhadamente ao final do capítulo 3) foram as amostras R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75}. Desta forma, ambas foram selecionadas para a próxima fase do trabalho, a qual consistiu na incorporação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂), separadamente, com o objetivo de avaliar os efeitos desta incorporação nas propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas das membranas, e sobre a citotoxicidade das membranas.

3.5.1 Membranas R(CMQ) com nanopartículas de ZnO ou TiO₂

Membranas de carboximetil quitosana (CMQ) reticuladas com genipina, foram preparadas com diferentes concentrações (1, 2,5 e 5 %) de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ou dióxido de titânio (TiO₂), mantendo a concentração de sólidos totais em 0,5 %. Para isto, CMQ foi dissolvida à temperatura ambiente por 18 horas para completa homogeneização da solução. Em seguida, a massa correspondente a cada concentração de nanopartículas foi suspensa em um volume fixo de água e sonicada em reator ultrassom (Hielscher modelo UP400S) por 3 minutos, empregando sonotrodo de 22 mm de diâmetro e potência do ultrassom de 200 W, para completa suspensão das partículas. A suspensão foi adicionada à solução de CMQ e mantida sob agitação por 2 horas, para completa homogeneização da solução. Posteriormente, solução de genipina foi adicionada à suspensão, resultando em concentração final de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de genipina e mantida sob agitação por meia hora.

Na etapa subsequente, as suspensões foram submetidas a tratamento em banho ultrassônico por 10 min para remoção de bolhas e, em seguida, vertidas em placas de petri de 8,5 cm de diâmetro, para obter altura fixa de $\approx 0,5$ cm e deixadas em repouso por 24 horas para ocorrência do processo de reticulação. Após este tempo, as placas de petri foram congeladas a - 80 °C (Ultra Low Temperature Freezer, modelo U410 premium, New Brunswick) e em seguida liofilizadas (Liotop L101, Liobrás). As membranas liofilizadas foram lavadas com álcool etílico PA e posteriormente com água destilada para remover o excesso de álcool, genipina e nanopartículas. Após a lavagem, as membranas foram novamente congeladas, liofilizadas e identificadas conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA, a execução de reticulação com genipina e quantidade de nanopartículas adicionadas.

Amostra	CMQ (%)	Genipina (mol L ⁻¹)	ZnO (%)	TiO ₂ (%)
R(CMQ)	100	2,5	0	0
R(CMQ)_1ZnO	100	2,5	1	0
R(CMQ)_2,5ZnO	100	2,5	2,5	0
R(CMQ)_5ZnO	100	2,5	5	0
R(CMQ)_1TiO ₂	100	2,5	0	1
R(CMQ)_2,5TiO ₂	100	2,5	0	2,5
R(CMQ)_5TiO ₂	100	2,5	0	5

3.5.2 Membranas (CMQ/PVA)_{25/75} com nanopartículas de ZnO ou TiO₂

Membranas de carboximetilquitosana (CMQ) e poli (álcool vinílico) (PVA) foram preparadas empregando proporção CMQ/PVA 25/75, com concentração de sólidos totais fixada em 0,5 %. Para isto, a massa correspondente de PVA foi dissolvida em volume determinado de água a 80 °C por 6 horas. A solução foi esfriada sendo em seguida adicionada massa correspondente de CMQ, sendo então mantida sob agitação por mais 18 horas à temperatura ambiente para completa homogeneização da solução. Em seguida, a massa correspondente a cada concentração de nanopartículas de ZnO ou TiO₂ foi suspensa em um volume fixo de água e sonicada em dispositivo ultrassônico (Hielscher modelo UP400S) por 3 minutos, empregando sonotrodo de 22 mm de diâmetro e potência do ultrassom de 200 W, para completa suspensão das partículas. A suspensão foi adicionada à solução de CMQ/PVA e mantida sob agitação por 2 horas, para completa homogeneização.

Na etapa subsequente, as suspensões foram submetidas a tratamento em banho ultrassônico por 10 min para remoção de bolhas e, em seguida, vertidas em placas de petri de 8,5 cm de diâmetro, para obter altura fixa de $\approx 0,5$ cm. Para efeito de comparação com as amostras reticuladas com genipina, as placas de petri foram deixadas em repouso por 24 horas, sendo em seguida congeladas a - 80 °C (Ultra Low Temperature Freezer, modelo U410 premium, New Brunswick) e liofilizadas (Liotop L101, Liobrás). As membranas liofilizadas foram lavadas com álcool etílico e posteriormente com água destilada para remover o excesso de álcool e nanopartículas. Após a lavagem, as membranas foram novamente congeladas, liofilizadas e identificadas conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação das membranas conforme a proporção mássica CMQ/PVA e quantidade de nanopartículas adicionadas.

Amostra	CMQ (%)	PVA (%)	ZnO (%)	TiO ₂ (%)
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅	25	75	0	0
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _1ZnO	25	75	1	0
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _2,5ZnO	25	75	2,5	0
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _5ZnO	25	75	5	0
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _1TiO ₂	25	75	0	1
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _2,5TiO ₂	25	75	0	2,5
(CMQ/PVA) ₂₅₋₇₅ _5TiO ₂	25	75	0	5

3.6 Caracterizações

3.6.1 Caracterização estrutural dos polímeros

3.6.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Quitina, quitosana e CMQ foram analisadas quanto a suas estruturas através de análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Para isto, a amostra de carboximetilquitosana que foi obtida na forma sódica (CMQNa) foi convertida à forma ácida (CMQH), conforme descrito anteriormente. As amostras dos polímeros foram previamente secas em estufa a 30 °C por 12 h e pulverizadas com KBr grau espectroscópico na proporção de 1/100 (m/m). As misturas resultantes foram prensadas em formato de pastilhas e secas em estufa a 30 °C por 24 h. A análise de todas as amostras foi realizada em espectrofotômetro de infravermelho BOMEN modelo MB-102 com transformada de Fourier na região espectral 4000 - 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e acúmulo de 32 varreduras.

3.6.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Aproximadamente 10 mg de amostra de quitosana DAIUS (ou carboximetilquitosana) foram solubilizados em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v). Após solubilização do polímero, a solução obtida foi transferida para o tubo de ressonância magnética. Os espectros de RMN ¹H foram adquiridos em espectrômetro modelo 400/54 Premiun Shielded (Marca Agilent Technologies) empregando sequência de pulsos de supressão “ZGCPPR” a 80°C, aquisição de 32 varreduras e o tempo de relaxação de 7 segundos. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm). O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) de quitosana foi calculado pela Equação 1 (DESBRIÈRES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996).

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

Sendo I_{CH3} a área dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido e I_{H2-H6} a área dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C(2) a C(6) do anel glicopiranosídico.

3.6.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

Para a aquisição do espectro de RMN ^{13}C quantitativo, aproximadamente 300 mg da amostra de carboximetilquitosana (CMQ) foram dissolvidos em 300 mL de água destilada e a solução resultante foi submetida a tratamento de ultrassom empregando o dispositivo ultrassônico Hielscher modelo UP400S visando à despolimerização da amostra. Para isso, o sonotrodo de 22 mm de diâmetro foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na solução de CMQ, contida em reator de vidro encamisado disposto no interior da caixa de isolamento acústico, que foi mantida sob agitação magnética constante a 25 °C e potência do ultrassom de 200 W durante 7 horas. A amostra resultante foi purificada conforme foi descrito no item 3.3. Em seguida, a amostra seca foi dispersa em 3,0 mL de D_2O e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 24 horas, resultando em solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado ($\phi = 5\text{mm}$) e o espectro foi adquirido, a 80°C, com acúmulo de aproximadamente 40.000 pulsos e tempo de relaxação de 7 segundos.

Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e grau médio de substituição ($\overline{GS}$) de carboximetilquitosana foram determinados a partir da deconvolução e integração dos sinais de acordo com a literatura (RINAUDO et al., 1992). A deconvolução foi realizada utilizando o software MagicPlot (versão 2.5.1, ano 2013).

3.6.2 Caracterizações Físico-Químicas

3.6.2.1 Viscosidade Intrínseca

Para a determinação da viscosidade intrínseca da quitosana DAIUS, aproximadamente 15 mg de amostra (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 24 h) foram suspensos em 25 mL de solução de ácido acético 0,6 mol L^{-1} sob agitação magnética constante durante 24 horas. Em seguida foram adicionados 25 mL de acetato de sódio 0,4 mol L^{-1} e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva através de membranas com diâmetros médios dos poros de 0,45 μm (Millipore – White SCWP). Alíquota de 15 mL da solução foi transferida para viscosímetro capilar de vidro (do tipo *Ubbelohde*, $\phi = 0,53\text{ mm}$) e as medidas de tempo de escoamento foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ em viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal

(SCHOTT). As medidas do tempo de escoamento foram realizadas empregando tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH = 4,5) para as sucessivas diluições.

Para a determinação da viscosidade intrínseca de carboximetilquitosana (CMQ), aproximadamente 10 mg de amostra foram suspensos em 25 mL de água destilada e a suspensão foi mantida sob agitação magnética constante por 24 horas, em seguida foram adicionados 25 ml de solução de NaCl 0,2 mol L⁻¹ e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução foi filtrada sob pressão positiva através de membranas com diâmetros médios dos poros de 0,45 µm (Millipore – White SCWP). Aliquota de 15 mL da solução foi transferida para viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, φ= 0,53 mm) e as medidas de tempo de escoamento foram realizadas a 30,00 ± 0,01 °C em viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT).

Assim, as viscosidades intrínsecas ([η]) da quitosana DAIUS e da amostra de carboximetilquitosana (CMQ) foram determinadas a partir da extrapolação à diluição infinita das respectivas curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração, e as massas moleculares médias viscosimétricas ($\overline{Mv}$) foram calculadas de acordo com as respectivas equações de Mark-Houwink. Os valores dos parâmetros da equação de Mark-Houwink ([η]= KMv^α) utilizados foram K' = 7,92 x 10⁻⁶ e 7,4 x 10⁻⁶ e α= 1,00 e 0,76 para as amostras de N,O-carboximetilquitosana (GE; LUO, 2005) e quitosana (KASAAI, 2007), respectivamente.

Foram calculados os graus médios de polimerização viscosimétrica ($\overline{GP_v}$) das amostras de quitosana DAIUS (Q) e carboximetilquitosana (CMQ) empregando as Equações 2 e 3, respectivamente.

$$\overline{GP_v}(Q) = \frac{(Mv*100)}{(161*GD)+(203*GA)} \quad (2)$$

$$\overline{GP_v}(CMQ) = \frac{(Mv*100)}{(161*GD)+(203*GA)+(80*GS)} \quad (3)$$

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

As membranas foram previamente secas em estufa a 30 °C por 12 h. Para as análises de infravermelho foi utilizado o espectrômetro de infravermelho ATR/FTIR Spectrum 400 Perkin Elmer, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram obtidos na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras.

3.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das superfícies e seções transversais das membranas foram analisadas empregando microscópio eletrônico de varredura digital modelo ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060). Para análise da superfície, as membranas foram cortadas na dimensão de 5 x 5 mm². Para a análise de fratura, a membrana foi intumescida em água, congelada em nitrogênio líquido e fraturada com o auxílio de um bisturi. As amostras foram colocadas sobre fita adesiva de carbono em porta amostra de alumínio e recobertas com fina camada de ouro empregando metalizadora Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein). Nestas análises a corrente de feixe utilizada foi de 2,82 A e a potência do feixe de 20 kV.

3.6.2.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Análise de Energia Dispersiva (EDS) das membranas com nanopartículas de ZnO ou TiO₂ foram realizadas em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 300), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133eV a 5,9 keV e área de 10 mm², acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, England). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, *dead time* de 30 %, corrente de 2,82 A e I probe de 2,5 nA. A área da amostra analisada foi de 38,4 mm².

3.6.2.5 Porosidade

A porosidade das membranas foi determinada empregando método de deslocamento de líquidos (IKEDA et al., 2014; LI et al., 2015), 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 cm x 1 cm, secas, pesadas e imersas em 10 mL de etanol, sendo então submetidas à 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 o excesso de líquido removido com o auxílio de papel toalha, e pesadas novamente. A porosidade das membranas foi então estimada empregando a Equação 4.

$$P(\%) = \frac{m_f - m_0}{\rho * v} * 100 \quad (4)$$

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.

3.6.2.6 Capacidade de Hidratação

Visando a determinação da capacidade de hidratação das membranas, as mesmas foram cortadas em quadrados de dimensões de 1 cm x 1 cm, secas, pesadas e imersas em solução de tampão fosfato salino (PBS) (pH = 7,4) a 37 °C por diferentes períodos no intervalo 1 – 1200 s. No tempo desejado as membranas foram retiradas do tampão, 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 às capacidades de hidratação dos materiais, conforme Equação 5.

$$CH(\%) = \frac{m_h - m_0}{m_0} * 100 \quad (5)$$

sendo: CH a capacidade de hidratação em porcentagem; m_h a massa da membrana hidratada (mg) e m_0 a massa inicial da membrana (mg).

3.6.2.7 Análise Termogravimétrica

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada empregando equipamento TGA-50 (Shimadzu). Aproximadamente 8 mg de amostra previamente seca a 30 °C por 24 horas foram colocados em porta-amostra de platina e aquecidos de 25 a 700 °C à razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹.

3.6.3 Análises Mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas secas foram avaliadas através de análise dinâmico-mecânica no modo de tração, empregando equipamento TA instruments DMA Q800 utilizando uma garra do tipo *Tension film*. As amostras foram cortadas em formato retangular, com dimensões 30 mm x 6,4 mm. O teste foi realizado com espaço entre garras de 15 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 (%).

3.6.4 Degradação enzimática

A suscetibilidade à degradação enzimática das membranas foi avaliada por imersão das mesmas em tampão fosfato estéril (pH=7,4), contendo 5.500 unidades de lisozima/mL de solução. A concentração de lisozima empregada corresponde ao valor médio da concentração dessa enzima presente no exsudato (BUCHAN et al., 1981). As membranas foram cortadas na dimensão de 1 cm x 1 cm, pesadas, imersas em 5 mL de tampão fosfato contendo lisozima e mantidas a 37 °C em câmara incubadora (MARCONI M410). Após período de 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h os corpos de prova foram removidos da solução, lavados com água deionizada, congelados e liofilizados a -45 °C por 48 h em liofilizador LIOTOP, modelo L101. Depois de liofilizadas, as amostras foram pesadas e o percentual de degradação das membranas foi calculado com base na razão entre os valores das massas das amostras antes e após o ensaio. As análises foram realizadas em triplicata e para cada condição avaliada foi executado ensaio controle, também em triplicata, que correspondeu à exposição das membranas somente ao tampão fosfato.

3.6.5 Citotoxicidade

Os ensaios de viabilidade celular de fibroblastos na presença das membranas foram realizados empregando método colorimétrico utilizando um sal de tetrazol, o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (JITHENDRA et al., 2013). Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED), localizada no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) sob coordenação do professor Dr. Andrei Leitão.

A linhagem de células de fibroblastos utilizada foi Balb/C 3T3 clone A 31, cultivada em meio DMEM suplementado com 10% FBS e 1% de solução penicilina/estreptomicina, mantida em uma estufa a 37 °C, 90% de umidade e atmosfera a 5% CO₂. As células foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 3x10⁵ células/mL e incubadas por 24 horas. As membranas foram então adicionadas ao meio e o sistema foi incubado por 72 horas. Após o tempo de incubação adicionou-se o corante MTT (5 mg/mL) e o sistema foi incubado novamente por 3 horas. Para solubilizar os cristais de formazan foi adicionado agente solubilizante constituído por 10% (m/v) de SDS e 0,6% (v/v) de ácido acético glacial em DMSO e incubado por uma hora. A solução resultante foi levada ao espectrofotômetro Biotek Synergy HT em que foi feita leitura de absorbância em 570 nm.

A esterilização das membranas foi realizada previamente aos ensaios, onde as mesmas foram incubadas 24 horas em álcool 70%. As células de mamíferos foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Além disso, utilizou-se o meio de cultura sem adição de membranas como controle negativo de morte celular, em que considerou-se 100 % de viabilidade celular. Já o látex foi usado como controle positivo de morte celular e produziu valores de viabilidade celular considerados insignificantes (SILVA et al., 2008).

Capítulo 3 – Quitosana, CMQ e Membranas CMQ/PVA com e sem reticulação com genipina

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterizações dos polímeros

As amostras de quitina, quitosana e CMQ foram caracterizadas quanto a suas estruturas, sendo submetidas à análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Além disso, para determinação do grau de desacetilação ($\overline{GD}$) das amostras de quitosana e CMQ e grau de substituição, ($\overline{GS}$) da CMQ, estas foram submetidas à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C). Além disso, os polímeros foram avaliados quanto à viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica. A discussão destas análises são desenvolvidas a seguir.

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As bandas de estiramento axial de O-H e de N-H são observadas nos espectros de beta-quitina e de quitosana DAIUS (Figura 8) no intervalo 3550 cm^{-1} - 3480 cm^{-1} e próxima de 3280 cm^{-1} , respectivamente. Entretanto, a banda relativa à deformação axial de N-H é menos nítida no espectro de quitosana devido à sobreposição da intensa e larga banda de O-H. Também foram observadas as seguintes bandas características de beta-quitina e quitosana: *i*) em 2950 cm^{-1} e 2885 cm^{-1} referentes às deformações axiais de C-H; *ii*) em 1660 cm^{-1} relativa à deformação axial de C = O de amida I; *iii*) em 1560 cm^{-1} , de deformação angular de N-H, sendo menos intensa e menos definida no espectro de quitosana em relação à beta-quitina, devido ao processo de desacetilação; *iv*) em 1375 cm^{-1} , de deformação angular simétrica de CH_3 ; *v*) em 1425 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} relacionadas às deformações axiais de C-N de amida e amino, respectivamente (CAMPANA-FILHO et al., 2007; SANTOS et al., 2003).

No espectro de CMQH, a forma ácida de CMQ, a banda característica de deformação axial do grupo carboxila é observada em 1740 cm^{-1} , enquanto aquelas observadas em 1635 cm^{-1} e 1407 cm^{-1} são características de deformações axiais simétricas e assimétricas de carboxilato, respectivamente. A presença dessas bandas confirma que carboximetilação de quitosana foi bem sucedida (ZHENG et al., 2011), sendo que evidências semelhantes foram observadas por Ghaee et al. (2010), Vaghani, Patel e Satish (2012) e Farag e Mohamed (2012).

Figura 8 - Espectros no infravermelho de beta-quitina, quitosana DAIUS e carboximetilquitosana na forma ácida (CMQH).

4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A análise do espectro de RMN ^1H da amostra de quitosana DAIUS (Figura 9), foi realizada a fim de identificar as características estruturais da amostra, além de permitir a determinação do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$).

Figura 9 - Espectro de ^1H RMN de (a) quitosana DAIUS e (b) *N,O*-carboximetilquitosana (CMQ).

O espectro da quitosana DAIUS (Figura 9a) exibe um singlete centrado em 2,0 ppm, característico dos hidrogênios metílicos de unidades GlcNAc; sinal em 3,15 ppm, o qual está relacionado ao hidrogênio ligado ao carbono 2 da unidade GlcN; sinais sobrepostos na região entre 3,3-4,0 ppm, correspondendo aos hidrogênios H3-H6 de GlcN e o hidrogênio ligado ao C2 da unidade GlcNAc. Os sinais em 4,90 ppm e 4,55 ppm são atribuídos aos hidrogênios H1 e H1' ligados ao carbono anomérico C1, referentes às unidades GlcN e GlcNAc, respectivamente. A partir do espectro de RMN ^1H da quitosana e da Equação 1, foi possível determinar o valor do grau médio de desacetilação da quitosana DAIUS, sendo $\overline{GD} \approx 63\%$.

As alterações estruturais decorrentes do processo de carboximetilação da quitosana também foram evidenciadas pela análise do espectro de RMN ^1H da amostra *N,O*-CMQ (Figura 9b). O espectro da *N,O*-CMQ apresenta pico em 2,00 ppm, referente aos hidrogênios metílicos do grupo $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$; na região entre 3,10 - 3,27 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao C(2); na região 3,28 - 3,38 ppm, referentes aos hidrogênios dos grupos $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOD}$; na região entre 3,45 - 4,15 referentes aos hidrogênios ligados aos C(3) a C(6) do anel de glicopirranose; na região entre 4,15 - 4,75 ppm, referentes aos hidrogênios dos grupos $-\text{O}-\text{CH}_2-$

COOD ligados ao C(3) e C(6) do anel glicopirranose (CHEN; PARK, 2003; HJERDE et al., 1997).

A partir do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono da amostra de carboximetilquitosana (Figura 10) foi possível determinar o grau médio de substituição ($\overline{GS}$) de CMQ, além da posição de substituição (*N*- ou *O*-substituição) ao longo das cadeias poliméricas.

Foram observados e atribuídos de acordo com a literatura (RINAUDO et al., 1992; UPADHYAYA et al., 2013) os seguintes sinais: *i*) em 180 – 172 ppm, correspondente ao grupo –COOH; *ii*) em 104 – 99 ppm que correspondem ao C1; *iii*) em 57 – 54 ppm correspondente ao C2; *iv*) em 81 – 72 ppm que correspondem aos C3, C4 e C5; *v*) em 52, 70 e 71 ppm que se referem aos carbonos –CH₂– do grupo carboximeta nas posições *N*-, 3-*O*- e 6-*O*-, respectivamente.

Figura 10 - Espectro de RMN ¹³C de carboximetilquitosana na forma sódica (CMQNa).

Através de deconvolução e integração dos sinais referentes ao C1, foi possível a determinação do valor de grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) $\approx$ 70 %. Foi observado que houve desacetilação em baixa extensão da quitosana durante o processo de carboximetilação, o que pode ser justificado pelo meio reacional em que ocorre a carboximetilação ser alcalino, o mesmo meio empregado no processo de desacetilação (RINAUDO et al., 1992).

Integrando-se os picos correspondentes aos sinais de *O*- e *N*-substituição, obteve-se GS $\approx$ 1,1, correspondente a GS(*O*6) $\approx$ 0,6, GS(*O*3) $\approx$ 0,4 e GS(*N*) $\approx$ 0,1. De acordo com esses

resultados, as condições empregadas na reação de carboximetilação de quitosana DAIUS resultaram, predominantemente, em *O*-substituição, sendo que a maior substituição em C6 é justificada pela maior reatividade da hidroxila primária (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005; LE DUNG et al., 2005; RINAUDO et al., 1992). Resultados similares de distribuição dos grupos carboximetila ao longo das cadeias de CMQ foram reportados por Cerrutti et al. (2012), Chen e Park (2003), Mourya, Inamdar e Tiwari (2010) e Fiamingo e Campana-Filho (2016).

4.1.3 Viscosidade Intrínseca

Foram realizadas medidas de viscosidade para a determinação de viscosidade intrínseca da quitosana DAIUS e carboximetilquitosana. As massas moleculares médias viscosimétricas ($\overline{Mv}$) dos polímeros foram calculadas de acordo com as respectivas equações de Mark-Houwink. Os valores das viscosidades intrínsecas, massas moleculares médias viscosimétrica e graus médios de polimerização viscosimétrica ($\overline{GP}$) da quitosana DAIUS e da carboximetilquitosana (CMQ) estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Viscosidades intrínsecas ($[\eta]$), massas moleculares médias viscosimétrica ($\overline{Mv}$) e graus médios de polimerização viscosimétrica ($\overline{GP}$) de quitosana DAIUS e carboximetilquitosana (CMQ).

Amostra	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	$\overline{Mv}$ (g mol ⁻¹) (x10 ⁵)	$\overline{GP}$
Quitosana DAIUS	2713 ± 49	10,3 ± 0,4	6000 ± 3,6
CMQ	1201 ± 52	1,51 ± 0,06	800 ± 4,3

Conforme os dados da Tabela 4, a viscosidade intrínseca da amostra de CMQ é consideravelmente menor que aquela da quitosana DAIUS, porém resultaram de medidas viscosimétricas empregando diferentes solventes. De fato, CMQ não é solúvel no tampão ácido acético/acetato de sódio (pH = 4,5) que é empregado como solvente para a quitosana, enquanto que quitosana não é solúvel em solução de NaCl 0,2 mol L⁻¹, solvente empregado no caso de CMQ. Além disso, a força iônica do solvente afeta a conformação das cadeias poliméricas e, por consequência, a viscosidade intrínseca (MIRANDA et al., 2003).

Assim, embora a comparação dos graus médios de polimerização da quitosana DAIUS e de CMQ (Tabela 4) indique a ocorrência de severa despolimerização durante a carboximetilação de quitosana, esses resultados devem ser analisados com reservas, mesmo considerando que outros trabalhos relatam dados semelhantes e atribuam a despolimerização ao emprego de meio fortemente alcalino na carboximetilação (CERRUTTI et al., 2012; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

É necessário ainda considerar que Rinaudo, Milas e Dung, Le (1993) observaram que os parâmetros empregados para determinar a massa molecular média de quitosana a partir da viscosidade intrínseca do polímero são fortemente afetados pelo grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) da quitosana. Portanto, é necessário empregar diferentes valores das constantes K e α de acordo com o valor de $\overline{GA}$ da quitosana analisada. Entretanto, a literatura não registra qualquer estudo que determine os efeitos de $\overline{GA}$ e de $\overline{GS}$ de carboximetilquitosana sobre os valores de K e α , o que gera muitas incertezas em relação à adequação dos parâmetros empregados para a determinação da massa molecular viscosimétrica média de CMQ.

4.2 Caracterizações físico-químicas das membranas

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

A comparação dos espectros no infravermelho de membranas de carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico) não-reticuladas e reticuladas com genipina (Figura 11a-b) não permite distinguir bandas que evidenciem a ocorrência de reticulação, independentemente da composição, provavelmente devido ao baixo grau de reticulação, mas foi observado que, diferentemente dos polímeros de partida, as membranas reticuladas foram insolúveis em água, indicando a ocorrência de reticulação. De fato, Zhao *et al.* (2003) também não observaram diferenças significativas nos espectros de CMQ e PVA antes e depois da reticulação com genipina.

Figura 11 - (a) Espectros de FTIR-ATR das membranas R(CMQ) (1); R(CMQ/PVA)_{50/50} (2); CMQ (3); (CMQ/PVA)_{50/50} (4) e PVA (5). (b) Espectros ampliados no intervalo 1750 cm⁻¹ - 800 cm⁻¹.

No espectro da membrana composta apenas por CMQ, (espectro 3 nas Figuras 11a-b), são observadas as mesmas bandas típicas da CMQ. Porém, a comparação dos espectros das membranas CMQ e R(CMQ) (espectros 1 e 3 nas Figuras 11a-b) não revela a presença de bandas características de reticulação, provavelmente devido ao baixo grau de reticulação, como já comentado.

O espectro da membrana contendo apenas PVA (espectro 5 das Figuras 11a-b), apresenta as seguintes bandas características de PVA: *i*) em 3500-3100 cm⁻¹, relacionada ao estiramento O-H das ligações hidrogênio intermoleculares e intramoleculares; *ii*) no intervalo

2980-2820 cm^{-1} , correspondente aos estiramentos C-H dos grupos alquila; *iii*) no intervalo 1190-1160 cm^{-1} , referentes aos estiramentos de C-O dos grupos acetatos remanescentes do PVA (FARAG; MOHAMED, 2012).

Nos espectros das amostras R(CMQ/PVA)_{50/50} (espectro 2, Figura 11a-b) e (CMQ/PVA)_{50/50} (espectro 4, Figura 11a-b) também não são observadas evidências da reticulação, mas é possível observar que há bandas oriundas dos dois polímeros, como aquelas em 1640 cm^{-1} e 1190 cm^{-1} , que são características do PVA, e em 1570 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} e 1055 cm^{-1} , que são atribuídas à CMQ (BISPO et al., 2010; SHALUMON et al., 2009; TANG et al., 2010).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As morfologias das superfícies e das seções transversais das membranas estão 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 (Figura 12) e que se apresentam interligados (Figura 13). O aumento da concentração de PVA nas membranas resultou em matrizes mais densas e homogêneas, com poros aparentes de menores diâmetros e em cujas superfícies são observadas estruturas lamelares. A reticulação com genipina também provocou a aparente redução do diâmetro médio dos poros, o que é mais nitidamente observado no caso da composição R(CMQ/PVA)_{75/25}, embora efeito contrário seja observado no caso da composição R(CMQ/PVA)_{25/75}.

A estrutura porosa apresentada é consequência do processo de liofilização, o qual cria poros interconectados que apresentam grande área superficial. Essas características são interessantes do ponto de vista de aplicação destes materiais como curativos pelo fato de facilitarem a passagem de nutrientes e oxigênio para a superfície lesionada, além de auxiliarem no processo de regeneração tecidual, facilitando a nutrição e proliferação celular, e no processo de migração para vascularização e formação do novo tecido (BERRETTA; BUMGARDNER; JENNINGS, 2016; LIANG et al., 2016).

Figura 12 - Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície com ampliação de 100 vezes: (a) CMQ; (b) R(CMQ); (c) (CMQ/PVA)₇₅₋₂₅; (d) R(CMQ/PVA)₇₅₋₂₅; (e) (CMQ/PVA)₅₀₋₅₀; (f) R(CMQ/PVA)₅₀₋₅₀; (g) (CMQ/PVA)₂₅₋₇₅; (h) R(CMQ/PVA)₂₅₋₇₅; (i) PVA.

Figura 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura do corte transversal com ampliação de 250 vezes: (a) CMQ; (b) R(CMQ); (c) (CMQ/PVA)₇₅₋₂₅; (d) R(CMQ/PVA)₇₅₋₂₅; (e) (CMQ/PVA)₅₀₋₅₀; (f) R(CMQ/PVA)₅₀₋₅₀; (g) (CMQ/PVA)₂₅₋₇₅; (h) R(CMQ/PVA)₂₅₋₇₅; (i) PVA.

4.2.3 Porosidade

Durante o processo de congelamento da solução polimérica, cristais de água são formados e expandidos na solução, portanto, a cadeia polimérica se concentra na interface entre os cristais de gelo e a solução e se alinha ao longo da direção de crescimento dos cristais de gelo até o completo congelamento da solução. A remoção dos cristais de gelo por sublimação leva ao aparecimento de espaços, ou poros, criando uma arquitetura semelhante à uma esponja, com cadeias poliméricas interconectadas entre si. Estes poros criam uma grande área superficial, gerando vazios no interior e na superfície das membranas, os quais auxiliam no processo de regeneração tecidual (BERRETTA; BUMGARDNER; JENNINGS, 2016; WANG et al., 2017).

No presente trabalho o método de deslocamento de líquido foi empregado para estimar a porosidade das membranas e os valores obtidos estão apresentados na Figura 14. A membrana composta apenas por poli (álcool vinílico) apresentou valor de porosidade $72,5 \pm 2,8$ %. Todas as outras membranas também apresentaram elevada porosidade, com valores variando no intervalo $68,3 \pm 2,5$ - $88,4 \pm 0,1$ %, sendo possível observar que o incremento de PVA, com exceção da amostra (CMQ/PVA)_{50/50}, não levou a variações significativas no valor da porosidade das amostras. Foi observado ainda que a reticulação com genipina resultou em aumento da porosidade nas membranas R(CMQ/PVA)_{75/25} e R(CMQ/PVA)_{25/75}, entretanto, a reticulação não afetou a porosidade da membrana preparada exclusivamente com CMQ nem a amostra R(CMQ/PVA)_{50/50}. De maneira geral, esses resultados corroboram as análises da morfologia das membranas discutidas no item anterior.

Figura 14 – Valores médios da porosidade das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.

Valores de porosidade aparente similares foram relatados por Lee e Kamarul (2014), que produziram membranas de *N,O*-CMQ, PVA e polietilenoglicol (PEG) empregando metodologia semelhante àquela utilizada neste trabalho, resultando em materiais com elevada porosidade ($\approx 87\%$). Também, Zhao *et al.* (2015) obtiveram membranas de carboximetilquitina reticuladas com genipina que apresentaram elevada porosidade ($> 90\%$). No trabalho relatado por Agarwal, Alam e Gupta (2013), o emprego de liofilização na produção de membranas de PVA, carboximetilcelulose e poli (óxido de etileno) (PEO) também resultou em materiais com elevada porosidade ($89\% - 92\%$). Entretanto, conforme relatado por Chen *et al.* (2013), o borbulhamento de CO_2 seguido de liofilização levou à produção de membranas de quitosana e PVA com baixa porosidade ($\approx 50\%$).

A porosidade é uma das propriedades mais importantes dos materiais empregados como curativos, sendo que porosidade elevada permite eficientes trocas de nutrientes e de gases, e facilita o controle do equilíbrio de umidade no leito da ferida, prevenindo a ocorrência de infecções (IKEDA *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2016; SUDHEESH KUMAR *et al.*, 2012). Assim, conforme discussão apresentada acima, os materiais obtidos no presente estudo apresentaram porosidade adequada para serem utilizados como curativos.

4.2.4 Capacidade de Hidratação

Os curativos devem proporcionar equilíbrio de umidade na região da ferida pois, diferentemente do ambiente seco, 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 (crescimento de novos vasos sanguíneos) e auxiliar na remoção de tecido morto. Outro ponto a ser considerado é que o curativo deve ser capaz de absorver o excesso de exsudados e substâncias citotóxicas (FIELD; KERSTEIN, 1994).

Diante disso, as membranas CMQ/PVA foram avaliadas quanto à capacidade de hidratação (Figuras 15e 16). A amostra CMQ não foi analisada pelo fato de ser completamente solúvel em meio aquoso, mas a reticulação com genipina resultou em insolubilidade e, assim, a amostra R(CMQ) apresentou elevada capacidade de hidratação (1700 ± 160 %). Além disso, as amostras (CMQ/PVA)_{75/25} e (CMQ/PVA)_{50/50} solubilizaram após os primeiros 150 segundos e portanto não foi possível a continuação da análise. Foi observado que todas as outras membranas foram estáveis em tampão e atingiram a máxima capacidade de hidratação em aproximadamente 150 segundos (Figura 15).

Figura 15 - Capacidade de hidratação das membranas de CMQ/PVA (a) não-reticuladas e (b) reticuladas com genipina.

As membranas contendo elevada proporção de carboximetilquitosana, a saber as amostras (CMQ/PVA)_{75/25} e (CMQ/PVA)_{50/50}, apresentaram as capacidades de hidratação mais elevadas (≈ 2400 % - 2500 %) após 150 segundos de imersão no tampão PBS (Figura 16). De maneira geral, a reticulação com genipina resultou em menores capacidades de hidratação, efeito que também foi observado com a redução da proporção de carboximetilquitosana.

Figura 16 - Capacidade de hidratação no equilíbrio das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.

Assim, a menor capacidade de hidratação é atribuída à diminuição do caráter hidrofílico das membranas causado pela diminuição da quantidade CMQ com a incorporação do PVA, pois a CMQ é altamente hidrofílica, uma vez que possui, além do grupo OH (comum aos dois polímeros), os grupos hidrofílicos amina e carboxilato. Outro fator que diminui a hidrofilicidade do material é a reticulação com genipina, pois gera uma matriz mais rígida, reduzindo então a mobilidade das cadeias poliméricas além de que a reação de reticulação consome grupos amina que estariam disponíveis para interagir com a água (LI et al., 2009; LIU et al., 2015; MOHAMED; ELELLA; SABAA, 2015; SABAA et al., 2012; SHEN; RUAN; GAO, 2009; WANG et al., 2007).

Resultados semelhantes foram obtidos por Wang *et al.* (2007) que, ao produzir filmes por *casting* contendo diferentes proporções de CMQ e PVA, observaram que a capacidade de hidratação dos filmes era tanto maior quanto maior a proporção de CMQ. Lee e Kamarul (2014) observaram que o acréscimo de *N,O*-CMQ à membrana de PVA e PEG levou ao aumento considerável na capacidade de hidratação da membrana. Também, Jaikumar et al. (2015) observaram que a adição de *O*-CMQ ou PVA em géis de alginato de sódio resultou em capacidade de hidratação significativamente maior, principalmente no caso da adição de *O*-CMQ.

Por outro lado, Mohamed, Elella e Sabaa (2015) observaram que a reticulação do polímero com glutaraldeído, levou à diminuição da capacidade de hidratação de seus hidrogéis, da mesma forma como Fiamingo e Campana-Filho (2016) ao produzirem membranas de CMQ

reticuladas com genipina observaram que quanto maior o grau de reticulação, menor é a capacidade de hidratação da membrana.

4.2.5 Análise Termogravimétrica

Nas curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivativa (DTG) das membranas (Figura 17) pode ser observada a ocorrência de dois eventos térmicos principais no intervalo 25 °C – 400 °C. O primeiro evento ocorre no intervalo 25 °C – 180 °C e está relacionado à eliminação de água adsorvida nas membranas, sendo que as perdas de massa são mais importantes nos casos das membranas ricas em CMQ, independentemente da realização ou não de reticulação com genipina (Tabela 5), o que é atribuído ao caráter hidrofílico conferido pelos grupos carboxilato de sódio presentes nas cadeias de CMQ.

Figura 17 - Curvas de TG das membranas de CMQ/PVA (a) não reticuladas e (c) reticuladas com genipina e DTG das membranas de CMQ/PVA (b) não reticuladas e (d) reticuladas com genipina.

O segundo evento ocorre no intervalo 140 °C – 436 °C e registra maiores perdas de massa quando comparado ao primeiro estágio (Tabela 5), pois corresponde à eliminação de compostos voláteis que são originados da degradação dos polímeros presentes nas membranas, e envolve a decomposição de grupos substituintes de CMQ e início da degradação do PVA,

havendo principalmente formação de produtos voláteis (LEWANDOWSKA, 2009; THOMAS et al., 2001).

Tabela 5 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas de CMQ/PVA reticuladas e não reticuladas com genipina.

Amostra	Estágio 1		Estágio 2			Resíduo de carbonização (%)
	Intervalo (°C)	Perda de massa (%)	Intervalo (°C)	T _{onset} (°C)	Perda de massa (%)	
CMQ	25 - 136	18	140 - 404	264	36	31
(CMQ/PVA) _{75/25}	25 - 135	13	156 - 436	250	55	23
(CMQ/PVA) _{50/50}	25 - 129	12	175 - 402	274	56	20
(CMQ/PVA) _{25/75}	25 - 120	9	170 - 409	280	65	14
PVA	25 - 173	6	200 - 400	261	76	5
R(CMQ)	25 - 154	18	154 - 400	243	42	27
R(CMQ/PVA) _{75/25}	25 - 142	17	176 - 388	263	47	22
R(CMQ/PVA) _{50/50}	25 - 124	15	205 - 370	272	53	20
R(CMQ/PVA) _{25/75}	25 - 115	9	193 - 376	266	59	17

Os dados experimentais (Figura 17 e Tabela 5) também mostram que a membrana PVA é aquela que apresenta a maior perda de massa no segundo estágio de degradação, enquanto a membrana CMQ é a que possui a menor perda de massa. Também, independentemente da execução de reticulação com genipina, as membranas contendo PVA apresentam perdas de massa mais elevadas quanto maior o teor de PVA.

Quanto à estabilidade térmica, é observado que teores elevados de PVA ($\geq 50\%$) conferem maior estabilidade térmica às membranas (Tabela 5). Tendência similar é observada nos casos das membranas reticuladas com genipina, sendo também verificado que, de maneira geral, a reticulação resultou em materiais ligeiramente mais estáveis termicamente.

As curvas TG/DTG mostram também que, independentemente da composição das membranas e da execução de reticulação com genipina, a oxidação e decomposição dos resíduos gerados no segundo evento ocorrem em temperaturas mais elevadas ($> 400\text{ }^{\circ}\text{C}$), em um terceiro estágio (THOMAS et al., 2001) gerando maiores teores de resíduos quanto maior a proporção de CMQ, fato atribuído à presença dos contra-íons sódio dos grupos carboxilato (LEWANDOWSKA, 2009).

4.3 Análises Mecânicas

Membranas empregadas como curativos devem apresentar propriedades mecânicas adequadas para resistir às tensões decorrentes da sua manipulação e dos movimentos do paciente, especialmente quando aplicadas próximo às juntas, além de fornecerem suporte físico

para a regeneração do tecido (IKEDA et al., 2014; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014). Foram realizados ensaios mecânicos nas membranas no estado seco com o intuito de avaliar a influência do acréscimo de PVA e da reticulação com genipina na tensão na ruptura (TS), alongamento máximo (A) e módulo de elasticidade (ME), sendo os seus valores médios apresentados na Figura 18.

Figura 18 - (a) Valores de módulo de tensão na ruptura; (b) porcentagem de alongamento e (c) elasticidade das membranas de CMQ/PVA não-reticuladas e reticuladas com genipina.

Quanto à tensão na ruptura (TS), é observado que, nos casos das membranas não-reticuladas (Figura 18a), a presença de PVA resultou em expressivo decréscimo de TS, *i. e.* tornou-as menos resistentes quando comparadas à membrana contendo apenas CMQ, exceto quando a proporção de PVA atingiu 75 %. De fato, a tensão na ruptura da membrana não-reticulada (CMQ/PVA)_{25/75} é mais elevada que a da membrana CMQ e comparável àquela da membrana contendo apenas PVA.

A reticulação com genipina resultou em expressivo aumento da resistência mecânica da membrana CMQ, mas teve pouco efeito sobre a tensão na ruptura das membranas contendo PVA, exceto no caso da membrana (CMQ/PVA)_{25/75}, que se mostrou menos resistente após a reticulação. Assim, esses resultados mostram que as interações entre as cadeias de CMQ e PVA

somente são favorecidas e resultam em membrana mais resistente do que aquela contendo apenas CMQ no caso da membrana que contém elevado teor de PVA.

Tais resultados também sugerem que a reticulação com genipina envolve apenas as cadeias de CMQ, sendo que a perda de resistência mecânica após a reticulação nos casos das membranas contendo elevados teores de PVA pode ser atribuída à separação de fases, *i. e.* à formação de redes poliméricas distintas quanto aos teores de CMQ e PVA, resultando em interações mais fracas entre as cadeias de CMQ e PVA e em perda de resistência mecânica.

A Figura 18b mostra os valores de alongamento das membranas. Foi observado que, dentre todas as composições estudadas, a membrana formada apenas por carboximetilquitosana (CMQ) apresentou maior alongamento ($9,12 \pm 0,62$ %). A adição de PVA resultou no decréscimo do alongamento das membranas não-reticuladas quando comparadas à membrana contendo apenas CMQ. A membrana (CMQ/PVA)_{25/75} exibiu o menor alongamento ($5,38 \pm 0,33$ %), mas não foram observadas diferenças significativas entre as membranas (CMQ/PVA)_{75/25} ($6,43 \pm 0,42$ %), (CMQ/PVA)_{50/50} ($6,70 \pm 0,50$ %) e PVA ($6,94 \pm 0,39$ %).

As membranas reticuladas com genipina exibiram alongamentos significativamente inferiores quando comparadas às membranas não-reticuladas, principalmente nos casos das membranas contendo maiores teores de CMQ. Esse comportamento pode ser atribuído à maior rigidez da rede polimérica resultante da reticulação com genipina que, como já comentado, reage predominantemente com grupos funcionais presentes nas cadeias de CMQ. De fato, a literatura relata que a formação de reticulações covalentes envolvendo as cadeias de CMQ resulta em estruturas mais rígidas (CHEN et al., 2004).

O módulo de elasticidade está relacionado à rigidez das membranas, sendo que valores mais elevados correspondem a materiais mais rígidos. Foi observado (Figura 18c) que as membranas reticuladas com genipina apresentaram maiores valores do módulo de elasticidade quando comparadas às membranas não-reticuladas, com exceção da membrana R(CMQ/PVA)_{25/75}, cujo módulo de elasticidade não foi significativamente diferente daquele da membrana não-reticulada ((CMQ/PVA)_{25/75}). Em concordância com os comentários anteriores, a reticulação com genipina afetou mais fortemente o módulo de elasticidade das membranas com elevados teores de CMQ.

A pele humana apresenta valores de resistência à tração que variam entre 2 e 20 MPa e alongamento na ruptura no intervalo 35 % - 70 % (JUSSILA et al., 2005). As propriedades mecânicas requeridas para curativos de pele estão relacionadas à região do corpo em que os mesmos serão aplicados e, na literatura, não há consenso sobre valores ideais. Também, deve ser levado em conta que em alguns casos é necessário o uso conjunto de curativos primários,

tais como as membranas estudadas neste trabalho, e curativos secundários, tais como adesivos e gazes, que afetam significativamente as propriedades mecânicas. Outro fator a ser considerado é a hidratação da membrana antes da aplicação na região do ferimento. Nesse sentido, apesar de os valores de tensão e alongamento na ruptura das membranas à base de CMQ/PVA serem inferiores aos da pele humana, estudos realizados por Liang *et al.* (2016) e Kumar *et al.* (2012) relatam a obtenção de membranas porosas à base de quitosana preparadas *via* liofilização com propriedades mecânicas similares às relatadas neste estudo e que apresentaram viabilidade para serem aplicadas como curativos *in vivo*.

5 Conclusões Parciais

Nesta primeira etapa do trabalho, membranas porosas à base de *N,O*-carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico) reticuladas ou não com genipina foram produzidas através da técnica de liofilização. Para isso, foram feitas variações na proporção mássica CMQ/PVA e a execução de reticulação com genipina. Foram obtidas membranas com diferentes morfologias e propriedades físico-químicas, além de elevadas porosidade ($68,3 \pm 2,5$ - $88,4 \pm 1,12$ %) e capacidade de hidratação (1080 ± 51 % - 2500 ± 27 %).

De maneira geral, o processo de reticulação levou a menor capacidade de hidratação das membranas, reduzindo seu valor em até 2 vezes ((CMQ/PVA)_{25/75} para R(CMQ/PVA)_{25/75}). Por outro lado, verificou-se que o processo de reticulação resultou em incremento de porosidade em 1,3 vezes ((CMQ/PVA)_{75/25} para R(CMQ/PVA)_{75/25}) e foi fundamental para aumentar estabilidade em meio aquoso das membranas contendo carboximetilquitosana em sua composição. A estabilidade térmica das membranas foi reduzida com a adição de poli (álcool vinílico). Comportamento contrário foi verificado após o processo de reticulação.

Além disso, foi observado que o aumento na concentração de PVA e a reticulação com genipina resultaram em membranas mais rígidas, conforme verificado nos ensaios mecânicos, cujos valores de módulo de elasticidade e tensão na ruptura aumentaram em até 5 vezes (amostra (CMQ/PVA)_{75/25} para R(CMQ/PVA)_{75/25}) e 2,5 vezes (amostra CMQ para R(CMQ)), respectivamente, enquanto o alongamento reduziu em 4 vezes ((CMQ/PVA)_{75/25} para R(CMQ/PVA)_{75/25}).

Desta forma, por apresentarem elevadas porosidade e capacidade de hidratação, assim como as melhores propriedades mecânicas, as membranas R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75} foram selecionadas para a próxima etapa do trabalho, em que foram adicionadas nanopartículas de ZnO e TiO₂ em suas matrizes poliméricas.

Capítulo 4 - Membranas R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75} com nanopartículas de ZnO e TiO₂

6 Resultados e Discussão

6.1 Caracterizações Físico-Químicas

6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 19 a 22 apresentam micrografias das superfícies e dos cortes transversais das membranas produzidas, sendo que as Figuras 19 e 20 trazem as amostras R(CMQ) sem a adição de nanopartículas e com adição de nanopartículas de ZnO (Figura 19) e de TiO₂ (Figura 20). Em ambas imagens, observa-se que a amostra R(CMQ) apresenta uma estrutura com poros aparentes e interconectados entre si, porém, pouco definidos e com distribuição de tamanho heterogênea. A análise da Figura 19 mostra que a adição de 1 % nanopartículas de ZnO levou à formação de poros ainda mais heterogêneos e menos interconectados entre si. Ao se aumentar esta proporção para 2,5 %, é possível observar uma melhor definição dos poros formados. Porém, elevando esta concentração para 5 % é possível observar que houve formação de uma espécie de filme entre os poros, havendo diminuição tanto na quantidade de poros visíveis quanto na interconectividade entre eles, o que afetou várias propriedades desta membrana, conforme pode ser observado nas discussões apresentadas nos próximos itens. Já o incremento do teor de nanopartículas de TiO₂, conforme apresentado na Figura 20, levou à formação de poros mais bem definidos e interconectados à medida que se aumentou a concentração de nanopartículas adicionada.

Figura 19 – Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras R(CMQ) sem e com a adição de nanopartículas de ZnO.

Figura 20 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras $R(CMQ)$ sem e com a adição de nanopartículas de TiO_2 .

Já as Figuras 21 e 22, apresentam as amostras (CMQ/PVA)_{25/75} sem a adição de nanopartículas de óxido metálico, e com adição de nanopartículas de ZnO (Figura 21) e TiO₂ (Figura 22). Em ambas é possível observar que a amostra (CMQ/PVA)_{25/75}, quando comparada à R(CMQ), apresenta estrutura ainda heterogênea, porém com poros pouco definidos, bem menores em diâmetro, mas mais interconectados, com formação de canais mais estruturados que ligam uma superfície a outra da membrana. O acréscimo das nanopartículas de ZnO até 2,5 %, conforme observado na Figura 21, levou à formação de estrutura porosa mais bem definida, com formação de canais ainda mais bem definidos. O aumento desta concentração para 5 % produziu amostras mais heterogêneas, porém com poros ainda bastante interconectados e com canais bem definidos. Comportamento semelhante foi observado quando adicionadas nanopartículas de TiO₂, sendo que a concentração de 2,5 % também foi a que levou à formação de membranas com poros mais bem definidos, conforme pode ser observado na Figura 22.

Como mencionado anteriormente nos itens 1.4 e 4.2.4, este tipo de material poroso é obtido devido à saída dos cristais de gelo durante o processo de liofilização, sendo que as alterações na estrutura provocadas pelo acréscimo de nanopartículas provavelmente se devam ao fato de a alteração na concentração da suspensão de partida possivelmente ter afetado a velocidade de congelamento dessa solução e consequentemente a formação de cristais de gelo e o alinhamento da solução polimérica ao longo deste processo (BERRETTA; BUMGARDNER; JENNINGS, 2016; GEIDOBLE; WINTER, 2013).

Figura 21 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras $(\text{CMQ/PVA})_{25/75}$ sem e com a adição de nanopartículas de ZnO .

Figura 22 - Micrografias das superfícies e cortes transversais das amostras $(\text{CMQ/PVA})_{25/75}$ sem e com a adição de nanopartículas de TiO_2 .

6.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) é uma técnica geralmente associada à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que permite uma análise mais abrangente do material estudado. Assim, enquanto o MEV permite analisar características morfológicas da superfície do material, o EDS analisa sua composição química. Nesta análise, de forma simplificada, um feixe de elétrons incidido sobre o material faz com que os átomos da superfície atingida se excitem, mudando de nível energético. Ao retornarem ao estado fundamental os elétrons liberam energia em um comprimento de onda na faixa dos raios-X característico do elemento. Desta forma, um detector mede a energia liberada e permite identificar os elementos presentes na amostra (GIRÃO; CAPUTO; FERRO, 2017).

Porém, como a análise foi feita em uma superfície relativamente pequena (620 x 620 μm), não se pode afirmar que o valor de concentração do metal encontrado é representativo do material como um todo. Desta forma, pode-se apenas verificar se o elemento analisado está de fato presente na amostra e a tendência de concentração encontrada.

A Figura 23, apresenta os espectros de energia dispersiva (EDX) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂. Pode-se observar em todas as imagens picos característicos de C, O e Na, devido à presença de CMQ, PVA ou genipina, além do pico de Au, empregado no recobrimento das amostras. Também são vistos picos característicos dos metais presentes nas nanopartículas, Zn e Ti, o que comprova a sua incorporação nas membranas. Além disso, como pode ser verificado na Figura 24, a média do valor detectado em 3 pontos diferentes da amostra, mostra que houve um aumento na concentração dos metais na membrana com o aumento da carga de nanopartículas adicionadas durante o preparo das membranas.

Figura 23 - Espectros de energia dispersiva (EDX) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂. **Figura 24** - Média do valor de Zn ou Ti detectado em 3 pontos diferentes das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

6.1.3 Porosidade

A porosidade do material possui implicações diretas sobre sua funcionalidade como curativo uma vez que está diretamente relacionada a propriedades essenciais da célula, como

nutrição, proliferação, migração para vascularização do tecido, além da formação do novo tecido (LOH; CHOONG, 2013; SUDHEESH KUMAR et al., 2012). Além disso, uma alta porosidade pode facilitar o controle do equilíbrio de umidade no leito da ferida, evitando uma possível infecção, além de permitir a transferência de nutrientes e passagem do oxigênio, fundamentais para a regeneração do tecido lesionado (LIANG et al., 2016).

A Figura 25 apresenta os valores de porosidade das membranas com nanopartículas de ZnO e TiO₂ em sua composição obtidos através do método de deslocamento de fluidos. Foi possível verificar que, com exceção do conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO, em que não houve alteração significativa nos valores da porosidade, nos demais conjuntos a inclusão de nanopartículas levou à redução nos valores de porosidade, sem que alterações significativas fossem observadas com o incremento na concentração de nanopartículas.

Figura 25 – Valores médios da porosidade dos conjuntos de membranas R(CMQ) com nanopartículas de ZnO (a) e TiO₂ (c) e (CMQ/PVA)_{25/75} com nanopartículas de ZnO (b) e TiO₂ (d).

Quando comparadas as membranas compostas por CMQ reticuladas com genipina com as amostras de CMQ e PVA, observa-se que no primeiro grupo a redução da porosidade foi mais significativa, fato que pode ser justificado devido ao processo de reticulação sofrido pela CMQ, já que o processo de reticulação leva à maior rigidez da cadeia polimérica, fazendo com

que as nanopartículas de óxido metálico passem a ocupar os espaços que antes estavam vazios, diminuindo assim a porosidade do material (LASHERAS-ZUBIATE, 2011; MI et al., 2000).

Alterações na concentração da suspensão, no solvente empregado, o uso de aditivos ou variações nas condições de congelamento, dentre outros fatores, podem afetar a estrutura e o tamanho dos poros obtidos no processo de liofilização (BERRETTA; BUMGARDNER; JENNINGS, 2016). A adição de nanopartículas à solução possivelmente resultou em novo emaranhamento das cadeias, levando à alteração no processo de congelamento do material e, conseqüentemente, à alteração na porosidade. Um outro fator que deve ser levado em conta é a possível aglomeração de nanopartículas, que podem ocupar o espaço de alguns poros, levando à redução da porosidade total do material.

Comportamento semelhante ao encontrado no conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}-ZnO foi observado tanto por Liang e colaboradores (2016), que produziram membranas porosas de quitosana com nanopartículas de prata, quanto por Sudheesh Kumar e colaboradores (2012), que produziram membranas porosas de quitosana com ZnO, e que não observaram diferença significativa no valor de porosidade de suas membranas tanto com a adição de nanopartículas na matriz polimérica quanto com o incremento na quantidade destas nanopartículas.

6.1.4 Capacidade de Hidratação

Conforme observado anteriormente, a capacidade de hidratação é uma das propriedades mais importantes de um curativo, pois há a necessidade de se manter um ambiente úmido para estimular a regeneração tecidual, porém sem permitir que haja um acúmulo de exsudato na superfície da ferida, de forma a evitar infecções. A capacidade de hidratação do material é um dos fatores responsáveis por manter o ambiente da ferida limpo e hidratado ao mesmo tempo (MI et al., 2001; PAUL; SHARMA, 2004).

A capacidade de hidratação das membranas em função do tempo está apresentada na Figura 26 (a-d), sendo observado que, em todos os casos, o equilíbrio foi atingido em até 150 segundos. Diante disso, foi elaborado um gráfico relacionando os valores médios máximos das capacidades de hidratação das membranas após 150 segundos de contato com PBS (Figura 26 (e-f)).

Figura 26 - Capacidade de hidratação (a – d) e capacidade de hidratação no equilíbrio (e - h) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO_2 .

Pode-se observar, mais uma vez, um comportamento semelhante para todas as membranas, sendo que o acréscimo de nanopartículas à matriz polimérica levou ao aumento

significativo da capacidade de hidratação das amostras, principalmente para as membranas contendo nanopartículas de dióxido de titânio. Porém, a alteração na concentração de nanopartículas não alterou de forma significativa a capacidade de hidratação dos materiais.

Durante o processo de hidratação das membranas, o solvente penetra na rede polimérica indo das bordas para o meio, ainda não solvatado, para solvatar e expandir a matriz polimérica da membrana. Como resultado, uma deformação dinâmica é induzida por forças osmóticas, que são balanceadas por forças viscoelásticas restauradoras. No equilíbrio, as duas forças ficam perfeitamente balanceadas não havendo intumescimento adicional. A transição de volume juntamente com o grau de expansão ou encolhimento da membrana depende do balanço dos caracteres hidrofílico e hidrofóbico da matriz, além de fatores como reticulação, ionização e interações com contra-íons, no caso de polieletrólitos. A difusão do solvente através das camadas da matriz geralmente depende da concentração, sendo que a mobilidade da cadeia polimérica facilita a penetração do solvente e a taxa de difusão é mais lenta do que a taxa de relaxação das cadeias (GUGLIUZZA; DRIOLI, 2013).

A adição de nanopartículas alterou as características da matriz polimérica o que por sua vez resultou em modificação do balanço hidrostático do meio e consequentemente a capacidade de absorção de água do material, justificando, portanto, o comportamento observado (Figura 26). Por possuírem cargas na superfície, as nanopartículas adicionadas permitem a penetração de maior volume de água para equilibrar a pressão osmótica, o que gera um maior intumescimento da membrana (WAHID et al., 2017).

Além disso, a presença de nanopartículas de TiO₂ gerou matrizes poliméricas mais bem definidas do que aquelas em que nanopartículas de ZnO foram incorporadas, como pode ser observado nas micrografias apresentadas na seção 6.1.1, o que pode explicar o fato das membranas com nanopartículas de TiO₂ absorverem uma quantidade maior de água, pois uma matriz mais definida dispõe de mais espaços livres no interior da membrana, permitindo maior absorção de água (WAHID et al., 2016).

Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho foi observado por Sabaa e colaboradores (2015), que produziram hidrogéis de CMQ e PVA e incorporaram nanopartículas de argila em sua estrutura, o que levou a maior capacidade de hidratação. Mesmo fato observado também por Liu e colaboradores (2015) ao produzirem hidrogéis de CMQ e PVA e incorporarem micropartículas de alginato de sódio.

6.1.5 Análise Termogravimétrica

As curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivativa (DTG) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO ou TiO₂ estão apresentadas na Figura 27. Nelas estão apresentados dois tipos de materiais, sendo o primeiro produzido com CMQ reticulada com genipina e o segundo produzido com CMQ e PVA. Nos dois tipos de materiais são observados a presença de dois eventos principais, sendo que os dados correspondentes estão listados na Tabela 6.

Figura 27 - Curvas de TG (a, c, e, g) e DTG (b, d, f, h) das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO_2 .

Como discutido no item 4.2.6, o primeiro evento está associado à perda de umidade dos materiais (ANTONY et al., 2013), já o segundo evento está associado à degradação da CMQ, incluindo a eliminação dos grupos substituintes das carboximetilquitosanas, e início da

degradação do PVA, principalmente desidratação acompanhada pela formação de alguns produtos voláteis (LEWANDOWSKA, 2009; THOMAS et al., 2001). Um terceiro estágio é observado nas membranas que contêm PVA em sua composição, que está associado principalmente à oxidação e decomposição dos resíduos gerados no segundo estágio de degradação (THOMAS et al., 2001).

Tabela 6 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

Amostra	Estágio 1		Estágio 2		Resíduo de carbonização (%)
	Intervalo (°C)	Perda de massa (%)	Intervalo (°C)	T _{onset} (°C)	
R(CMQ)	25 – 154	18	154 – 400	243	27
R(CMQ)_1ZnO	25 – 178	21	183 – 348	277	34
R(CMQ)_2,5ZnO	25 – 175	18	190 – 346	272	35
R(CMQ)_5ZnO	25 – 174	21	203 – 355	273	36
(CMQ/PVA) _{25/75}	25 – 120	9	170 – 409	280	14
(CMQ/PVA) _{25/75} _1ZnO	25 – 161	11	197 – 361	260	20
(CMQ/PVA) _{25/75} _2,5ZnO	25 – 148	10	206 – 357	249	20
(CMQ/PVA) _{25/75} _5ZnO	25 – 142	9	206 – 356	249	24
R(CMQ)	25 – 154	18	154 – 400	243	27
R(CMQ)_1TiO ₂	25 – 200	18	201 – 369	277	33
R(CMQ)_2,5TiO ₂	25 – 190	18	188 – 357	278	34
R(CMQ)_5TiO ₂	25 – 187	18	188 – 358	280	33
(CMQ/PVA) _{25/75}	25 – 120	9	170 – 409	280	14
(CMQ/PVA) _{25/75} _1TiO ₂	25 – 156	11	180 – 398	285	14
(CMQ/PVA) _{25/75} _2,5TiO ₂	25 – 144	9	187 – 381	288	15
(CMQ/PVA) _{25/75} _5TiO ₂	25 – 156	9	180 – 390	285	17

Apesar do primeiro estágio estar associado, em ambos os casos, à perda de umidade do material, é possível observar que há diferenças nos valores tanto de intervalo do evento, quanto da perda de massa, de acordo com a composição da membrana. O processo de reticulação aumentou o intervalo de ocorrência do evento e o acréscimo de PVA diminuiu este intervalo. Da mesma forma, o acréscimo de PVA levou à redução do valor da perda de massa neste primeiro estágio, fato associado ao caráter menos hidrofílico do PVA quando comparado à CMQ.

A presença das nanopartículas de óxido metálico em todas as composições elevou a temperatura final do evento entre 20 e 40 °C, dependendo da composição da membrana, porém, não alterou significativamente o valor da perda de massa. Este comportamento pode estar associado ao fato de a presença das nanopartículas ter dificultado a eliminação da água adsorvida nos materiais em função da maior interação dessas nanopartículas com a matriz polimérica.

No segundo estágio é possível observar comportamentos diferentes para os materiais obtidos. Para a amostra R(CMQ) com nanopartículas de ZnO e TiO₂, a presença das

nanopartículas elevou a estabilidade térmica das membranas, o que é evidenciado pela elevação da T_{onset} de 243 °C para valores entre 272 e 280 °C. Enquanto que nas amostras do conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO a presença das nanopartículas causou instabilidade térmica (reduzindo a T_{onset} de 280 para até 249 °C), já as nanopartículas de TiO₂ (conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂) praticamente não alteraram significativamente a estabilidade térmica destas membranas, havendo um leve aumento da estabilidade térmica (T_{onset} subiu de 280 para até 288 °C). Em todos os casos observou-se na DTG que os picos referentes a este evento estão mais definidos, sendo que a temperatura inicial do evento aumentou, porém a final diminuiu. Também foi observado que a perda de massa ocorrida neste intervalo de temperatura para todas as amostras foi menor com o acréscimo das nanopartículas, fato justificado pela presença destas nanopartículas de óxidos metálicos, que não se degradam neste intervalo de temperatura (ZHONG et al., 2018).

Por fim, foi observado que em todas as membranas, quando acrescentadas nanopartículas em suas estruturas, há um aumento do resíduo final de carbonização, o que é atribuído à estabilidade térmica das nanopartículas, que não se degradam no intervalo de temperatura em que a análise foi realizada (TRIMUKHE; VARMA, 2009; VICENTINI; SMANIA; LARANJEIRA, 2010; ZHONG et al., 2018).

6.2 Análises Mecânicas

Foram realizados ensaios mecânicos nas membranas em estado seco com o intuito de avaliar a influência da adição de nanopartículas de ZnO e TiO₂. A partir das curvas de tensão em função de deformação foram extraídos os valores de tensão na ruptura, alongamento máximo e o módulo de elasticidade das amostras (Figuras 28-30).

Os gráficos de tensão na ruptura (Figura 28) apresentam comportamentos diferentes para cada conjunto de membranas. A incorporação de nanopartículas de ZnO não alterou significativamente essa propriedade no conjunto R(CMQ)_ZnO, porém, quando a concentração atingiu 5 % de nanopartículas, o valor da tensão na ruptura aumentou de 43 KPa (0 – 2,5 % de ZnO) para 176 KPa. Este comportamento pode ser explicado pela alteração da morfologia do material, conforme comprovado por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 28 – Valores de tensão na ruptura das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

Já os conjuntos (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO e R(CMQ)_TiO₂ apresentaram redução do valor de tensão na ruptura com a incorporação das nanopartículas na matriz polimérica, porém o aumento da carga não resultou em alteração significativa dessa propriedade. Por fim, o conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂ apresentou comportamento contrário ao anterior, pois a incorporação de nanopartículas gerou um material mais resistente à tração, sendo que o incremento da carga de nanopartículas para 5 % gerou maior resistência quando comparado às membranas com menores teores de nanopartículas.

Estes comportamentos provavelmente se devem ao fato da incorporação das nanopartículas nas matrizes poliméricas das membranas terem alterado as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas que compõem cada membrana, inclusive gerando possíveis pontos de aglomeração destas nanopartículas, podendo atuar tanto no fortalecendo destas ligações intermoleculares, quanto enfraquecendo-as e causando falhas na rede polimérica, gerando matrizes mais rígidas ou mais frágeis de acordo com a forma de interferência em cada caso (LAVORGNA et al., 2014; LIU; KIM, 2012; TANG et al., 2016).

A Figura 29 apresenta os valores de alongamento das membranas. É possível observar que a adição de nanopartículas na matriz polimérica, com exceção da amostra R(CMQ)_TiO₂, levou ao aumento do alongamento, principalmente nas membranas R(CMQ)_ZnO e (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂, em que houve um aumento de 5,3 % para 12,8 % no primeiro caso e 5,4 % para 15,1 % no segundo caso. Já na amostra R(CMQ)_TiO₂ foi observada uma redução de 5,4 % para 2,7 % com a adição das nanopartículas. Também foi observado em todos os caso que houve decréscimo do alongamento com o aumento da carga de nanopartículas adicionada às membranas.

Estes comportamentos também podem ser explicados possivelmente pela incorporação das nanopartículas metálicas na matriz polimérica das membranas, que ao interferir nas interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas de cada conjunto, levou à alteração na capacidade de alongamento da membrana, tanto gerando prováveis pontos de aglomeração, enfraquecendo as ligações intermoleculares e permitindo que as cadeias poliméricas se movimentem mais facilmente, aumentando assim seu alongamento, quanto fortalecendo a matriz polimérica e gerando membranas menos flexíveis, de acordo com o comportamento de cada membrana avaliada (LIU; KIM, 2012; SUDHEESH KUMAR et al., 2012; TANG et al., 2016).

Figura 29 - Valores de alongamento das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

O módulo de elasticidade está relacionado à rigidez do material, sendo que quanto maior seu valor, mais rígido é o material, ou seja, menor será sua deformação elástica. Os valores do módulo de elasticidade das membranas estão apresentados na Figura 30, sendo possível observar que cada conjunto apresentou um comportamento diferente. No conjunto R(CMQ)_ZnO, em concordância com os resultados das demais propriedades apresentadas anteriormente, a amostra contendo 5 % de carga de nanopartículas foi a que apresentou maior valor de módulo de elasticidade, sendo que as demais amostras não diferiram entre si de forma significativa.

Figura 30 - Valores de módulo de elasticidade das membranas produzidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

Já os conjuntos (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO e R(CMQ)_TiO₂ apresentaram redução no valor do módulo de elasticidade quando nanopartículas foram incorporadas na matriz polimérica, o que está de acordo com os valores de tração na ruptura, que indicaram que as membranas sem adição de nanopartículas seriam as mais rígidas. Importante observar que o conjunto com nanopartículas de TiO₂ apresentou redução mais significativa no módulo de elasticidade que o conjunto com nanopartículas de ZnO.

Por fim, o conjunto $(\text{CMQ/PVA})_{25/75}\text{-TiO}_2$ não apresentou diferença significativa no valor de módulo de elasticidade em função do teor de nanopartículas, mostrando que tanto o acréscimo quanto o aumento da quantidade das nanopartículas adicionadas não interferiu de forma significativa nesta propriedade das membranas.

6.3 Degradação enzimática

Uma análise importante a ser realizada em material com potencial para aplicações biomédicas é a de sua estabilidade diante da ação de enzimas presentes na região do corpo humano em que será aplicado (SAREM; MOZTARZADEH; MOZAFARI, 2013). A lisozima, principal enzima capaz de degradar tanto a quitosana quanto seus derivados, está presente nos fluidos corpóreos atuando na defesa do organismo contra o ataque de bactérias gram-positivas, podendo atuar também contra algumas bactérias gram-negativas e fungos, catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) presentes no peptideoglicano, principal polissacarídeo presente na parede celular de bactérias (ERCAN; DEMIRCI, 2015).

Conforme foi observado por Nordtveit, Varum e Smidsrod (1996), a ação da lisozima na degradação da quitosana está diretamente relacionada ao seu grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), sendo que, quando $\overline{GA} > 30 \%$ a quitosana apresenta maior suscetibilidade à degradação enzimática mesmo em períodos curtos de exposição. Já Nishimura et al. (1986) observaram que a degradação da carboximetilquitina diminui com o aumento do grau de substituição ($\overline{GS}$), principalmente quando essa substituição ocorre na posição O-3.

A amostra de CMQ obtida neste trabalho apresentou $\overline{GA} \approx 30 \%$ e $(\overline{GS}) \approx 1,1$, correspondente a $(\overline{GS})(O6) \approx 0,6$, $(\overline{GS})(O3) \approx 0,4$ e $(\overline{GS})(N) \approx 0,1$ (conforme relatado no item 4.1.2). Diante disso, as amostras foram submetidas à análise de degradação enzimática por períodos de até 14 dias, sendo que os valores médios de perda de massa ao longo desses tempos estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Curva de perda de massa das membranas em função do tempo de incubação a 37 °C em tampão fosfato (pH = 7,4) na ausência e na presença de lisozima.

As amostras compostas por matrizes iguais apresentaram comportamentos semelhantes, independente da natureza das nanopartículas incorporadas ao material, que não interferiu significativamente no valor de perda de massa em nenhum conjunto. As amostras compostas apenas por CMQ reticulada com genipina se mostraram altamente suscetíveis à ação da lisozima, estando completamente degradadas ao final de 7 dias, em concordância com o fato que possuindo $\overline{GA}$ elevado são mais susceptíveis à ação da lisozima (NORDTVEIT; VARUM; SMIDSROD, 1996).

Já as amostras com PVA em sua composição se mostraram resistentes à enzima, uma vez que ao final de 14 dias praticamente não houve perda de massa, fato que é justificado pela presença de grande quantidade de PVA, que por não ser suscetível à ação da enzima e por estar entrelaçado às cadeias de CMQ, atuou como barreira ao ataque da lisozima.

6.4 Citotoxicidade

A biocompatibilidade dos materiais que são empregados como curativos para lesões de pele em relação aos fibroblastos é uma análise essencial, pois este ensaio mede a capacidade que o material possui de estimular, impedir ou manter igual a atividade metabólica das células

do tecido que deve ser regenerado, sendo relacionada com o número de células de fibroblastos viáveis ao final da análise (JITHENDRA et al., 2013).

Os fibroblastos são extremamente importantes no processo de cicatrização de feridas e regeneração da pele, pois participam principalmente da fase de regeneração tecidual, denominada fase proliferativa. São também a principal fonte de componentes da matriz extracelular, como colágeno I, fibronectina e proteoglicanos, que atuam no aumento da resistência à tração do tecido formado. A matriz extracelular também é responsável pelo fechamento da lesão, além de atuar como suporte para migração de novos fibroblastos e outras células responsáveis por suprir o tecido ferido com nutrientes e oxigênio (COSTA-ALMEIDA et al., 2015; STUNOVA; VISTEJNOVA, 2018).

Desta forma, o crescimento de células de fibroblastos após 3 dias de contato com diferentes amostras foi avaliado usando o teste MTT e observação em microscópio óptico para avaliar preliminarmente a citocompatibilidade das membranas porosas enriquecidas com nanopartículas de ZnO e TiO₂. De acordo com ISO 10993-5 (ISO10993-5, 2009), amostras com viabilidade celular superior a 70 % podem ser consideradas não citotóxicas (ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013).

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade das membranas estão apresentados na Figura 32 e revelam que todas as amostras, com exceção da amostra R(CMQ)_5ZnO, não foram citotóxicas e que as variações na concentração de nanopartículas não afetaram a viabilidade celular das células de fibroblastos. O comportamento observado no caso da amostra R(CMQ)_5ZnO provavelmente se deve ao fato que há maior liberação para o meio de nanopartículas de ZnO, cujo efeito tóxico em concentrações elevadas é relatado na literatura (ABBASALIPOURKABIR et al., 2015; PASQUET et al., 2014).

Figura 32 - Viabilidade celular de fibroblastos nas membranas R(CMQ) (a) e (CMQ/PVA)_{25/75} (b) com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

Comportamento semelhante foi observado por Sudheesh Kumar e colaboradores (2012), que ao produzirem membranas porosas de quitosana com nanopartículas de ZnO observaram que a presença das nanopartículas não alterou de forma significativa a viabilidade celular. Da mesma forma, Archana, Dutta e Dutta (2013) ao acrescentarem nanopartículas de TiO₂ em filmes de quitosana/pectina observaram que não houve alteração significativa na viabilidade celular ao longo de 3 e 7 dias. Já Ullah, Zainol e Idrus (2017) observaram ao final de 4 e 7 dias viabilidade celular máxima em membranas porosas de quitosana/colágeno quando acrescidas de 2 % de nanopartículas de ZnO.

7 Conclusões Parciais

Nesta segunda etapa do trabalho, membranas porosas à base de *N,O*-carboximetilquitosana reticuladas com genipina (R(CMQ)) e *N,O*-carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico) na proporção mássica 25/75 ((CMQ/PVA)_{25/75}) foram produzidas incorporando nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ou dióxido de titânio (TiO₂) em sua estrutura nas concentrações 1, 2,5 e 5 %, dando origem a 4 novos conjuntos de membranas (R(CMQ)_ZnO, R(CMQ)_TiO₂, (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO e (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂).

Esta incorporação de nanopartículas levou a produção de membranas com poros mais definidos. A presença de nanopartículas também levou à formação de membranas com menor porosidade (redução variou entre 8 e 20 %), porém com maior capacidade de reter água (aumento variou entre 133 a 200 %). Quanto à estabilidade térmica para as membranas dos conjuntos R(CMQ)_ZnO e R(CMQ)_TiO₂, a presença das nanopartículas elevou esta estabilidade, enquanto que nas amostras (CMQ/PVA)_{25/75}, as nanopartículas de ZnO causaram instabilidade térmica e as de TiO₂ praticamente não alteraram o comportamento térmico das membranas.

A presença das nanopartículas resultou em alterações nas propriedades mecânicas das membranas de acordo com a composição de cada uma, sendo que a tensão na ruptura para R(CMQ)_ZnO teve um aumento de 400 % apenas na membrana com 5 % de nanopartículas do óxido metálico, enquanto as demais não apresentaram mudança significativa. Já os conjuntos (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO e R(CMQ)_TiO₂ apresentaram redução do valor de tensão na ruptura com a incorporação das nanopartículas (redução em média de 215 e 800 %, respectivamente), enquanto que o conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂ gerou um material mais resistente à tração (valor em média 50 % maior).

A adição de nanopartículas na matriz polimérica, com exceção da amostra R(CMQ)_TiO₂, levou ao aumento da capacidade de alongamento, principalmente nas membranas R(CMQ)_ZnO e (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂ (aumento de 240 e 280 %, respectivamente). Já o módulo de elasticidade variou de forma semelhante à tensão na ruptura, no conjunto R(CMQ)_ZnO, a amostra contendo 5 % de teor de nanopartículas apresentou maior valor de módulo de elasticidade (cerca de 43 % maior), já nos conjuntos (CMQ/PVA)_{25/75}_ZnO e R(CMQ)_TiO₂, houve redução no valor do módulo de elasticidade (190 e 450 % menor, respectivamente), enquanto que no conjunto (CMQ/PVA)_{25/75}_TiO₂ não houve diferença significativa no valor de módulo de elasticidade.

As membranas foram submetidas à degradação enzimática, sendo constatado que a presença de nanopartículas não alterou a taxa de degradação. Por outro lado a composição da matriz polimérica afetou fortemente a susceptibilidade à lisozima, sendo que as membranas compostas por CMQ e reticuladas com genipina, degradaram em 4 dias, enquanto as amostras contendo PVA não foram susceptíveis à ação da enzima.

Por fim, as amostras foram testadas quanto à sua citotoxicidade em relação a fibroblastos, sendo comprovado que, com exceção da amostra R(CMQ)_ZnO, todas as amostras foram não citotóxicas.

De forma geral, a incorporação de nanopartículas gerou membranas com propriedades semelhantes, com exceção da amostra R(CMQ) contendo carga de 5% de nanopartículas de ZnO, a qual apresentou elevada citotoxicidade em relação à linhagem de células de fibroblastos.

Conclusões e Perspectivas

Conclusões e Perspectivas

O trabalho teve como objetivo a obtenção de membranas com potencial para serem empregadas como curativos dérmicos. Seu desenvolvimento foi realizado em duas etapas, sendo que na primeira etapa as membranas porosas à base de *N,O*-carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico), reticuladas ou não com genipina, foram produzidas através da técnica de liofilização. De forma geral, neste primeiro conjunto de membranas, as amostras R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75} foram as que apresentaram melhores propriedades, como elevada porosidade ($68,3 \pm 2,5$ % - $88,4 \pm 1,12$ %) e capacidade de hidratação (1080 ± 51 % - 2500 ± 27 %), assim como as melhores propriedades mecânicas, como maior tensão na ruptura (42,18 MPa e 20,91 MPa) e alongamento ($5,36 \pm 0,44$ % e $5,38 \pm 0,33$ %). Assim, as membranas R(CMQ) e (CMQ/PVA)_{25/75} foram selecionadas para o desenvolvimento da segunda etapa do trabalho, em que nanopartículas de ZnO e TiO₂ foram adicionadas às matrizes poliméricas.

Na segunda etapa do trabalho cada uma das duas amostras selecionadas na etapa anterior, gerou dois novos conjuntos, um com nanopartículas de ZnO e outro com nanopartículas de TiO₂, em 3 concentrações diferentes, totalizando 4 novos conjuntos. Observou-se que, com exceção da amostra R(CMQ)_5ZnO, a incorporação de nanopartículas gerou membranas com propriedades diferentes em comparação àquelas preparadas sem nanopartículas, porém, independentemente da natureza e da quantidade de nanopartículas adicionadas, os resultados foram semelhantes entre si.

De maneira geral, as membranas elaboradas nesse estudo, especialmente as constituídas por CMQ/PVA, exibiram características que as tornam potenciais materiais para serem aplicados como curativos para lesões de pele. A elevada porosidade e capacidade de hidratação verificadas, podem favorecer a manutenção do equilíbrio de umidade no local da ferida e a difusão de nutrientes para as células, o que pode ser benéfico para o processo de cicatrização. Adicionalmente, as membranas também apresentaram propriedades mecânicas adequadas e degradação controlada, além de não apresentarem toxicidade em relação à linhagem de células de fibroblastos.

Este trabalho abre perspectivas para novos estudos, uma vez que caracterizações biológicas *in vitro* e *in vivo* necessitam ser realizadas visando avaliar o uso desses materiais como curativos. Estudos de liberação das nanopartículas contidas nas matrizes poliméricas estudadas também devem ser realizados objetivando-se avaliar a influência desse processo no possível favorecimento na regeneração do tecido lesado. Adicionalmente, novos materiais podem ser obtidos tendo como base as matrizes poliméricas apresentadas neste estudo, a

exemplo da encapsulação de fármacos que permitam a ocorrência de processo de cicatrização de maneira rápida e eficiente.

8 Referências Bibliográficas

ABBASALIPOURKABIR, R. et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 154–160, 2015.

ABOU-OKEIL, A. et al. Wound dressing based on nonwoven viscose fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 658–666, 2012.

AGARWAL, R.; ALAM, M. S.; GUPTA, B. Polyvinyl alcohol-polyethylene oxide-carboxymethyl cellulose membranes for drug delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 6, p. 3728–3736, 2013.

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.

ANITHA, A. et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 672–677, 2009.

ANTONY, R. et al. Synthesis, spectrochemical characterisation and catalytic activity of transition metal complexes derived from Schiff base modified chitosan. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 103, p. 423–30, 2013.

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.

AUSTERO, M. S. et al. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 75, p. 2551–2562, 2012.

BAO, D. et al. Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose. **Carbohydrate polymers**, v. 110, p. 113–20, 2014.

BELLINI, M. Z. et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. S2, p. E421–E431, 2012.

BEPPU, M. M. et al. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. **Journal of Membrane Science**, v. 240, n. 1–2, p. 227–235, 2004.

BERRETTA, J.; BUMGARDNER, J. D.; JENNINGS, J. A. Lyophilized chitosan sponges. In: **Chitosan Based Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 1p. 239–253.

BISPO, V. M. et al. Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly(vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 166–175, 2010.

BUCHAN, I. A. et al. Clinical and laboratory investigation of the composition and properties

of human skin wound exudate under semi-permeable dressings. **Burns**, v. 7, n. 5, p. 326–334, 1981.

BUKZEM, A. L. et al. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 615–624, 2016.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, Estruturas e Propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CERRUTTI, B. M. et al. Carboxymethyl Chitosan: Preparation and Use in Colloidal Ceramic Processing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 3, p. 816–825, 2012.

CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 559–564, 2004.

CHEN, C. et al. Bubble template fabrication of chitosan/poly(vinyl alcohol) sponges for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 188–193, 2013.

CHEN, S.-C. et al. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 2, p. 285–300, 2004.

CHEN, X.-G.; PARK, H.-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355–359, 2003.

CHEN, Y. et al. Asymmetric polyurethane membrane with in situ-generated nano-TiO₂ as wound dressing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 3, p. 1532–1541, 2011.

CLASEN, C.; WILHELMS, T.; KULICKE, W.-M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3210–3222, 2006.

COSTA-ALMEIDA, R. et al. Fibroblast-endothelial partners for vascularization strategies in tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 5–6, p. 1055–1065, 2015.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

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.

DOS SANTOS, D. M. et al. Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 110–121, 2018.

ELIA, A. M.; BARRESI, A. A. Intensification of transfer fluxes and control of product properties in freeze-drying. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 37, n. 5, p. 347–358, 1998.

ERCAN, D.; DEMIRCI, A. Enhanced human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor coupled with online recovery system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 68–74, 2015.

FAN, L. et al. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 447–452, 2006.

FARAG, R. K.; MOHAMED, R. R. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan nanogels for swelling studies and antimicrobial activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 1, p. 190–203, 2012.

FIAMINGO, A. et al. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 79–85, 2016.

FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 155–163, 2016.

FIELD, C. K.; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1, p. S2–S6, 1994.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1349–1362, 2017.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

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

GEIDOBLE, R.; WINTER, G. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 2, p. 214–222, 2013.

GHAEE, A. et al. Effects of chitosan membrane morphology on copper ion adsorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 165, n. 1, p. 46–55, 2010.

GIRÃO, A. V.; CAPUTO, G.; FERRO, M. C. Application of Scanning Electron Microscopy–Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS). **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 75, p. 153–168, 2017.

GIRI, T. K. et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 439–449, 2012.

GONSALVES, A. DE A.; ARAÚJO, C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GU, S. Y. et al. Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(l-lactide) blend and its

characteristics for wound dressing. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 6, p. 1822–1828, 2009.

GUGLIUZZA, A.; DRIOLI, E. A review on membrane engineering for innovation in wearable fabrics and protective textiles. **Journal of Membrane Science**, v. 446, p. 350–375, 2013.

GUTHA, Y. et al. Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly(vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 234–241, 2017.

HAMASAKI, S. et al. Fabrication of highly porous keratin sponges by freeze-drying in the presence of calcium alginate beads. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 8, p. 1250–1254, 2008.

HANNA, J. R.; GIACOPELLI, J. A. A review of wound healing and wound dressing products. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 36, n. 1, p. 2–14, 1997.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Science, medicine, and the future: Healing chronic wounds. **BMJ**, v. 324, n. 7330, p. 160–163, 19 jan. 2002.

HILLBERG, A. L.; HOLMES, C. A.; TABRIZIAN, M. Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4463–4470, 2009.

HJERDE, R. J. N. et al. Chemical composition of O-(carboxymethyl)-chitins in relation to lysozyme degradation rates. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 3, p. 131–139, 1997.

HOLMES, A. M. et al. Relative Penetration of Zinc Oxide and Zinc Ions into Human Skin after Application of Different Zinc Oxide Formulations. **ACS Nano**, v. 10, n. 2, p. 1810–1819, 2016.

IKEDA, T. et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. **BioMed Research International**, v. 2014, artigo ID 786892, 8p., 2014.

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

JAIKUMAR, D. et al. Injectable alginate-O-carboxymethyl chitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 318–326, 2015.

JAYAKUMAR, R. et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, n. 7, p. 675–709, 2010.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, p. 12–21, 2014.

JITHENDRA, P. et al. Preparation and characterization of aloe vera blended Collagen-Chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 15, p. 7291–7298, 2013.

JUSSILA, J. et al. Ballistic skin simulant. **Forensic Science International**, v. 150, n. 1, p. 63–71, 2005.

KAMARUL, T. et al. Biocompatibility and Toxicity of Poly(vinyl alcohol)/N,O-Carboxymethyl Chitosan Scaffold. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

KAMOUN, E. A. et al. Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications : A review of remarkably blended polymers. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 3, p. 217–233, 2017.

KASAAI, M. of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants. **Carbohydrate polymers**, v. 68, p. 477–488, 2007.

KONG, X. Simultaneous determination of degree of deacetylation, degree of substitution and distribution fraction of -COONa in carboxymethyl chitosan by potentiometric titration. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 336–341, 2012.

KORRAPATI, P. S. et al. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 747–765, 2016.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–84, dez. 2004.

KUMARI, R.; DUTTA, P. K. Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 261–266, 2010.

LASHERAS-ZUBIATE, M. Interaction of carboxymethylchitosan and heavy metals in cement media. **Journal of hazardous materials**, v. 194, p. 223–231, 2011.

LAVORGNA, M. et al. MMT-supported Ag nanoparticles for chitosan nanocomposites: Structural properties and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 385–392, 2014.

LE DUNG, P. et al. Water-soluble N-substituted chitosan derivatives. **ASEAN Journal for Science and Technology Development**, v. 22, n. 3, p. 261–270, 2005.

LEBOURG, M.; ANTÓN, J. S.; RIBELLES, J. L. G. Porous membranes of PLLA-PCL blend for tissue engineering applications. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 7, p. 2207–2218, 2008.

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.

LEWANDOWSKA, K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. **Thermochimica Acta**, v. 493, n. 1–2, p. 42–48, set. 2009.

LI, L. 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. 22618–22699, 2015.

LI, Y. et al. A novel pH-sensitive and freeze-thawed carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) blended hydrogel for protein delivery. **Polymer International**, v. 58, n. 10, p. 1120–1125, 2009.

LIANG, D. et al. Novel Asymmetric Wetttable AgNPs/Chitosan Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 6, p. 3958–3968, 2016.

LIN, W. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose – chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

LIU, I.-H.; CHANG, S.-H.; LIN, H.-Y. Chitosan-based hydrogel tissue scaffolds made by 3D plotting promotes osteoblast proliferation and mineralization. **Biomedical Materials**, v. 10, n. 3, p. 035004, 2015.

LIU, Q. et al. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels containing alginate microspheres for protein delivery. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 30, n. 4, p. 397–411, 2015.

LIU, Y.; KIM, H. IL. Characterization and antibacterial properties of genipin-crosslinked chitosan/poly(ethylene glycol)/ZnO/Ag nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 111–116, 2012.

LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 6, p. 485–502, 2013.

LUO, M. et al. Preparation and characterization of genipin-crosslinked chitosan microspheres for the sustained release of salidroside. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 3, p. 323–333, 2015.

MACKENZIE, A. P. A review of the freeze-drying process. **Cryobiology**, v. 25, n. 6, p. 574, dez. 1988.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 12, p. 1133–1142, 1999.

MI, F.-L. et al. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 4, p. 389–396, 2000.

MI, F.-L. et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan

membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p. 165–173, 2001.

MI, F.-L.; SHYU, S.-S.; PENG, C.-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005.

MIRANDA, M. E. DOS S. et al. Rheological Aspects of N-Carboxymethyl- Chitosan in Diluted Solutions. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, p. 141–147, 2003.

MOGHADDAM, A. S.; RAJI, A.; YAZDI, A. T. Effects of autologous keratinocyte cell spray with and without chitosan on third degree burn healing : An animal experiment. *Wounds*, v. 26, n.4, p. 109-117, 2014.

MOGOŞANU, 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.

MOHAMED, R. R.; ELELLA, M. H. A.; SABAA, M. W. Synthesis, characterization and applications of N-quaternized chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 149–161, 2015.

MOHANDAS, A. et al. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. **Bioactive Materials**, v. 3., n. 3, p. 267–277, 2018.

MORGADO, P. I. et al. Poly(vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 262–271, 2014.

MORGADO, P. I.; AGUIAR-RICARDO, A.; CORREIA, I. J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. **Journal of Membrane Science**, v. 490, p. 139–151, 2015.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v. 1, n. 1, p. 11–33, 2010.

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, 2009a.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009b.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I**. Advances in Polymer Science. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. v. 186, p. 151–209.

NASERI, N. et al. Electrospun chitosan-based nanocomposite mats reinforced with chitin nanocrystals for wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 7–15, 2014.

NISHIMURA, S.-I. et al. Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl)chitins. **Carbohydrate Research**, v. 146, n. 2, p. 251–258, 1986.

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

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 678–688, 2018.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1003–1011, 2017.

PASQUET, J. et al. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 457, n. 1, p. 263–274, 2014.

PATRULEA, V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417–426, nov. 2015.

PAUL, W.; SHARMA, C. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 1, p. 18–23, 2004.

PAVINATTO, A. et al. Frontiers in Biomaterials: Chitosan Based Materials and its Applications. In: PUBLISHERS, B. S. (Ed.). . **Frontiers in Biomaterials: Chitosan Based Materials and its Applications**. [s.l: s.n.]. p. 107–132.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1803–1815, 2013.

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

PEREIRA, G. G. et al. Polymeric films loaded with vitamin E and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed research international**, v. 2014, Article ID 641590, 9p., 2014.

PEREIRA, R. F. et al. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 603–621, abr. 2013.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

QIN, Y. Functional wound dressings. In: **Medical Textile Materials**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 89–107.

RAFIQUE, A. et al. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 141–154, 2016.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RINAUDO, M. et al. Substituent distribution on O, N-carboxymethylchitosans by ¹H and ¹³C n.m.r. **International journal of biological macromolecules**, v. 14, p. 1–7, 1992.

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

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281–285, 1993.

SABAA, M. W. et al. Crosslinked poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl chitosan hydrogels for removal of metal ions and dyestuff from aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 6, p. 3459–3469, 2012.

SABAA, M. W. et al. Synthesis, characterization and application of biodegradable crosslinked carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) clay nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 363–373, 2015.

SALGADO, C. L. et al. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 2, p. 659–667, 2012.

SANPUI, P. et al. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 142–146, 2008.

SANTOS, A. M. C. et al. Aqueous solution blow spinning of poly(vinyl alcohol) micro- and nanofibers. **Materials Letters**, v. 176, p. 122–126, 2016.

SANTOS, J. E. DOS et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242–249, dez. 2003.

SAREM, M.; MOZTARZADEH, F.; MOZAFARI, M. How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues? **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 635–643, 2013.

SHALUMON, K. T. et al. Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 863–869, 2009.

SHALUMON, K. T. et al. Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 247–254, 2011.

SHEN, J.-N.; RUAN, H.-M.; GAO, C.-J. Preparation and characterization of CMCS/PVA blend membranes and its sorption and pervaporation performance (I). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, n. 6, p. 3369–3378, 2009.

SHEVCHENKO, R. V; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 7, n. 43, p. 229–258, 2010.

SILVA, S. S. et al. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2764–74, 2008.

STUNOVA, A.; VISTEJNOVA, L. Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 39, n. January, p. 137–150, 2018.

SUDHEESH KUMAR, P. T. 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.

TAN, H. B. et al. Fabrication and Evaluation of Porous Keratin/chitosan (KCS) Scaffolds for Effectively Accelerating Wound Healing. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 28, n. 3, p. 178–89, 2015.

TANG, Y. et al. A thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel containing nanoparticles for drug delivery. **Polymer Bulletin**, v. 64, n. 8, p. 791–804, 2010.

TANG, Y. et al. Chitosan / titanium dioxide nanocomposite coatings : Rheological behavior and surface application to cellulosic paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 752–759, 2016.

TCHEMTCHOUA, V. T. et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3194–3204, 2011.

THOMAS, P. S. et al. FTIR Study of the Thermal Degradation of Poly(Vinyl Alcohol). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, n. 2001, p. 501–508, 2001.

TRIMUKHE, K. D.; VARMA, A. J. Metal complexes of crosslinked chitosans: Correlations between metal ion complexation values and thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 63–70, 2009.

TRINCA, R. B. et al. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. **European Polymer Journal**, v. 88, p. 161–170, 2017.

ULLAH, S.; ZAINOL, I.; IDRUS, R. H. Incorporation of zinc oxide nanoparticles into chitosan-collagen 3D porous scaffolds: Effect on morphology, mechanical properties and cytocompatibility of 3D porous scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1020–1029, 2017.

UPADHYAYA, L. et al. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 452–466, 2013.

UPADHYAYA, L. et al. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. **Journal of Controlled Release**, v. 186, p. 54–87, 2014.

VAGHANI, S. S. et al. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan hydrogel: Application as site specific delivery for lercanidipine hydrochloride. **Bulletin of Materials Science**, v. 35, n. 7, p. 1133–1142, 2012.

VICENTINI, D. S.; SMANIA, A.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 503–508, 2010.

WAHID, F. et al. Synthesis and Characterization of Antibacterial Carboxymethyl Chitosan/ZnO Nanocomposite Hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 273-279, 2016.

WAHID, F. et al. Preparation, characterization and antibacterial applications of carboxymethyl chitosan/CuO nanocomposite hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 690–695, 2017.

WANG, L. C. et al. Study on poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan blend film as local drug delivery system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1125–1133, 2007.

WANG, M. et al. Hierarchical porous chitosan sponges as robust and recyclable adsorbents for anionic dye adsorption. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 18054, 2017.

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

ZHAO, L. et al. Synthesis of antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogels with electron beam irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 439–446, 2003.

ZHAO, L. et al. Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 150–155, 2015.

ZHAO, Y. et al. A facile method for electrospinning of Ag nanoparticles/poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan nanofibers. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 22, p. 8867–8873, 2012.

ZHENG, M. et al. Synthesis, characterization and biological safety of O-carboxymethyl chitosan used to treat Sarcoma 180 tumor. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 231–238, ago. 2011.

ZHONG, Q. et al. Preparation and antibacterial properties of carboxymethyl chitosan/ZnO nanocomposite microspheres with enhanced biocompatibility. **Materials Letters**, v. 212, p. 58–61, 2018.

ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 510–525, 2010.