



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



Amanda Grizzo Gabriel

Nãotecidos de poli (ácido láctico) modificados com *whiskers* de beta-quitina e nanopartículas de prata visando aplicações como curativos de pele: uma comparação entre os métodos de eletrofiação e fiação por sopro em solução

São Carlos – SP

2021



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



Amanda Grizzo Gabriel

Nãotecidos de poli (ácido láctico) modificados com *whiskers* de beta-quitina e nanopartículas de prata visando aplicações como curativos de pele: uma comparação entre os métodos de eletrofiação e fiação por sopro em solução

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa (Embrapa Instrumentação)

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos – SP

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Gabriel, Amanda Grizzo

Nãotecidos de poli (ácido láctico) modificados com whiskers de beta-quitina e nanopartículas de prata visando aplicações como curativos de pele: uma comparação entre os métodos de eletrofiação e fiação por sopro em solução / Amanda Grizzo Gabriel. — São Carlos, 2021.

103 f.

Dissertação (Mestrado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

1. Polímeros (Materiais). 2. Curativos. 3. Poli (ácido láctico). 4. Quitina. 5. Nanopartícula de prata. I. Título.



AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, força, amparo e cuidado em todos os meus passos.

Aos professores Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e Dr. Daniel Souza Correa pela orientação, ensinamentos, amizade, incentivo, compreensão, dedicação e empenho durante os anos necessários para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu noivo, Marco Antonio, por estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando nos melhores e piores momentos. Obrigada por todo amor, carinho, companheirismo e amizade que você representa para mim todos os dias.

Aos meus pais, Sandra e Roberson, por sempre terem acreditado em mim e pelo esforço que vocês sempre fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. O carinho, amor, cumplicidade e amizade de vocês foram, são e continuarão sendo fundamentais em todos os passos que eu andar na minha caminhada.

A minha amiga Giovana por todo amor, carinho, incentivo e cumplicidade.

Aos meus amigos dos grupos de pesquisa do IQSC e da Embrapa instrumentação, em especial ao Dr. Danilo, por todo apoio, ensinamento, incentivo e dedicação.

Aos professores, técnicos e funcionários da USP e da Embrapa Instrumentação que colaboraram direta ou indiretamente para esse estudo com análises, ensinamentos e até mesmo com a manutenção das boas condições de trabalho.

A Universidade de São Paulo e a Embrapa Instrumentação pelas excelentes estruturas, as quais tive o prazer em frequentar e usufruir.

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

RESUMO

Membranas bicamadas compostas por nanofibras são materiais promissores para usos medicinais e farmacêuticos, como na liberação controlada de medicamentos e curativos para regeneração da pele, devido às suas propriedades singulares, tais como elevadas área superficial, porosidade e possibilidade de modificação superficial. Neste projeto, membranas bicamadas à base de poli (ácido láctico), PLA, obtidas pelas técnicas de fiação por sopro em solução (*solution blow spinning* - SBS) e eletrofiação (*electrospinning*), com superfícies modificadas por *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata (AgNP) foram desenvolvidas visando aplicações em curativos de pele. Os *whiskers* foram obtidos por hidrólise ácida de β -quitina e exibiram comprimento e diâmetro médios de aproximadamente $228 \text{ nm} \pm 114 \text{ nm}$ e $15 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, respectivamente. A síntese das AgNP, obtidas pelo método de Turkevich, foi confirmada pela banda de ressonância plasmônica em 401 nm no espectro de UV-vis. As micrografias de TEM mostraram que as AgNPs possuem formato esférico com diâmetro médio de $2,1 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$, as quais apresentaram potencial zeta de $-36,7 \text{ mV} \pm 8,1 \text{ mV}$ em média. As fibras, obtidas por SBS e eletrofiação, apresentaram diâmetros médios de $1,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e $346 \pm 81 \text{ nm}$, respectivamente, com ausência de defeitos (*beads*). A modificação das superfícies das membranas ocorreu por duas etapas, em que a primeira resultou na deposição de *whiskers* de β -quitina à superfície por meio de filtração de suspensão aquosa de *whiskers* e a segunda resultou na deposição de nanopartículas de prata por meio de aspersão utilizando o aparato de SBS. As imagens de MEV comprovaram a obtenção de membranas bicamadas, contendo duas camadas distintas, em que uma apresenta aspecto de fibras (PLA) e a outra de filme (*whiskers* ou *whiskers* + AgNP). A superfície da membrana contendo *whiskers* de β -quitina apresentou caráter hidrofílico, valores médios de ângulo de contato da água de $55,7^\circ \pm 4,5$ (fiação por sopro) e $59,2^\circ \pm 4,9$ (eletrofiação), em contraste com a face de PLA que apresentou caráter hidrofóbico (ângulo de contato da água $> 90^\circ$). As membranas exibiram valores de porosidades (%) elevados, na faixa de 82% a 92%. A modificação da superfície da membrana com as AgNPs conferiu atividade antimicrobiana às membranas bicamadas frente a bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*). Portanto, os resultados indicam que as membranas contendo PLA, *whiskers* β -quitina e AgNPs desenvolvidas neste estudo apresentam propriedades promissoras para utilização como curativos de lesões de pele.

Palavras-chave: Curativos. Membranas assimétricas. Membranas bicamadas. Poli (ácido láctico). *Whiskers* β -quitina. Nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Nanofibrous bilayered membranes are promising materials for medicinal and pharmaceutical uses, including in drug delivery and tissue engineering for wound dressings to treat skin injuries due to their unique properties including high surface area, porosity and the possibility of surface functionalization. In this study, PLA-based bilayered membranes were obtained by solution blow spinning (SBS) and electrospinning and modified with β -chitin whiskers and silver nanoparticles (AgNP). β -chitin whiskers were produced by acid hydrolysis and exhibited average length of $228 \text{ nm} \pm 114 \text{ nm}$ and an average width of $15 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$. AgNPs synthesized using the Turkevich method were confirmed by their characteristic plasmon resonance frequency (around 401 nm) using UV-vis spectroscopy. TEM images show that AgNPs have a spherical shape with an average diameter of 2.1 nm and an average zeta potential of -36.7 mV, which indicates the stability of the colloidal solution obtained. SEM images show that smooth, continuous and bead-free nanofibers were obtained, with diameters around $1.6 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{m}$ and $346 \pm 81 \text{ nm}$ for SBS and electrospinning, respectively. The modification of the membrane surface occurred by two steps; the first resulted in the deposition of β -chitin whiskers on surface by filtration and the second resulted in the deposition of silver nanoparticles using SBS apparatus. The SEM images confirmed the achievement of bilayered membranes. The membranes surface became hydrophilic by the deposition of the β -chitin whiskers (average contact angle of $55.7^\circ \pm 4.5$ for SBS and $59.2^\circ \pm 4.9$ for electrospinning), in contrast to the face of PLA that presented a hydrophobic character (water contact angle $> 90^\circ$). The membranes also showed high porosities (%), with values in the range of 82% to 92%. With the deposition of silver nanoparticles, the membranes surface exhibited antimicrobial activity against bacteria, such as Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli*. Therefore, the results indicate that the membranes containing PLA, β -chitin whiskers and silver nanoparticles developed in this study present promising properties to be used as a wound dressing.

Keywords: Wound dressing. Asymmetric membranes. Bilayered membranes. Poly (lactic acid). β -chitin *whiskers*. Silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.....	16
Figura 2 - Esquemática do aparato de eletrofiação.....	20
Figura 3 - Esquemática do aparato de fiação por sopro (SBS).....	22
Figura 4 - Estrutura do Poli (ácido láctico) (PLA).....	24
Figura 5 - (A) Estrutura primária de quitina, onde n é o grau de polimerização. (B) Representação esquemática das estruturas de quitina, na qual as setas indicam o sentido do terminal não-redutor para o redutor.....	26
Figura 6 - Esquema do método de produção das membranas bicamadas, mostrando a etapa de obtenção das fibras eletrofiação e fiação por sopro), a primeira modificação de superfície (filtração com suspensão de whiskers de β -quitina) e segunda modificação (aspersão de nanopartículas de prata).....	34
Figura 7 - Métodos estudados para modificação da superfície dos nãotecidos com whisker de β -quitina, a saber: filtração, imersão e aspersão.....	35
Figura 8 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de whiskers de β -quitina e suas respectivas distribuições de comprimento (nm) e diâmetro (nm).....	44
Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata e gráfico representando a distribuição de seus diâmetros (nm).....	45
Figura 10 - Curvas de intensidade (%) dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas de prata.....	46
Figura 11 - Imagens das mantas de PLA obtidas pelos processos de (A) SBS ação por sopro e (B) eletrofiação.....	48
Figura 12 - Micrografias das superfícies das mantas de PLA obtidas pelos processos de (A) SBS e (B) eletrofiação e seus respectivos histogramas de diâmetro das fibras.....	49
Figura 13 - Micrografias das superfícies das membranas obtidas por SBS (A) modificada com <i>whiskers</i> de β -quitina e (B) <i>whiskers</i> de β -quitina e AgNP, e por eletrofiação (C) modificada com <i>whiskers</i> de β -quitina e (D) <i>whiskers</i> de β -quitina e AgNP, evidenciando as faces com e sem modificação, e suas respectivas imagens macroscópicas.....	51
Figura 14 – Gráficos de energia dispersiva (EDS) das as faces contendo AgNP + <i>whiskers</i> das membranas obtidas por SBS e eletrofiação.....	52
Figura 15 - Representação do mecanismo da síntese de Nanopartículas de prata, mostrando suas etapas de redução, aglomeração e por fim, formação das nanopartículas.....	54
Figura 16 - (A) Espectro de UV-Vis das nanopartículas de prata (AgNP) sintetizadas e (B) Solução coloidal de nanopartículas de prata sintetizada.....	55
Figura 17 - (A) Espectro de UV-Vis das nanopartículas de prata (AgNP) durante o período de 43 dias, sendo medidas a cada 7 dias.....	56

Figura 18 - Espectros na região de infravermelho dos materiais: a) <i>whisker</i> de β -quitina e b) Fibras de PLA obtidas pelos processos de eletrofição e SBS.....	58
Figura 19 - Espectros na região de infravermelho das membranas: Fibras de PLA (SBS) + <i>whisker</i> de β -quitina, e fibras de PLA (SBS) + <i>whisker</i> de β -quitina + AgNP, evidenciando ambas as faces das membranas.....	60
Figura 20 - Espectros na região do infravermelho dos materiais: Fibras de PLA (eletrofição) + <i>whisker</i> de β -quitina, e Fibras de PLA (eletrofição) + <i>whisker</i> de β -quitina + AgNP, evidenciando ambas as faces das membranas.....	61
Figura 21 - Curvas de TG (a) e DTG (b) dos <i>whiskers</i> de β -quitina.....	63
Figura 22 - Curvas de TG (a) e DTG (b) das membranas bicamadas.....	64
Figura 23 - Ângulo de contato médio das membranas bicamadas produzidas pelos métodos de a) SBS e b) eletrofição e suas conseguintes modificações com whiskers de β -quitina e AgNP.....	68
Figura 24 - Curvas de Potencial zeta (mV) versus pH das membranas bicamadas obtidas por (a) processo de SBS e (b) processo de eletrofição.....	71
Figura 25 - Porosidade média (%) das membranas bicamadas.....	73
Figura 26 - Propriedades mecânicas das membranas. (A) Stress (MPa) versus Strain (%), (B) Alongamento (%), (C) Módulo de elasticidade (MPa), (D) Tensão de ruptura (MPa).....	75
Figura 27 - Imagem de membrana composta por camada de PLA + camada de whiskers de β -quitina obtida pelo processo de SBS logo após ruptura no experimento de tração.....	77
Figura 28 - Experimento de disco-difusão em ágar das amostras após as 2 etapas de modificação em relação à <i>S. aureus</i>	80
Figura 29 - Experimento de disco-difusão em ágar das amostras após as 2 etapas de modificação em relação à <i>E. coli</i>	81
Figura 30 - Curvas de degradação enzimática das membranas em tampão PBS e solução de lisozima.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetros médios das fibras e espessuras médias das membranas de PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofiação.....	53
Tabela 2 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica dos <i>whiskers</i> de β -quitina.....	63
Tabela 3 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas bicamadas.....	65
Tabela 4 - Halos de inibição médios obtidos para as bactérias Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> e Gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> de membranas bicamadas obtidas por SBS e eletrofiação modificadas com <i>whiskers</i> de β -quitina e nanopartículas de prata.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AgNP	Nanopartícula de prata
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMF	N,N-Dimetilformamida
EDS	Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
GlcN	2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose
MEV	Microscopia eletrônica de transmissão
MIC	Concentração inibitória mínima (MIC)
PBS	Tampão fosfato estéril
PEO	Poli (óxido de etileno)
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PLA	Poli (ácido láctico)
PS	Poliestireno
SBS	Solution blow spinning
TCC	Trifeniltetrazolium
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
\overline{DA}	Grau médio de acetilação
\overline{M}_w	Massa molar média
\overline{M}_v	Massa molar média viscosimétrica
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca do polímero

SUMÁRIO

1	Motivação	13
2	Introdução e Revisão Bibliográfica.....	16
2.1	Pele.....	16
2.2	Feridas e curativos.....	18
2.3	Técnica de eletrofiação.....	20
2.4	Técnica de fiação por sopro (<i>Solution Blow Spinning - SBS</i>)	22
2.5	Poli (ácido láctico) (PLA).....	24
2.6	Beta-quitina e <i>Whiskers</i>.....	25
2.7	Nanopartículas de prata (AgNP).....	28
3	Objetivos.....	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	Materiais e métodos.....	31
4.1	β-quitina	31
4.2	Preparo da suspensão de <i>Whiskers</i> de β-quitina.....	32
4.3	Síntese de nanopartículas de prata	32
4.4	Processo de eletrofiação	33
4.5	Processo de fiação por sopro em solução.....	33
4.6	Modificação dos nãotecidos	34
4.6.1	Modificação da superfície dos nãotecidos com <i>Whiskers</i> de β-quitina.....	35
4.6.2	Modificação da superfície dos nãotecidos com Nanopartículas de prata.....	36
4.7	Caracterizações.....	36
4.7.1	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	36
4.7.2	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ) das nanopartículas de prata.....	37
4.7.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.7.4	Espectroscopia no UV-Vis	37

4.7.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	37
4.7.6 Análise termogravimétrica (TGA).....	37
4.7.7 Medidas de ângulo de contato	38
4.7.8 Potencial zeta de superfície	38
4.7.9 Porosidade (%)	38
4.7.10 Propriedades mecânicas (tração)	39
4.7.11 Concentração inibitória mínima (MIC)	39
4.7.13 Degradação enzimática.....	41
4.7.14 Análise estatística	42
5 Resultados e discussão.....	43
5.1 Morfologias dos whiskers de β-quitina	43
5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) das AgNPs.....	44
5.3 Morfologia das membranas bicamadas.....	47
5.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	57
5.6 Análise termogravimétrica	62
5.7 Medidas de ângulo de contato	66
5.8 Potencial zeta de superfície.....	70
5.9 Porosidade (%)	72
5.10 Propriedades mecânicas (Tração).....	74
5.11 Atividade antimicrobiana	78
5.12 Degradação enzimática	83
6 Conclusões e perspectivas	87
7 Referências bibliográficas.....	89

1 Motivação

A pele, além de ser o maior órgão do corpo humano, é fundamental para manter o bom funcionamento do organismo, tendo a capacidade de regular a temperatura, evitar a desidratação, contribuir para a produção de vitamina D3 e proteger órgãos (ECHEVERRÍA et al., 2019; WU et al., 2020). Todas estas funções podem ser afetadas quando ocorrem cortes, queimaduras ou feridas (ECHEVERRÍA et al., 2019; GE et al., 2020). Estima-se que 60 milhões de pessoas no mundo já tenham sido acometidas por feridas crônicas ou complexas, o que representa um sério desafio para os sistemas de saúde globais (ECHEVERRÍA et al., 2019). Para um tratamento adequado de feridas, é necessário um curativo com alta eficiência a fim de constituir um ambiente ideal para a regeneração da epiderme, e fornecer uma barreira contra perda de água e agentes patogênicos (KALANTARI et al., 2020).

Apesar de existirem diversos curativos comercialmente disponíveis, eles não possuem todas as características necessárias de um curativo multifuncional capaz de acelerar a cicatrização da pele (KALANTARI et al., 2020). Em situação ideal, um curativo deve: i) atuar como barreira contra elementos e invasão de organismos patogênicos; ii) absorver exsudatos excedentes e manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida; iii) permitir a troca gasosa e de nutrientes; iv) não ser tóxico ou alergênico; v) proporcionar proteção contra infecções e vi) estimular o processo de regeneração tecidual (ARAGÓN et al., 2019; GHOSAL et al., 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Portanto, materiais para tratamento de feridas que atendam esses requisitos têm sido amplamente estudados (GHOSAL et al., 2019; HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020).

Entre os materiais estudados, destacam-se as membranas bicamadas à base de nãotecidos, especialmente os biodegradáveis, por possuírem a capacidade de mimetizar a matriz extracelular (ARAGÓN et al., 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). A obtenção de nãotecidos pode ser obtida de diversas formas, sendo amplamente utilizadas as técnicas de eletrofiação e fiação por sopro por proporcionarem materiais com fibras de diâmetro micro e nanométrico, altas razão área superficial/volume e porosidade, apresentando similaridade com a matriz extracelular (DOS SANTOS et al., 2020; MELE, 2016). Embora a eletrofiação seja uma técnica poderosa e amplamente estudada, requer equipamentos especializados, altas tensões e alvos eletricamente condutores, além de possuir taxa de deposição relativamente baixa (BEHRENS et al., 2014). Recentemente, a técnica de fiação por sopro tem demonstrado grande potencial para produção de nãotecidos, sendo uma alternativa à técnica de eletrofiação. Apresenta como vantagem o uso de um aparato simples, que não

necessita de altas tensões, gerando fibras com diâmetros próximos àqueles das fibras eletrofiadas e taxa de deposição 10 vezes maior (BEHRENS et al., 2014; DARISTOTLE et al., 2016).

Polímeros sintéticos e naturais têm sido utilizados no desenvolvimento de nãotecidos por meio de ambas as técnicas (MEDEIROS et al., 2009; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). O poli (ácido láctico) (PLA) destaca-se por apresentar propriedades interessantes como biodegradabilidade, baixo custo de produção, baixo impacto ambiental, compatibilidade com biomoléculas e células (BELTRÁN et al., 2018). Nanofibras à base de PLA têm sido bastante utilizadas para produção de curativos, pois possuem a capacidade de mimetizar a topografia nativa do leito dérmico, ajudam a proteger o leito da ferida e sua relação área/ volume estimula a fixação e proliferação das células, promovendo o fechamento de grandes feridas (ECHEVERRÍA et al., 2019; LIU et al., 2017c; LOCILENTO et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2018). Contudo, estes materiais possuem caráter hidrofóbico, apresentando limitações para utilização em feridas com liberação de exsudato, uma vez que possuem baixa capacidade de absorvê-lo, além de não serem capazes de manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida (CHITRATTHA; PHAECHAMUD, 2016; ZOU; SUN; WANG, 2019). Os materiais à base de PLA também não possuem atividade antimicrobiana, propriedade importante para evitar infecção de lesões de pele.

Estratégias para aumentar o caráter hidrofílico e conferir bioatividade a estes materiais têm sido propostas. Dentre as abordagens utilizadas, está a modificação da superfície dos nãotecidos com nanomateriais poliméricos e metálicos. *Whiskers* de quitina são nanocristais alongados biocompatíveis, biodegradáveis, não-tóxicos, de caráter hidrofílico e renovável, sendo obtidos pela hidrólise ácida da quitina. Neste estudo, uma das superfícies dos nãotecidos de PLA foi modificada com *whiskers* de β -quitina de modo a torná-la hidrofílica, solucionando a limitação da hidrofobicidade do PLA. Geralmente os *whiskers* são utilizados como aditivos na produção de nanofibras, sendo a abordagem de pós-processamento por modificação da superfície com estes materiais pouco explorada (LI et al., 2019b; ZENG et al., 2012).

O uso de nanopartículas de prata no desenvolvimento de materiais curativos também é amplamente difundido, uma vez que elas apresentam eficácia contra bactérias comumente envolvidas no processo de infecção de lesões de pele, como *S. aureus* e *E. coli* (MORONES et al., 2005; RAI; YADAV; GADE, 2009; ZHENG et al., 2018). As membranas bicamadas de PLA e *whiskers* passaram por uma segunda modificação, em que nanopartículas de prata foram

aspergidas sobre sua superfície, a fim de conferir capacidade de inibição de crescimento de bactérias ao curativo, visando a impedir infecção no ferimento cutâneo.

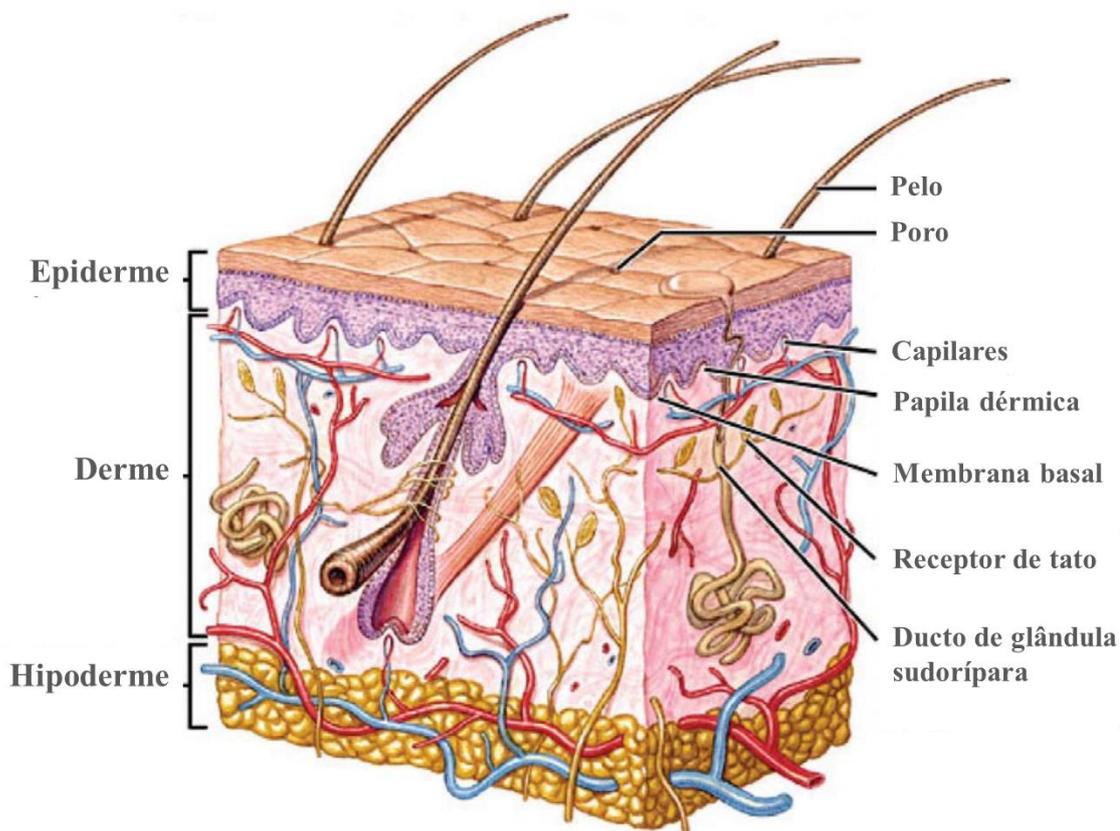
Portanto, o presente estudo visa ao desenvolvimento de membranas bicamadas pela combinação de materiais nãotecidos de PLA, *whiskers* de β -quitina e de nanopartículas de prata buscando explorar suas propriedades de forma a obter um curativo multifuncional. Os nãotecidos de PLA foram produzidos pelas técnicas de eletrofiação e fiação por sopro em solução, de modo a comparar as técnicas em destaque na literatura e as propriedades das fibras obtidas por elas.

2 Introdução e Revisão Bibliográfica

2.1 Pele

A pele, cuja representação esquemática é mostrada na Figura 1, é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% da massa corporal. Possui inúmeras funções cruciais para o bom funcionamento do organismo, como regular a temperatura, evitar a desidratação, contribuir para produção de vitamina D, além de isolar o ambiente interno do externo, evitando invasões físicas, químicas e microbianas, protegendo o corpo (ECHEVERRÍA et al., 2019; XU et al., 2020).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de Macneil,S. (2008).

Conforme é possível observar na Figura 1, a pele apresenta estrutura de multicamadas, sendo: epiderme, derme e hipoderme (MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). A epiderme é a camada mais externa da pele, com uma espessura média de 150 µm, representando a principal barreira contra fatores ambientais externos, como radiação UV, agentes microbianos e traumas mecânicos, além de manter a hidratação do corpo (DERVISEVIC et al., 2020; KALANTARI et al., 2020; MOEINI et al., 2020). É constituída

majoritariamente por queratinócitos, mas também estão presentes corneócitos, células de Langerhans, células de Merkel, células T CD8+ e células tronco (SOUTO et al., 2020). O queratinócito é o tipo de célula mais predominante na pele e desempenha um papel crítico no seu processo de regeneração, pois além de apresentar importância estrutural, também secreta moléculas com atividades antibacterianas (PETTY et al., 2020).

A camada interna imediatamente adjacente à epiderme é a derme, ou também chamada de camada intermediária, cuja espessura varia de 500 a 2000 μm , dependendo de sua localização no corpo (MOEINI et al., 2020). Esta camada é um tecido conjuntivo rico em colágeno, sendo a camada mais espessa das camadas que compõem a estrutura da pele (DERVISEVIC et al., 2020; MOEINI et al., 2020). É constituída pela matriz extracelular, células vivas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e apêndices cutâneos (glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos capilares), fornecendo suporte estrutural, função glandular e irrigação (DEBABOV; BOGUSH, 2020; MOEINI et al., 2020; SOUTO et al., 2020). Dentre as células presentes na epiderme encontram-se os majoritariamente os fibroblastos, eles liberam colágeno e elastina, que são responsáveis pela resistência mecânica e elasticidade da pele (MOEINI et al., 2020). O limite entre as camadas da epiderme e da derme é chamado de junção dermoepidérmica, na qual as células basais da epiderme estão fixadas à membrana basal. Esta é uma membrana porosa que fornece espaço para nutrientes e troca de fluidos, atuando como reservatório para moléculas necessárias para diversas finalidades, como biológica, imunológica e cicatrização de feridas (DERVISEVIC et al., 2020).

A hipoderme é a camada mais interna da pele, localizada diretamente abaixo da derme e acima do músculo (DERVISEVIC et al., 2020; MOEINI et al., 2020). Composta principalmente por adipócitos (células de gordura), a hipoderme contém uma rede de septos fibrosos formados por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e colágeno (DERVISEVIC et al., 2020). É responsável não somente pelo isolamento térmico e proteção mecânica do corpo, mas também desempenha um papel importante na regulação das camadas superiores da pele, derme e epiderme (DERVISEVIC et al., 2020; MOEINI et al., 2020). Em particular, a hipoderme suporta a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, cicatrização de feridas e regula a ciclagem dos folículos capilares (DERVISEVIC et al., 2020).

2.2 Feridas e curativos

Quando a pele é acometida por cortes, queimaduras, incisões cirúrgicas ou doenças, como diabetes, todas as funções desempenhadas por este órgão podem ser comprometidas (ECHEVERRÍA et al., 2019; SIMÕES et al., 2018). Uma vez que o tecido cutâneo é comprometido, sua estrutura e funções devem ser reestabelecidas o mais rápido possível, de modo a garantir a homeostase corporal (SIMÕES et al., 2018).

As feridas são classificadas como abertas e fechadas, a depender de sua natureza (MOEINI et al., 2020). Entre as feridas fechadas estão contusão, hematoma e abrasões (MOEINI et al., 2020). Entre as feridas abertas estão lacerações, feridas com ferramentas de punção e corte, feridas cirúrgicas, picadas de insetos, lesões vasculares e metabólicas (MOEINI et al., 2020). Além disso, as feridas podem ser clinicamente classificadas em agudas e crônicas (SIMÕES et al., 2018). As feridas agudas ocorrem repentinamente, como consequência de escoriações, radiação, mudanças extremas de temperaturas, incisões, lacerações e punções, cujo tempo de cicatrização está associado ao seu tamanho e profundidade, levando em média 8 a 12 semanas para cicatrização espontânea (MOEINI et al., 2020; SIMÕES et al., 2018). Já as feridas crônicas podem ser úlceras de pressão, diabéticas, venosas e por insuficiência arterial (SIMÕES et al., 2018). Geralmente este tipo de feridas requer maior tempo de cicatrização (de até alguns meses) devido à inflamação prolongada, sendo consequência, na maioria das vezes, de colonização por bactérias (MOEINI et al., 2020; SIMÕES et al., 2018).

No ano de 2019, estima-se que cerca de 60 milhões de pessoas tenham sido acometidas por feridas crônicas e complexas, representando um sério desafio para os sistemas de saúde globais (ECHEVERRÍA et al., 2019). Para um tratamento adequado de feridas, é necessário um material de fechamento com alta eficiência que deve constituir um ambiente ideal para a regeneração da epiderme, e fornecer uma barreira contra a perda de água e infecção da ferida crônica (KALANTARI et al., 2020). Portanto, os curativos são fundamentais para tratamento de feridas cutâneas. Estima-se que o mercado global desses produtos, que atingiu mais de US\$ 17 bilhões em 2016, ultrapasse US\$ 20 bilhões em 2021, devido ao envelhecimento da população e ao aumento da incidência de doenças crônicas como diabetes (HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020).

Os curativos para feridas cutâneas atualmente disponíveis no mercado são, geralmente, na forma de hidrogeis, filmes, esponjas e espumas (HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020). Entretanto, curativos comerciais geralmente são secos e, às vezes, se fixam na superfície da ferida causando desconforto e dor quando removidos, além de não possuírem as características

necessárias para atuarem como um curativo funcional capaz de acelerar a cicatrização da pele (KALANTARI et al., 2020). Um curativo funcional deve cumprir uma série de pré-requisitos, como: i) atuar como barreira contra elementos e invasão de organismos patogênicos; ii) absorver exsudatos excedentes e manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida; iii) permitir a troca gasosa e de nutrientes; iv) não ser tóxico ou alergênico; v) proporcionar proteção contra infecções e vi) estimular o processo de regeneração tecidual (ARAGÓN et al., 2019; GHOSAL et al., 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Embora nos últimos anos tenha ocorrido grande avanço no desenvolvimento de materiais voltados para uso como curativos, ainda são necessárias pesquisas para produção de um material que atenda a todos os requisitos mencionados anteriormente. Dentre os tipos de materiais desenvolvidos atualmente com potencial utilização como curativos estão as membranas bicamadas compostas por nanofibras ou não tecidos, que possuem a capacidade de mimetizar a matriz extracelular da pele. A camada externa protege a lesão contra danos físicos e agentes infecciosos de maneira semelhante à epiderme, e a camada interna mais hidrofílica permite a absorção de exsudatos, mimetizando a estrutura da derme (ARAGÓN et al., 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015).

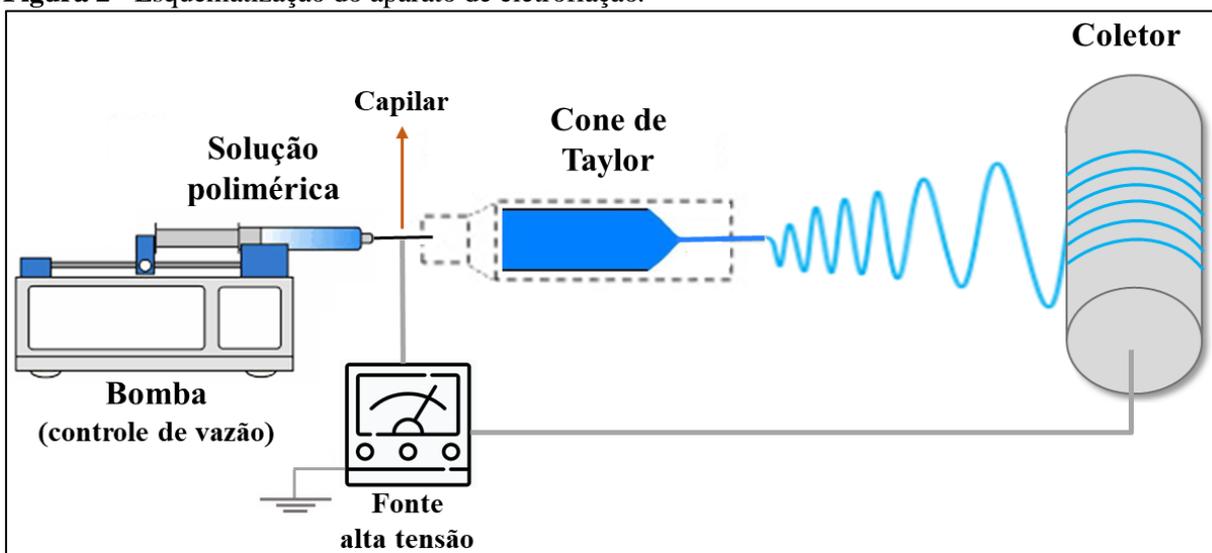
De acordo com a norma NBR-13370, não tecido é uma estrutura plana, flexível e porosa, constituída de véu ou manta de fibras ou filamentos, orientados direcionalmente ou ao acaso, consolidados por processo mecânico (fricção) e/ou químico (adesão) e/ou térmico (coesão) e combinações destes (ABNT, 2017). Estes materiais representam uma nova classe de materiais para serem utilizados como curativos, os quais oferecem inúmeras vantagens, como elevadas porosidade, área superficial e possibilidade de funcionalização química (PAN et al., 2017), sendo bastante estudados não somente como curativos para lesões de pele (DU et al., 2016), mas também como meios de filtração (ZHOU; LIN; WU, 2016), *scaffolds* para engenharia de tecidos (MAGIERA et al., 2017) e liberação controlada de drogas (DOS SANTOS et al., 2020a). A indústria global de não tecidos cresceu sucessivamente na última década, a uma taxa de 6 a 7% ao ano, o que demonstra sua importância comercial (BANERJI et al., 2019).

Existem diversas técnicas que possibilitam a produção de não tecidos para aplicação biomédica, como eletrofiação, fiação por sopro em solução, fiação centrífuga e fiação microfluídica (DOS SANTOS et al., 2020b). Este estudo baseou-se nas técnicas de eletrofiação e fiação por sopro em solução para produção dos não tecidos, uma vez que estas são as mais comumente encontradas na literatura para obtenção deste tipo de material.

2.3 Técnica de eletrofiiação

A eletrofiiação é uma técnica que vem sendo amplamente estudada nos últimos anos para produção de micro- e nanofibras devido à sua versatilidade, reprodutibilidade e às características finais das fibras (DOS SANTOS et al., 2020b). As fibras apresentam altas área superficial e porosidade, características interessantes para utilização como curativos, permitindo a alta permeação de gases e nutrientes (ADELI; KHORASANI; PARVAZINIA, 2019; ARAGÓN et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2020b; ECHEVERRÍA et al., 2019). Além disso, as fibras possuem estrutura semelhante à matriz extracelular, funcionando como suporte para fixação e proliferação de células (ADELI; KHORASANI; PARVAZINIA, 2019; ARAGÓN et al., 2019; ECHEVERRÍA et al., 2019). Um esquema do aparato de eletrofiiação pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Esquemática do aparato de eletrofiiação.



Fonte: Autoria própria.

O processo de eletrofiiação depende da aplicação de um campo elétrico elevado entre o capilar metálico, podendo ser este uma agulha na ponta de uma seringa na qual está contida a solução polimérica, e um coletor metálico, no qual se dará a deposição das nanofibras (CASASOLA et al., 2014). Dessa forma, a solução polimérica é injetada sob fluxo controlado por uma bomba, gerando uma gota na ponta do capilar, que é mantida pela tensão superficial (CASASOLA et al., 2014). Alta tensão elétrica é aplicada entre o capilar e o coletor, da ordem de 5 a 30 kV, resultando em incremento na densidade de carga de mesmo sinal na superfície da gota da solução polimérica (MELE, 2016). Forças eletrostáticas são geradas pela repulsão entre essas cargas, contrapondo as forças de tensão superficial e modificando a geometria da gota. À

medida que as forças elétricas superam a força de tensão superficial da gota, esta assume a forma de um cone, conhecido como cone de Taylor, pelo qual são ejetados jatos finos de solução polimérica eletricamente carregada (MELE, 2016). No trajeto entre a agulha e o coletor, o solvente é evaporado, levando à formação de uma manta formada por fibras que pode ser extraída posteriormente do um coletor (CASASOLA et al., 2014; GHOSAL et al., 2019; MELE, 2016).

Os parâmetros que podem influenciar na produção das fibras são divididos em três categorias: solução, processo e ambientais (REPANAS; ANDRIOPOULOU; GLASMACHER, 2016). Como parâmetros mais significativos da solução estão o tipo de polímero, massa molar, concentração, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica; estes são determinados principalmente pelas características do polímero e do solvente (HU et al., 2014; REPANAS; ANDRIOPOULOU; GLASMACHER, 2016). Como parâmetros do processo podem ser citados a tensão, taxa de fluxo, distância capilar-coletor (distância de trabalho) e tipo de coletor (HU et al., 2014). A tensão aplicada é um parâmetro de grande importância, pois somente após atingido um limiar de tensão elétrica se inicia o processo de eletrospinning. Estudos indicam que altas tensões são mais propensas à obtenção de fibras com diâmetros menores, entretanto, a formação de *beads* (defeitos em formato de contas) é mais pronunciada; o nível de significância da influência deste parâmetro varia com a concentração da solução e distância de trabalho (REPANAS; ANDRIOPOULOU; GLASMACHER, 2016). Quando os solventes são voláteis, taxas de fluxo e tensões mais altas são mais frequentemente utilizadas, entretanto, taxas de fluxo mais altas também ocasionam aumento da espessura das fibras (REPANAS; ANDRIOPOULOU; GLASMACHER, 2016). A distância de trabalho é outro fator importante, pois deve haver uma distância mínima para que a evaporação do solvente seja efetiva e o jato consiga chegar ao coletor de maneira desejável (RODRÍGUEZ-TOBIÁS; MORALES; GRANDE, 2019). Os parâmetros ambientais são temperatura e umidade relativa, a primeira afeta a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução, sendo que baixas temperaturas levam a viscosidades altas e assim, fibras mais espessas; já o efeito da umidade relativa é dependente da natureza da solução (HU et al., 2014; REPANAS; ANDRIOPOULOU; GLASMACHER, 2016; RODRÍGUEZ-TOBIÁS; MORALES; GRANDE, 2019).

Os materiais não tecidos obtidos por esta técnica são formados por fibras apresentando diâmetro, usualmente, na escala micro- e nanométrica e apresentam similaridade com a matriz extracelular, funcionando como suportes para fixação e proliferação de células, além de apresentarem elevadas razão área superficial/volume e porosidade, o que propicia a permeação

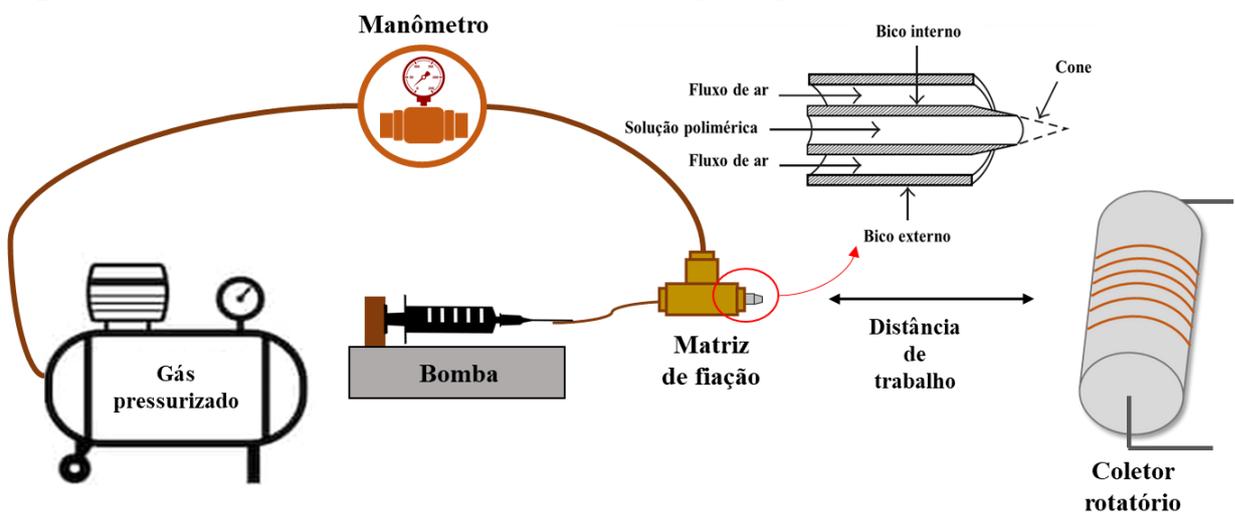
de gases, transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio hídrico no leito da ferida (ADELI; KHORASANI; PARVAZINIA, 2019; ARAGÓN et al., 2019; ECHEVERRÍA et al., 2019). Embora a eletrofiação seja uma técnica versátil e amplamente estudada, requer equipamentos especializados, altas tensões elétricas e alvos eletricamente condutores, além de possuir taxa de deposição relativamente baixa (BEHRENS et al., 2014).

A obtenção de fibras com morfologia, porosidade, área de superfície e resistência mecânica adequadas para utilização do material como curativo é diretamente dependente da alteração e combinação dos processos acima citados (GHOSAL et al., 2019). Assim sendo, a etapa de otimização combinada destes parâmetros é fundamental para a obtenção de fibras com diâmetros e morfologias desejáveis.

2.4 Técnica de fiação por sopro em solução (*Solution Blow Spinning - SBS*)

O método de fiação por sopro em solução (do inglês *solution blow spinning (SBS)*), é uma técnica alternativa à eletrofiação para produção de fibras micro- e nanométricas. O SBS apresenta algumas vantagens, pois não requer fonte de alta tensão, permite a deposição das fibras *in situ*, e possui maior produtividade, características estas que são vantajosas para a produção de curativos (BEHRENS et al., 2014; DARISTOTLE et al., 2016; KENRY; LIM, 2017; MEDEIROS et al., 2009; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014).

Figura 3 – Esquematização do aparato de *Solution Blow Spinning (SBS)*.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2013).

No aparato há um par de bicos concêntricos, conforme ilustrado na Figura 3, nos quais uma solução de polímero é forçada através do bico interno a uma taxa de fluxo controlada por uma bomba de infusão (OLIVEIRA et al., 2013; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014). A

gota formada na ponta do bico interno é então esticada por um fluxo de gás de alta pressão, o qual é controlado por um manômetro, e que flui ao redor da gota através do bico externo (OLIVEIRA et al., 2013; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014). Isso faz com que a superfície da gota se distorça em uma forma cônica (OLIVEIRA et al., 2013; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014). Quando a pressão crítica do ar é excedida, múltiplos filamentos do polímero são lançados em direção a um coletor. Enquanto estes filamentos percorrem a distância de trabalho, são estirados e ocorre a evaporação do solvente (OLIVEIRA et al., 2013; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014).

De forma semelhante ao processo de eletrofiação, a fiação por sopro em solução é influenciada por parâmetros experimentais incluindo a pressão do ar, a distância entre o coletor e o bico interno (distância de trabalho), a distância entre o bico interno e o externo (distância de protrusão), a taxa de fluxo da solução, a rotação do coletor, além dos parâmetros ambientais, como temperatura e umidade e também os parâmetros da solução, como massa molar do polímero, concentração e solvente utilizado (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

Como exemplo de parâmetros do processo, grupos de pesquisa relataram que o diâmetro da fibra é afetado apenas pela taxa de fluxo da solução de polímero a baixas pressões de gás. As taxas utilizáveis variam, normalmente, entre 0,02 a 1 mL min⁻¹ (DARISTOTLE et al., 2016). A pressão do gás deve ser suficiente para efetiva distorção do formato da gota e consequente formação de filamentos, porém não deve ser alta a ponto de não permitir a evaporação do solvente, ocasionada pela diminuição da temperatura no dispositivo SBS devido à expansão do gás (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013). O solvente escolhido deve ser capaz de solubilizar de maneira satisfatória o polímero a ser utilizado, cuja concentração deve alta o suficiente de modo a permitir a formação de fibras e impedir a formação de *beads*. Por fim, a massa molar do polímero deve ser alta a ponto de criar emaranhados entre as cadeias poliméricas, produzindo um tempo de relaxação do polímero suficientemente alto (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

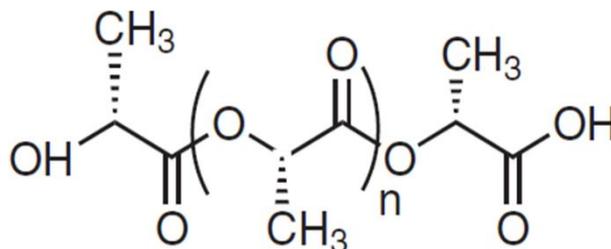
De modo semelhante à técnica de eletrofiação, a obtenção de fibras com morfologia, porosidade, área de superfície e resistência mecânica adequadas para utilização do material como curativo é diretamente dependente da combinação dos parâmetros citados anteriormente. Assim sendo, a obtenção de fibras pela técnica de fiação por sopro em solução também pode apresentar dificuldades, devido à necessidade de otimização de parâmetros de modo a obter fibras com dimensões e morfologias adequadas às aplicações pretendidas.

2.5 Poli (ácido láctico) (PLA)

O poli (ácido láctico) (PLA), Figura 4, é um poliéster alifático; cuja obtenção se dá por meio da fermentação da glicose derivada de fontes como milho, batata, beterraba ou cana de açúcar. A síntese do poli (ácido láctico) pode ocorrer por policondensação de ácido láctico ou polimerização por abertura de anel do dímero cíclico do ácido láctico, utilizando um catalisador adequado (BELTRÁN et al., 2018; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

O PLA é um polímero de grande relevância, cuja produção industrial global atingiu 0,5 milhão de toneladas em 2020 (BELTRÁN et al., 2018; NARAYANAN et al., 2016). Dentre suas propriedades destacam-se a versatilidade de processamento, produção de baixo custo, baixo impacto ambiental e propriedades mecânicas semelhantes às do poliestireno (PS) ou poli (tereftalato de etileno) (PET) (BELTRÁN et al., 2018; NARAYANAN et al., 2016). Adicionalmente, o PLA é largamente empregado em aplicações biomédicas, pois associa biocompatibilidade e biodegradabilidade.

Figura 4 - Estrutura do poli (ácido láctico) (PLA).



Fonte: Adaptado de CASTRO-AGUIRRE et al. (2016).

Estas características conjuntas têm impulsionado seu uso na produção de micro- e nanofibras (ECHEVERRÍA et al., 2019; LOCILENTO et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2018). por eletrofiação e SBS visando aplicações em curativos de pele, incluindo no desenvolvimento de membranas bicamadas (CHAGAS et al., 2021; HARTMANN, 1998; SANTORO et al., 2016). Contudo, estes materiais possuem caráter hidrofóbico, limitando sua aplicação para feridas com liberação de exsudato, uma vez que possuem baixa capacidade de absorvê-lo, além de não manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida (CHITRATTHA; PHAECHAMUD, 2016; ZOU; SUN; WANG, 2019). Os materiais à base de PLA também não possuem atividade antimicrobiana, propriedade importante para impedir infecção de lesões de pele (LIU et al., 2017a).

Nesse sentido, estratégias para aumentar o caráter hidrofílico e conferir bioatividade a estes materiais têm sido propostas (LIU et al., 2017c; LOCILENTO et al., 2019; SCHNEIDER

et al., 2018). Dentre as abordagens utilizadas, está a utilização de blendas poliméricas ou a modificação da superfície dos nãotecidos com nanomateriais poliméricos e metálicos. Como exemplo da utilização de nanofibras de PLA para aplicações biomédicas, pode ser citado o estudo realizado por Locilento et al. (2019), os quais desenvolveram membranas à base de PLA e poli(óxido de etileno) (PEO) como matriz e adição de extrato de semente de uva, rico em antioxidantes, pela técnica de eletrofiação. Os experimentos de cultura com células de fibroblastos mostraram biocompatibilidade e mostraram que as nanofibras de PLA/PEO carregadas com extrato de semente de uva suportaram uma melhor fixação e proliferação celular que as nanofibras de PLA com extrato de semente de uva, devido à maior hidrofiliabilidade gerada pela presença do PEO.

No presente estudo foram propostas modificações da superfície dos nãotecidos de PLA, visando conferir caráter hidrofílico e antimicrobiano à superfície em contato com a pele, de modo a absorver o exsudato em excesso liberado em feridas (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; WU et al., 2016). As modificações devem ocorrer apenas em uma das faces, de modo que a face externa apresente comportamento hidrofóbico, evitando a desidratação do leito da ferida. Assim, a membrana bicamada produzida deve ser capaz de manter o equilíbrio de umidade na ferida (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; WU et al., 2016).

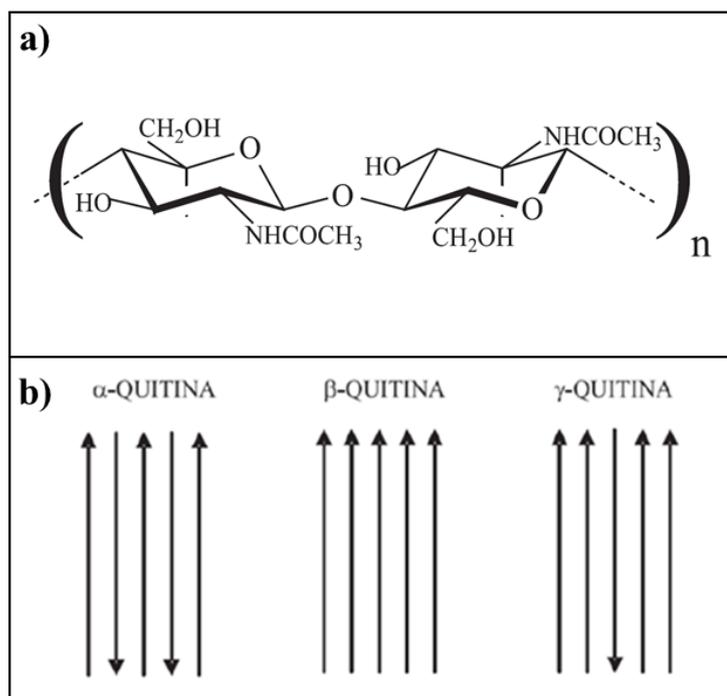
Para conferir caráter hidrofílico às mantas, foram utilizados *whiskers* de quitina, obtidos pela hidrólise ácida da quitina, que são biocompatíveis, biodegradáveis e não-tóxicos, além de apresentarem caráter hidrofílico e renovável (ANDRE et al., 2020; FACCHINATTO et al., 2021). Dessa forma, são potenciais matérias-primas para a produção de curativos de pele, e a modificação da superfície dos nãotecidos com este material tem o intuito de tornar a superfície interna da membrana bicamada hidrofílica. Geralmente os *whiskers* são utilizados como aditivos na produção de nanofibras, sendo a abordagem de pós-processamento por modificação da superfície com estes materiais ainda pouco explorada (LI et al., 2019b; ZENG et al., 2012).

2.6 Beta-quitina e *Whiskers*

Quitina, ilustrada na Figura 5 (A), é um polissacarídeo que ocorre abundantemente na natureza e sua estrutura química é composta principalmente por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN), unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, apresentando predominantemente estruturas do tipo GlcNAc (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A quitina encontra-se na estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos e celenterados, além de estar presente nas paredes

celulares de alguns fungos. Esse polissacarídeo apresenta estruturas polimórficas como ilustrado na Figura 5 (B), a saber: α , β e γ -quitina (LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007). A α -quitina é comumente encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como carapaças de caranguejos e camarões (ANITHA et al., 2014; CAMPANA-FILHO et al., 2007). As polimorfos β - e γ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis, mas também resistentes (CAMPANA-FILHO et al., 2007). Nas lulas do gênero *Doryteuthis*, a α -quitina está presente na cutícula que reveste as paredes do esôfago e estômago, a β -quitina está presente nos gládios, sendo seu principal componente, enquanto a γ -quitina é encontrada em uma cutícula espessa que recobre outras zonas do estômago (ANITHA et al., 2014; CAMPANA-FILHO et al., 2007; LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007).

Figura 5 - (A) Estrutura primária de quitina, onde n é o grau de polimerização. (B) Representação esquemática das estruturas de quitina, na qual as setas indicam o sentido do terminal não-redutor para o redutor.



Fonte: CAMPANA-FILHO et al. (2007).

A α -quitina é caracterizada por uma disposição antiparalela das cadeias poliméricas nos domínios cristalinos, favorecendo a existência de um grande número de ligações de hidrogênio inter e intra-cadeias, e também entre cadeias de diferentes lamelas, resultando em empacotamento denso. A β -quitina corresponde a estruturas com disposição paralela das cadeias poliméricas nos domínios cristalinos, dificultando a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, resultando em um empacotamento menos denso. A γ -quitina é caracterizada por uma combinação das estruturas α e β , onde as cadeias poliméricas são dispostas

aleatoriamente em que há duas cadeias paralelas e uma cadeia antiparalela (ANITHA et al., 2014). As diferenças características que ocorrem entre as polimorfos proporcionam diferenças em suas propriedades, por exemplo, com relação à capacidade de hidratação. Moléculas polares penetram mais facilmente na estrutura da β -quitina, entretanto encontram maior dificuldade para penetrar na estrutura da α -quitina (CAMPANA-FILHO et al., 2007; LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007). Além disso, o processo de extração da α -quitina da biomassa exige, geralmente, mais etapas, uma vez que, nas fontes industriais mais empregadas para a sua produção, está fortemente associada a carbonatos, proteínas e pigmentos, sendo necessário para sua extração os processos de desmineralização, desproteínização e despigmentação. Já os gládios de lulas, principal fonte de β -quitina, contêm quantidade desprezível de minerais, não sendo necessário executar o processo de desmineralização. Além disso, usualmente, não há quantidade considerável de pigmentos, tornando o processo de despigmentação, muitas vezes, também desnecessário (LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007). Assim sendo, estes fatores contribuíram para a escolha da β -quitina como fonte de matéria prima para a produção dos *whiskers*.

Entre as propriedades interessantes para utilização deste polímero são não-toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser facilmente processado em diversas formas, como membranas, esponjas, géis, micropartículas, nanopartículas, nanocristais e nanofibras, os quais podem ser aplicados em diferentes áreas, como administração de medicamentos, engenharia de tecidos e cicatrização de feridas (ANITHA et al., 2014). Nanocristais de polissacarídeos são foco de interesse em muitos estudos devido às suas excelentes propriedades intrínsecas, tais como dimensões nanométricas, alta área de superfície, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades de absorção, caráter renovável, baixa densidade e fácil modificação devido à grande quantidade de grupos hidroxila na superfície. *Whiskers* de quitina são nanocristais alongados, cujas dimensões podem ser variáveis, sendo encontrados na literatura diâmetros de 1 a 60 nm e comprimentos de 150 a 800 nm (MA et al., 2014; SRIUPAYO et al., 2005; ZENG et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Podem ser obtidos por meio da remoção de domínios amorfos da quitina sob certas condições, como hidrólise ácida. Com esse fim, geralmente a α -quitina é utilizada devido à sua abundante disponibilidade, entretanto, a β -quitina também tem sido utilizada e os nanocristais são mais facilmente obtidos, principalmente devido ao menor número de ligações de hidrogênio presentes, tornando-a mais susceptível à reação (ZENG et al., 2012). *Whiskers* de quitina têm sido bastante estudados como

reforço em compósito e preparação de *scaffolds*, apresentando resultados promissores para área de regeneração de tecidos (LI et al., 2019b; ZENG et al., 2012).

2.7 Nanopartículas de prata (AgNP)

Nanopartículas são nanomateriais que apresentam todas as suas dimensões em escala nanométrica e apresentam notáveis propriedades químicas, sendo considerados como as fronteiras da nanotecnologia (BATOOL et al., 2019; GHOSAL et al., 2019). Suas propriedades optoeletrônicas, bioativas e mecânicas únicas no regime de nanoescala permitem seu uso como sensores, catalisadores e agentes antimicrobianos (GHOSAL et al., 2019). O presente estudo busca explorar as propriedades antibacterianas das nanopartículas de prata, que evidenciam ação contra inúmeras bactérias, como *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhus*, entre outras, evidenciando seu alto poder antimicrobiano (JUSUF et al., 2020; MORONES et al., 2005). As nanopartículas de prata exibem grande afinidade com grupos que possuem enxofre e fósforo, ambos encontrados tanto nas membranas, como no interior das células bacterianas (ZHANG et al., 2019). Assim sendo, as nanopartículas interagem com a membrana celular de bactérias, causando danos no processo de respiração celular e, no citoplasma, interagem com o DNA, impedindo a divisão celular (ZHANG et al., 2019; ZHENG et al., 2018).

Por mais de um século, a prata tem sido utilizada como um elemento com propriedades antimicrobianas, e o AgNO_3 ainda é aplicado no tratamento de feridas crônicas, entretanto, é irritante para os tecidos e causa manchas na superfície com a qual entra em contato (KALANTARI et al., 2020). Novas gerações de curativos impregnados com nanopartículas de prata têm sido propostas como alternativa no tratamento de feridas (KALANTARI et al., 2020). Além disso, devido ao seu tamanho nanométrico, nanopartículas de prata possuem maior razão área de superfície/volume, facilitando o contato com células de bactérias, maximizando a atividade antimicrobiana, mesmo quando presente em concentrações muito pequenas (KALANTARI et al., 2020). Apesar de suas propriedades notórias, as nanopartículas de prata não são indicadas para serem utilizadas diretamente no tecido em aplicações biomédicas, devido aos efeitos citotóxicos que podem ocorrer no sistema vivo em alta concentração (BATOOL et al., 2019). Dessa forma, para essas aplicações, as nanopartículas devem ser utilizadas incorporadas ou impregnadas em materiais poliméricos, de modo a evitar sua penetração em alta quantidade no sistema vivo (BATOOL et al., 2019).

Diversos sistemas poliméricos contendo nanopartículas de prata para aplicações biomédicas têm sido estudados, como hidrogéis (BATOOL et al., 2019; MASOOD et al., 2019),

nanofibras (CACCIOTTI et al., 2014; CREMAR et al., 2018; LIU et al., 2017a; TRA THANH et al., 2018), esponjas (SATHIYASEELAN et al., 2017), filmes (RAMOS et al., 2016), entre outros. Além de diferentes formas de materiais, as AgNPs também podem ser utilizadas em associação com uma vasta gama de polímeros, como quitosana, polietileno glicol (PEG) (MASOOD et al., 2019), poli (ácido láctico) (PLA) (FORTUNATI et al., 2013), alginato (DINIZ et al., 2020), poliacetato de vinila (PVA) (BATOOL et al., 2019), policaprolactona (PCL) (TRA THANH et al., 2018), entre outros. No geral, os estudos voltados para aplicações biomédicas apresentam resultados promissores para utilização das AgNPs, mostrando eficácia em impedir infecções de pele e, conseqüentemente, acelerando o processo de cicatrização (DINIZ et al., 2020; EL-AASSAR et al., 2020; KALANTARI et al., 2020; LIANG et al., 2016; TRA THANH et al., 2018).

Com base nas suas propriedades antimicrobianas e sua versatilidade, nanopartículas de prata foram, neste estudo, aspergidas sobre a superfície de membranas bicamadas, a fim de avaliar sua capacidade de impedir o crescimento de bactérias em fermentos. Para ratificar sua eficácia, as mesmas foram submetidas à testes de atividade antimicrobiana.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Produzir nãotecidos bicamada compostos por nanofibras à base de PLA, obtidas por duas técnicas distintas: fiação por sopro em solução (SBS) e eletrofiação, modificadas com *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata potencialmente aplicáveis no tratamento de lesões de pele.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtenção e caracterização de *whiskers* de quitina a partir de β -quitina extraída de gládios de lulas da espécie *Doryteuthis spp*;
- ✓ Produção e caracterização de nanopartículas de prata;
- ✓ Produção de membranas bicamadas compostas por PLA/*Whiskers* de quitina/nanopartículas de prata pela combinação de técnicas de fiação e métodos de filtragem;
- ✓ Execução de experimentos físico-químicos e ensaios biológicos para avaliação das propriedades e atividades dos materiais.

4 Materiais e métodos

O poli (ácido láctico), PLA, (4060D) (massa molar média (\overline{Mw}) = 113.600 g mol⁻¹; índice de polidispersividade=1,8), com um teor de isômero-D de 12%, foi adquirido da NatureWorks LLC (EUA) (LAI; HSIEH, 2016). Reagentes: Ácido clorídrico (HCl) (\overline{Mw}) = 36,46 g mol⁻¹) adquirido da Neon Comercial (Brasil); N,N-Dimetilformamida (DMF) (\overline{Mw}) = 73,09 g mol⁻¹) adquirido da Neon Comercial (Brasil); Clorofórmio (\overline{Mw}) = 119,38 g mol⁻¹) adquirido da Neon Comercial (Brasil).

4.1 β -quitina

β -quitina foi extraída de gládios de lulas, da espécie *Doryteuthis spp*, cedidos pela Miami Pescados (Cananéia/SP). Inicialmente, os gládios foram lavados manualmente para remoção de resíduos, secos em estufa com circulação de ar por 24h a 30°C e moídos em moinhos de facas (modelo MA048 MARCONI). Em etapa subsequente, a biomassa foi submetida ao processo de desproteíntização, em que 200 g de gládios moídos e secos foram suspensos em três litros de solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹, e mantido sob agitação mecânica por 18h à temperatura ambiente (\approx 25°C) e filtrada. O sólido resultante foi lavado com água destilada até a água de lavagem apresentar pH 7, filtrado e seco em estufa de circulação de ar por 24h a 30°C. A β -quitina obtida foi submetida a processo de moagem e tamisação para obtenção de material particulado com granulometria > 425 μ m, o qual foi utilizado no processo de preparação dos *whiskers* (CHAUSSARD; DOMARD, 2004; LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007). A quitina obtida apresentou grau médio de acetilação (\overline{DA}) = 89,4 \pm 4,9% , sendo este definido como o conteúdo médio de unidades GlcNAc ao longo das cadeias de quitina, e massa molar média viscosimétrica (\overline{Mv}) = 206,6 \pm 14,3 \times 10⁴ g mol⁻¹ (DELEZUK et al., 2011; FACCHINATTO et al., 2021). O valor de \overline{Mv} foi obtido pelo método de viscosimetria capilar, empregando a equação de Mark-Houwink-Sakurada ($K' = 2,4 \times 10^{-4}$ L g⁻¹ e $\alpha = 0,69$) da viscosidade intrínseca do polímero ($[\eta]$) (FACCHINATTO et al., 2021). O valor de \overline{DA} foi obtido por meio de Espectroscopia de RMN de ¹³C no estado sólido, calculando-se a razão das integrais dos sinais do carbono do grupo metila (I_{CH3}) e dos carbonos do anel de glicopiranosose (I_{C1-C6}) (FACCHINATTO et al., 2021).

4.2 Preparo da suspensão de Whiskers de β -quitina

A preparação dos *whiskers* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Nair e Dufresne (2003) com modificações desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Sérgio Paulo Campana Filho (ANDRE et al., 2020; FACCHINATTO et al., 2021). A β -quitina foi submetida à hidrólise ácida empregando solução de HCl 3 mol L⁻¹ sob refluxo durante 3 h a 90°C, de modo a remover os domínios não cristalinos. Após este período, o sistema foi retirado do aquecimento e resfriado em banho de gelo, de forma a interromper a reação de hidrólise. A suspensão resultante foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso com água destilada e centrifugado novamente. Esse processo foi repetido até a obtenção de suspensão com pH no intervalo de 5 – 7, a qual foi dialisada por 48 h contra água deionizada. Após a diálise, os *whiskers* foram dispersos utilizando Ultra Turrax a uma velocidade de 19000 rpm a 5 min e, em seguida, sonicado por 5 minutos utilizando dispositivo ultrassônico Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24$ kHz) acoplado ao sonotrodo de 22 mm de diâmetro, com irradiação intermitente (ciclos de 50% de pulsação) e potência ajustada em 200 W. Ao final do processo foi obtida uma suspensão aquosa de *whiskers* de β -quitina com concentração de 27,8 mg g⁻¹. Os *whiskers* obtidos apresentaram grau médio de acetilação (\overline{DA}) = 86,5 \pm 5,7 % e massa molar média viscosimétrica (\overline{M}_v) = 2,49 \pm 0,05 $\times 10^4$ g mol⁻¹. (DELEZUK et al., 2011; FACCHINATTO et al., 2021). O valor de \overline{M}_v foi obtido pelo método de viscosimetria capilar, empregando a equação de Mark-Houwink-Sakurada ($K' = 2,4 \times 10^{-4}$ L g⁻¹ e $\alpha = 0,69$) da viscosidade intrínseca do polímero ($[\eta]$) (FACCHINATTO et al., 2021). O valor de \overline{DA} foi obtido por meio de Espectroscopia de RMN de ¹³C no estado sólido, calculando-se a razão das integrais dos sinais do carbono do grupo metila (I_{CH_3}) e dos carbonos do anel de glicopiranosose (I_{C1-C6}) (FACCHINATTO et al., 2021).

4.3 Síntese de nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram sintetizadas por meio do método Turkevich, conforme metodologia descrita por GORUP *et al.* (2011). Inicialmente, prata foi reduzida a partir de uma solução de nitrato de prata (AgNO₃) com adição de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) com relação molar de 1:3. Foram colocadas 100 mL de água deionizada em aquecimento sob refluxo até atingir a temperatura de 90°C, então adicionou-se 1 mL de AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹) e 1 mL de Na₃C₆H₅O₇ (0,3 mol L⁻¹). A reação prosseguiu por aproximadamente 12 minutos até aparecimento de coloração amarela, a qual evidenciou a formação de nanopartículas de prata e, então, 1 mL de solução de hidróxido de amônio (1,4 mol L⁻¹) foi adicionado ao meio reacional.

Nessa etapa, o complexo de diamin prata (I) é formado, removendo os íons de prata que não foram reduzidos, impedindo a formação de novos núcleos e o crescimento de partículas que já foram formada (GORUP et al., 2011). A suspensão obtida foi armazenada ao abrigo da luz até posterior caracterização e uso.

4.4 Processo de eletrofiação

Solução polimérica com concentração de 10% (m/v), ou seja, 10 mg de soluto por 100 mL de solução, foi preparada pela dissolução de PLA em solução clorofórmio/*N,N*-dimetilformamida 4/1 (v/v) empregando agitação magnética por 5h à temperatura ambiente. O arranjo experimental utilizado para eletrofiação consiste em uma fonte de alta tensão (Glassman High Voltage, Inc., USA), um recipiente para a solução, capilar metálico e coletor rotatório de aço inox revestido com papel alumínio e bomba para controle de vazão da solução polimérica (New Era Pump Systems, Inc., USA). Os parâmetros da eletrofiação (vazão da solução polimérica, distância capilar-coletor, voltagem aplicada e tipo de coletor) foram explorados visando à obtenção de rede homogênea composta por fibras sem presença de defeitos (*beads*). Deste modo, diversos experimentos foram realizados até a otimização dos parâmetros, que foram: vazão ($10 \mu\text{L min}^{-1}$), distância de trabalho (5 cm), tensão (20 kv) e rotação (180 rpm). A temperatura do experimento foi mantida na faixa de 25-30°C e a umidade relativa 30-40%.

4.5 Processo de fiação por sopro em solução (SBS)

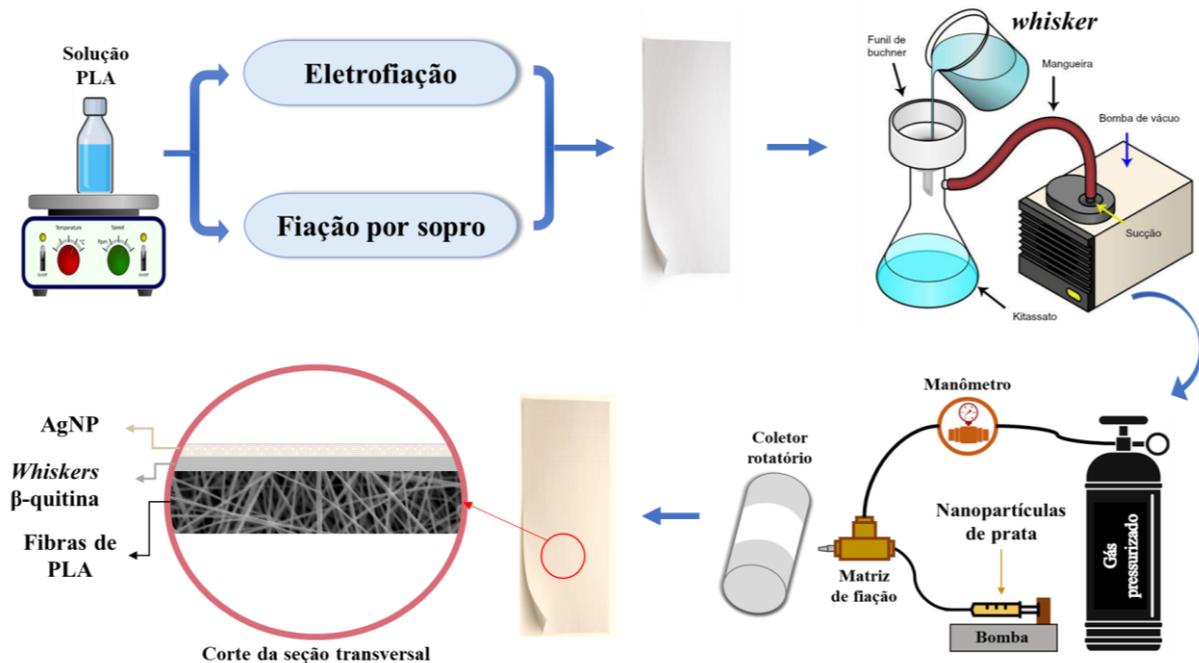
Solução polimérica de PLA com concentração de 12% (m/v) foi preparada pela dissolução do polímero em solução clorofórmio/dimetilformamida 4/1 (v/v) empregando agitação magnética por 5h à temperatura ambiente. O arranjo experimental utilizado na fiação por sopro em solução consiste em fonte de ar comprimido isento de óleo (Schulz, modelo 10VL/200-2HP de um estágio) acoplado a manômetro (Matheson, modelo 22024-1) para controle da pressão e uma bomba para controle da vazão de solução. A solução polimérica foi acondicionada em seringa de vidro com capacidade de 20 mL, a qual foi acoplada a agulha concêntrica. As fibras produzidas foram coletadas em coletor rotatório de aço inoxidável revestido com papel alumínio. O principal desafio dessa etapa do projeto consistiu em determinar os possíveis parâmetros de fiação por sopro, que incluem a vazão das soluções poliméricas, distância agulha-coletor (distância de trabalho), distância de protrusão do bico interno e pressão, que possibilitassem a obtenção de fibras sem presença de defeitos (*beads*), assim, diversos experimentos foram realizados até obtenção da melhor combinação de parâmetros. Os parâmetros otimizados foram: vazão = $7,5 \text{ mL h}^{-1}$, distância de trabalho = 20

cm, distância de protrusão = 2 mm, pressão = 2 bar e rotação = 180 rpm. A temperatura do experimento foi mantida na faixa de 25-30°C e a umidade relativa entre 30-40%.

4.6 Modificação dos nãotecidos

Após a obtenção das fibras de PLA pelos processos de SBS e eletrofiação, as mesmas foram submetidas a duas etapas subsequentes de modificação de superfície, cujos processos estão resumidos na Figura 6. A primeira modificação resultou na adição de *whiskers* de β -quitina à superfície das mantas por meio de filtração de suspensão de *whiskers*. A segunda modificação resultou na adição de nanopartículas de prata à camada de *whiskers* anteriormente adicionada. Assim, ao final das modificações foram obtidas membranas bicamadas constituídas de PLA, *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata.

Figura 6 - Esquema do método de produção das membranas bicamadas, mostrando a etapa de obtenção das fibras por eletrofiação e fiação por sopro em solução. A primeira modificação de superfície consiste na filtração com suspensão de *whiskers* de β -quitina e segunda modificação via aspersão de nanopartículas de prata.



Fonte: Autoria própria.

4.6.1 Modificação da superfície dos nãotecidos com Whiskers de β -quitina

Diferentes métodos foram avaliados para modificação dos nãotecidos com *whiskers* de β -quitina, a saber: i) filtração com pressão negativa, utilizando bomba à vácuo, ii) imersão e iii) aspersão utilizando o aparato de fiação por sopro, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Métodos estudados para modificação da superfície dos nãotecidos com whisker de β -quitina, a saber: filtração, imersão e aspersão.



Fonte: Autoria própria.

Para todos os métodos foram necessários ajustes de parâmetros. Para a técnica de filtração foram analisados os parâmetros de volume e concentração; para a técnica de imersão, foram analisados o volume de suspensão, a velocidade de agitação magnética e a concentração; para a técnica de aspersão, os parâmetros de distância de trabalho (distância agulha-coletor), pressão, vazão e concentração foram analisados. Para todos os métodos foram analisadas ao menos três concentrações de *whiskers* de β -quitina, a saber: 2,5; 1,0 e 0,5 mg g⁻¹. Foram obtidas imagens de MEV das amostras dos diferentes experimentos e, assim, observado o aspecto das membranas. Os melhores resultados para modificação da superfície das membranas se deram por meio da técnica de filtração, se mostrando mais adequada e, portanto, a escolhida para esta etapa. Sendo assim, somente os resultados obtidos por essa técnica serão apresentados no presente estudo.

Para a modificação por filtração foi utilizado um funil de Büchner de vidro de 125 mL com placa porosa nº 03, ou seja, 15-40 μ m. As mantas fibrosas de PLA (obtidas por SBS e eletrofiação) foram cortadas em quadrados de 4 \times 4 cm e colocados no funil sobre papel de filtro. Posteriormente, foram despejados 7,5 mL de suspensão de *whiskers* de β -quitina 0,5 mg g⁻¹ sobre as fibras e filtrados. As mantas foram colocadas entre placas de Teflon para secagem por cerca de 12 h.

4.6.2 Modificação da superfície dos não tecidos com Nanopartículas de prata

Após a modificação da superfície da membrana com *whiskers* de β -quitina, a mesma face foi submetida à uma segunda modificação via deposição de nanopartículas de prata empregando a técnica de SBS. A membrana foi fixada em coletor rotatório, no qual a face contendo fibras de PLA encontrava-se posicionada juntamente ao coletor e a face contendo *whiskers* virada para o lado externo, sendo que as nanopartículas de prata foram depositadas sobre esta última. As condições de modificação foram estudadas com o objetivo de obter superfície contendo partículas distribuídas de forma homogênea. Os parâmetros foram analisados, atingindo a melhor combinação de fatores, a saber: distância agulha-coletor de 30 cm, distância de protrusão de 2 mm, vazão da suspensão de 15 mL h⁻¹ e pressão aplicada de 3 bar.

4.7 Caracterizações

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia dos *whiskers* de β -quitina foi analisada utilizando o equipamento Microscópio JEM-2100- JEOL LaB6. A suspensão de *whiskers* foi diluída para a concentração de 20 mg mL⁻¹ e sonicada por 3 min utilizando dispositivo ultrassônico Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24$ kHz) acoplado ao sonotrodo de 22 mm de diâmetro, com irradiação intermitente (ciclos de 50% de pulsação) e potência ajustada em 200 W. Em seguida, uma alíquota de 70 μ L desta suspensão foi depositada sobre grade de transmissão de cobre, recoberta com contraste de acetato de uranila e seca a 37 °C em estufa de circulação por aproximadamente 12h. A morfologia das nanopartículas de prata também foi analisada utilizando o equipamento Microscópio JEM-2100- JEOL LaB6. A suspensão coloidal de AgNP foi diluída 5 \times e dispersa por 3 min utilizando Ultra Turrax. Em seguida uma alíquota de 100 μ L desta suspensão foi depositada sobre grade de transmissão de cobre e seca a 37 °C em estufa de circulação por aproximadamente 12h. A partir das micrografias, o diâmetro e o comprimento dos *whiskers*, e o diâmetro das nanopartículas de prata puderam ser determinados com auxílio do programa *ImageJ* 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

4.7.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ) das nanopartículas de prata

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata e sua distribuição foram analisados utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), por meio do equipamento Zetasizer Nano SZ Malvern. O equipamento também permitiu a determinação do potencial zeta de superfície das nanopartículas. Para cada experimento, DLS e potencial zeta, foram retiradas 3 alíquotas da solução coloidal aquosa de AgNP, as quais foram analisadas a 25°C.

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das superfícies das membranas foi avaliada empregando um microscópio eletrônico de varredura digital modelo ZEISS LEO-440. Amostras com dimensões de 1 cm × 1 cm foram cobertas por fina camada de ouro e a partir das micrografias, o diâmetro médio das fibras pôde ser determinado utilizando o programa *ImageJ* 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A distribuição do diâmetro das fibras foi determinada considerando o diâmetro de, no mínimo, 150 fibras de pelo menos 4 micrografias para cada amostra.

4.7.4 Espectroscopia no UV-Vis

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível das soluções coloidais de nanopartículas de prata foram coletados em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 na região de 300 a 800 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água deionizada como branco.

4.7.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os *whiskers* de β -quitina foram previamente liofilizados e avaliados quanto aos grupos funcionais existentes em sua estrutura química por espectroscopia na região do infravermelho utilizando um ATR/FTIR Bruker Tensor 27, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram obtidos em duplicata, na região de 600 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 32 varreduras.

4.7.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das membranas bicamadas e dos *whiskers* de β -quitina foi analisada em equipamento TGA-50 (Shimadzu). O experimento foi executado utilizando-se

aproximadamente 8 mg dos *whiskers* e 5 mg de cada amostra das membranas bicamadas, as quais foram colocadas em porta amostra de platina e aquecidas de 25 a 700°C sob razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹.

4.7.7 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas em um goniômetro Attension® Theta Lite a 25 °C. Amostras com dimensões de 1 cm × 1 cm foram fixadas em lâmina de vidro com fita dupla face e uma gota de água deionizada ($\approx 2 \mu\text{L}$) foi depositada sobre a superfície da amostra com apoio de uma seringa, sendo a imagem da gota sobre a superfície capturada por um período de 10 s. Os ângulos de contato dos lados direito e esquerdo da gota foram calculados por meio do software *OneAttension*. Os valores de ângulo de contato foram determinados utilizando-se a média entre os ângulos direito e esquerdo de cinco repetições, sendo que o procedimento foi realizado nas duas faces das membranas, de modo a caracterizar a assimetria do material obtido em termos de hidrofiliicidade e hidrofobicidade de suas faces.

4.7.8 Potencial zeta de superfície

As análises de potencial zeta de superfície referem-se a medidas de potencial zeta na interface sólido-líquido (LUXBACHER et al., 2009; PETRINIĆ et al., 2018). As medidas foram realizadas em equipamento Anton Par (Mocelo SurPASS3). Amostras foram cortadas na dimensão 2 cm × 1 cm e submetidas à varredura de pH (2 a 11) em solução. Foram analisadas ambas as faces das membranas bicamadas após primeira e segunda modificação. Para as membranas obtidas após a primeira modificação foram analisadas a face contendo fibras de PLA e a face contendo *whiskers* de β -quitina. Para as membranas obtidas após a segunda modificação foram analisadas a face contendo somente fibras de PLA e a face contendo *whiskers* de β -quitina e AgNP. O experimento foi realizado para amostras obtidas pelos dois métodos de fiação empregados neste estudo e teve como objetivo avaliar as cargas na superfície das membranas de acordo com o pH.

4.7.9 Porosidade (%)

Com o intuito de se determinar a porosidade das membranas, amostras com dimensões 1 × 1 cm foram pesadas e submersas em 10 mL de álcool etílico à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) (DOS SANTOS et al., 2018). Posteriormente, o conjunto foi acoplado a uma bomba de vácuo para que o álcool etílico entrasse nos poros das membranas, sendo retirado do vácuo ao

término da liberação das bolhas de ar pelas membranas. As mesmas foram retiradas do álcool etílico, levemente secas em papel toalha e pesadas. A porosidade das membranas pôde ser calculada por meio da Equação 1,

$$P(\%) = \frac{m_f - m_i}{p.v} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que, $P(\%)$ = porosidade em porcentagem, m_f = massa final das membranas (mg), m_i = massa inicial das membranas (mg), p = densidade aparente do álcool etílico à 25°C, v = volume da amostra (mL).

O volume das amostras foi calculado multiplicando-se as medidas de espessura, altura e comprimento das membranas, obtidas empregando-se paquímetro.

4.7.10 Propriedades mecânicas (tração)

As propriedades mecânicas das membranas foram analisadas por meio de ensaio de tração, utilizando o equipamento TA instruments DMA Q800 com uma garra do tipo Tension film. Para esse fim, as membranas foram cortadas nas dimensões de 30 mm × 6,4 mm. O experimento foi realizado com espaçamento entre as garras de 5 mm, rampa de força de 1 N min⁻¹ a 18 N e força pré-carga de 0,01 N, a 25 °C. A partir dos experimentos, foram obtidas as curvas de tensão (MPa) *versus* deformação (%) das membranas e assim determinadas suas propriedades mecânicas, tais como resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e alongamento máximo na ruptura (%).

4.7.11 Concentração inibitória mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima (MIC) é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo conforme detectado a olho nu (ANDREWS, 2001; SATOH et al., 2019). A MIC das nanopartículas de prata (AgNP) contra bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi avaliada pelo método de microdiluição seriada, baseado na norma M7-A6, traduzida pela ANVISA.(M7-A6., 2003) Meio de cultura Müller-Hinton líquido foi preparado em tubos de ensaio previamente esterilizados. Para o preparo dos inóculos, a superfície das colônias foi tocada com uma alça e os microorganismos transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio líquido. Posteriormente, os tubos foram colocados em estufa a 37 °C *overnight* para crescimento das bactérias.

O valor de absorvância do inóculo foi verificado e comparado com a turbidez de solução padrão McFarland 0,5. Dessa forma, a turbidez do inóculo foi ajustada por diluição de modo a obter a concentração de 1×10^6 células/mL. As microplacas estéreis possuem 96 poços com fundo em forma de “U”, sendo identificados por letras na vertical (A, B, C, D, E, F, G e H) e por números na horizontal (1 a 12). As fileiras são compostas da seguinte maneira:

- A: composta apenas por meio, de modo a avaliar sua esterilidade,
- B: composta por inóculo + meio para avaliar a viabilidade da bactéria,
- C: representa o controle positivo, sendo composta por meio + inóculo + antibiótico (estreptomicina),
- D: composta por meio + amostra para verificar a esterilidade da amostra e finalmente,
- E, F e G: compostas por meio + amostra + inóculo, em triplicata, para avaliar a ação bactericida das amostras contra as bactérias em questão.

Assim sendo, a placa foi preenchida da seguinte maneira: 100 μ L de meio foram colocados nos três primeiros poços das fileiras A e B e em todos os poços das fileiras C, D, E, F e G. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de antibiótico estreptomicina 20 mg mL⁻¹, no primeiro poço da fileira C, o qual foi homogeneizado 5 \times com auxílio de uma micropipeta, então 100 μ L foram retirados desse poço e colocados no próximo, o qual foi homogeneizado novamente; esses passos foram realizados até o final da fileira, gerando assim uma diluição seriada de 1:2 em cada poço. Então, 100 μ L da amostra, *i. e.* solução coloidal de nanopartículas de prata, foram colocados nos primeiros poços das fileiras D, E, F, G e seguiu-se a diluição seriada conforme citado anteriormente. Finalmente, 10 μ L do inóculo padronizado da bactéria foram colocados em cada um dos poços das fileiras B, C, E, F e G. As placas foram colocadas em estufa a 37 °C *overnight* para a avaliação do crescimento e/ou da inibição de bactérias. Posteriormente, as placas foram retiradas da estufa e acrescentou-se 40 μ L de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,5%, sendo a presença de uma coloração vermelha a evidência do crescimento microbiano. A MIC é então determinada pelo ponto final na concentração em que haja uma redução de 80% ou mais do crescimento, quando comparado com o controle.

4.7.12 Atividade antimicrobiana

Para o estudo de atividade antimicrobiana foram analisadas as membranas após a primeira etapa de modificação (disposição de *whiskers* de β -quitina), tanto àquelas eletrofiadas como obtidas por SBS, em que foram avaliadas ambas as faces, ou seja, a face modificada com *whiskers* e a face contendo apenas as fibras de PLA. Também foram avaliadas as membranas

após a segunda etapa de modificação (aspersão de nanopartículas de prata sobre a camada de *whiskers*), sendo avaliadas ambas as faces da membrana, ou seja, a face modificada com *whiskers* e AgNP e a face contendo apenas as fibras de PLA. Dessa forma, a atividade antimicrobiana dos materiais obtidos contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi analisada pelo teste de difusão em ágar, baseado na norma M2-M8 (2003) traduzida pela ANVISA. Meio de cultura Müller-Hinton líquido foi preparado em tubos de ensaio e sólido em placas de petri, ambos previamente esterilizados. Para o preparo dos inóculos, a superfície das colônias foi tocada com uma alça e os microorganismos transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio líquido. Posteriormente os tubos foram colocados em estufa a 37 °C *overnight* para crescimento das bactérias. O valor de absorvância do inóculo foi verificado e comparado com a turbidez de solução padrão McFarland 0,5. Dessa forma, a turbidez do inóculo foi ajustada por diluição de modo a obter a concentração de 1×10^6 células/mL. Para preparo das placas de petri, 100 µL da cultura inóculo previamente diluído (1×10^6 células/mL) foram colocados na superfície do meio e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski previamente flambada em álcool 70%. As amostras previamente cortadas em discos de 1 cm de diâmetro foram colocadas nas placas de petri em triplicata e as placas foram, posteriormente, colocadas em estufa a 37 °C *overnight* para crescimento das bactérias. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa e foi verificada a olho nu a formação ou não de halos de inibição.

4.7.13 Degradação enzimática

Com intuito de avaliar a biodegradabilidade das membranas bicamadas, amostras de 1 cm² (1 cm × 1 cm) foram pesadas e colocadas em recipientes de vidro previamente esterilizados (DOS SANTOS et al., 2018). Os frascos foram preenchidos com 5 mL de solução tampão fosfato estéril (PBS) (branco), pH 7,4, e solução contendo 5.500 unidades de lisozima/mL em tampão fosfato. As amostras foram incubadas a 37°C por períodos de 6h, 12h, 24h, 2 dias, 4 dias, 7 dias e 14 dias. Findados os períodos de incubação, as amostras foram retiradas das soluções, lavadas com água deionizada, congeladas à -50°C, liofilizadas em liofilizador LIOTOP, modelo L101 e pesadas. A degradação enzimática foi analisada pelo cálculo da massa residual (%), ou seja, a massa resultante da membrana após o experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata, tanto para o ensaio controle (Tampão PBS) como para em solução de lisozima. O cálculo foi feito de acordo com a equação 2.

$$DE(\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100\%$$

Equação 2

em que: DE (%) = Degradação enzimática em porcentagem (porcentagem de massa restante após a degradação), m_f = massa final das membranas (mg), m_i = massa inicial das membranas (mg).

4.7.14 Análise estatística

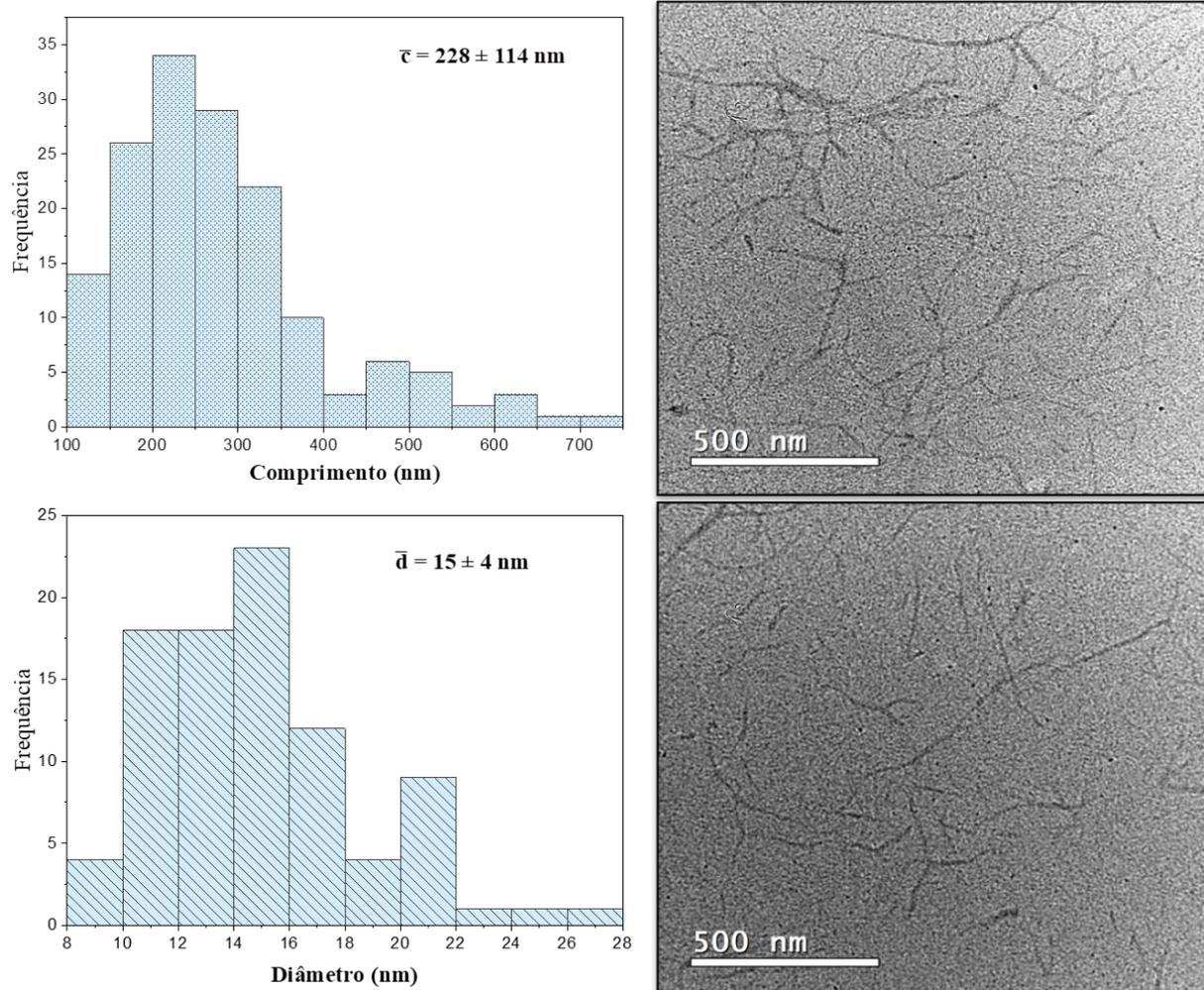
Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade, com auxílio do programa *Origin*, versão 2020 (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*).

5 Resultados e discussão

5.1 Morfologias dos *whiskers* de β -quitina

A morfologia dos *whiskers* de β -quitina pôde ser observada a partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Figura 8, os quais possuem formato alongado, como descrito na literatura (MA et al., 2014; SRIUPAYO et al., 2005; ZENG et al., 2012; ZHANG et al., 2016). O comprimento dos mesmos varia entre 125 nm e 725 nm, com valor médio de aproximadamente $228 \text{ nm} \pm 114 \text{ nm}$. Os valores de diâmetro variam de 9 nm a 27 nm, com valor médio de aproximadamente $15 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, apresentando uma razão comprimento/diâmetro de 15,2. *Whiskers* de dimensões variadas são encontrados na literatura. Ma et al. produziram *whiskers* a partir de α -quitina extraída de carapaças de caranguejos por hidrólise ácida, semelhante ao realizado nesse projeto, e observaram morfologia alongada e dimensões variadas, de forma que os valores médios de diâmetro e comprimento corresponderam a 20 nm e 300 nm (MA et al., 2014). De forma semelhante, Oun, A. e Rhim, J. obtiveram *whiskers* α -quitina com diâmetros variando entre 8 nm e 40 nm e comprimentos entre 150 nm e 260 nm (OUN; RHIM, 2017). *Whiskers* de α -quitina com comprimentos na faixa de 250-750 nm e diâmetros de 10-50 nm foram obtidos por Liu et al., os quais também foram produzidos por hidrólise ácida (LIU et al., 2016). O trabalho de SUENAGA et al. (2016) apresenta a obtenção de *whiskers* de β -quitina utilizando gládios de lula, os *whiskers* apresentaram aspecto semelhante ao do presente estudo e valores de diâmetros na faixa de 3-25 nm. A obtenção de *whiskers* partindo de β -quitina é uma abordagem pouco explorada na literatura, o que realça o caráter inovador deste trabalho (ZENG et al., 2012). Dessa forma, é possível afirmar que a morfologia de bastonetes alongados, bem como as dimensões estão de acordo com os dados encontrados na literatura, confirmando a obtenção dos *whiskers*.

Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de *whiskers* de β -quitina e suas respectivas distribuições de comprimento (nm) e diâmetro (nm).

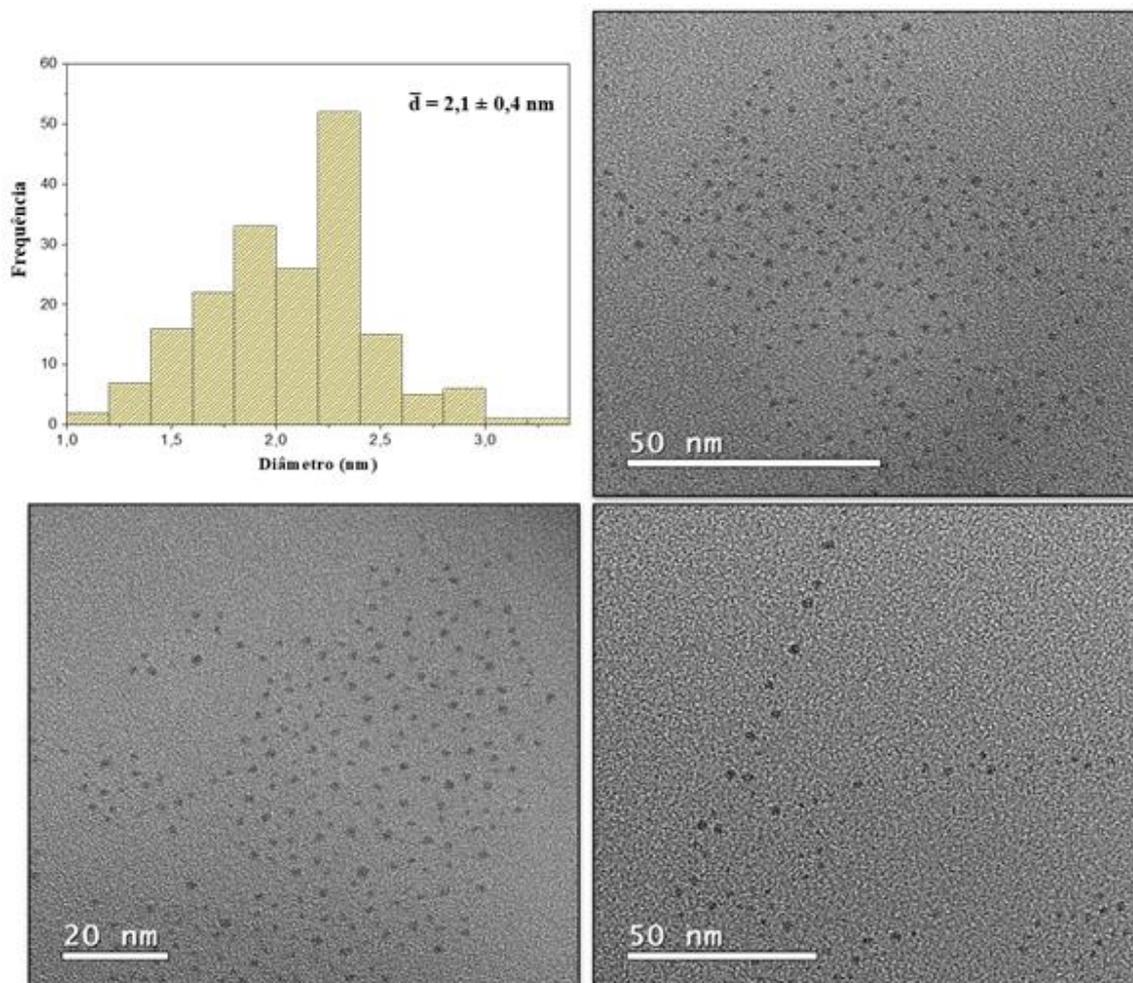


Fonte: Autoria própria.

5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) das AgNPs.

A morfologia das nanopartículas de prata sintetizadas por meio do método Turkevich a 90°C pode ser observada a partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) na Figura 9.

Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata e gráfico representando a distribuição de seus diâmetros (nm).



Fonte: Autoria própria.

Conforme mencionado, a síntese foi realizada empregando metodologia descrita por GORUP *et al.* (2011). Como pode ser observado pelas imagens de TEM, Figura 9, as nanopartículas obtidas apresentam formato esférico, com diâmetros variando de 1 a 3 nm, apresentando valor médio de $2,1 \pm 0,4 \text{ nm}$, com maior frequência em 2,3 nm.

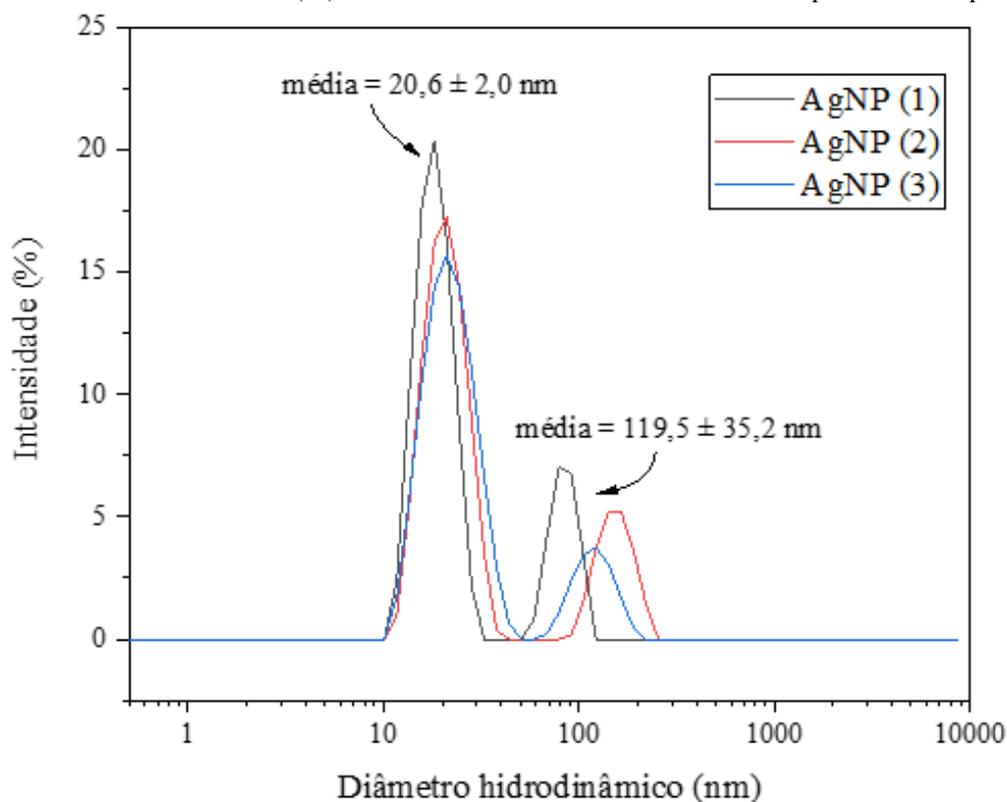
Os dados da literatura com relação a diâmetros de nanopartículas são muito variados, a depender de inúmeros fatores, como método empregado e temperatura. Além disso, a bioatividade contra bactérias está interligada a dois fatores principais: o formato e o diâmetro das nanopartículas (ZHENG *et al.*, 2018).

No estudo realizado por Agnihotri *et al.* (2014), AgNP esféricas com diâmetros variando de 5-100 nm foram produzidas e suas atividades antimicrobianas foram analisadas. As melhores atividades foram obtidas para AgNP de menor diâmetro, comprovando a forte influência do tamanho da nanopartícula em sua atividade antibacteriana. Dessa forma, os tamanhos obtidos

para as nanopartículas de prata estão satisfatórios quando comparados a outros dados da literatura e seu valor baixo pode levar a uma maior atividade antimicrobiana.

O diâmetro hidrodinâmico das AgNPs em suspensão foi medido pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS) decorrido do movimento Browniano das partículas (SMIECHOWICZ et al., 2011). A análise foi realizada em triplicata e suas respectivas curvas estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10 - Curvas de intensidade (%) dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas de prata.



Fonte: Autoria própria.

As curvas apresentadas na Figura 10 mostram que há dois picos para os diâmetros hidrodinâmicos das AgNPs, sendo que o primeiro representa a maior porcentagem, mostrando que a maior parte das nanopartículas possui um diâmetro hidrodinâmico de $21 \pm 2 \text{ nm}$, em média. O segundo pico, menos intenso, mostra um diâmetro médio de $120 \pm 35 \text{ nm}$, o qual pode representar partículas aglomeradas. Entretanto, a intensidade deste é bem menor em relação ao primeiro, evidenciando que, a maior parte das partículas em solução não estão aglomeradas. Além disso, pode-se observar que as imagens de TEM ($2,1 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$) mostraram um diâmetro muito menor em relação ao experimento de DLS, e isso ocorre pois quando as nanopartículas estão dispersas em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície (SMIECHOWICZ et al., 2011). Assim, o diâmetro hidrodinâmico não representa

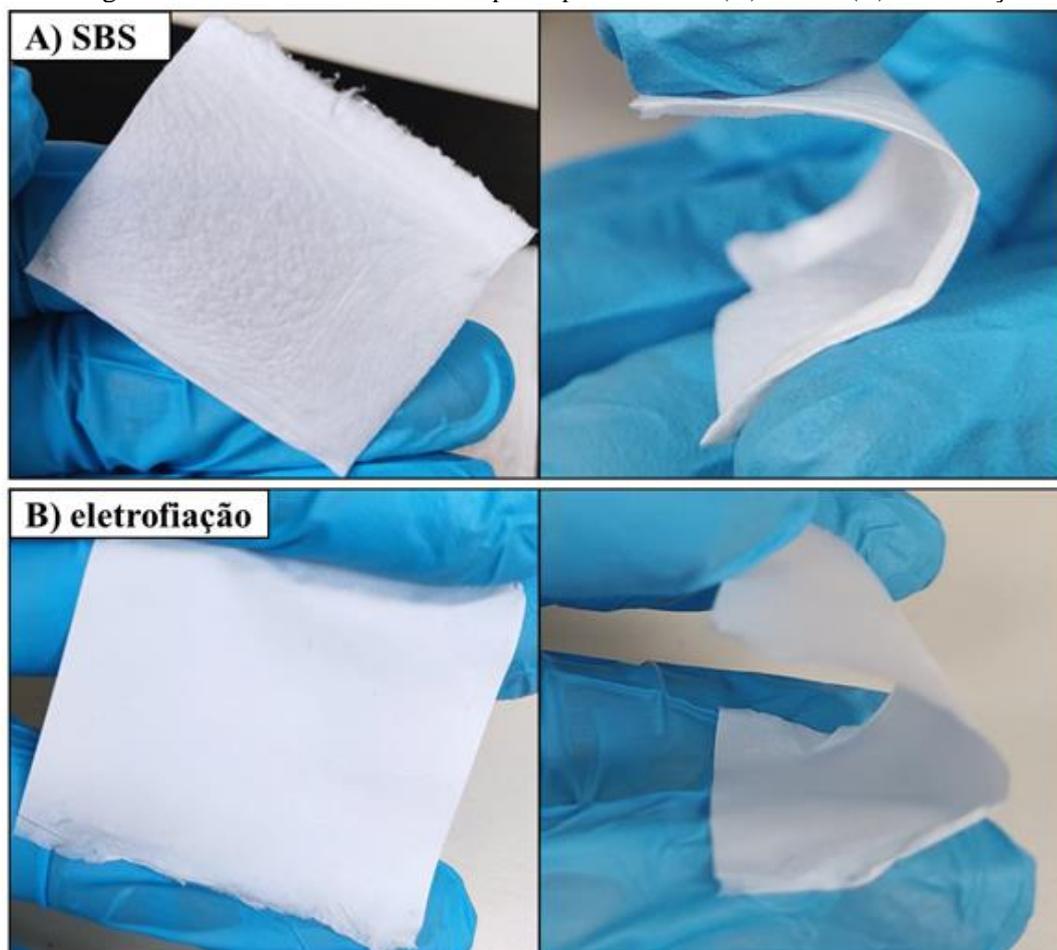
o tamanho apenas das nanopartículas, mas também leva em consideração a camada de solvatação que elas apresentam.

O equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern também permite determinar a carga de superfície das nanopartículas pela medida do potencial zeta, o qual refere-se à carga da bicamada elétrica que recobre a partícula (NEGM; TAWFIK; ABD-ELAAL, 2015). Este valor permite analisar a estabilidade da solução coloidal, uma vez que, quanto mais negativas ou mais positivas são as nanopartículas, maior será a repulsão eletrostática entre elas e assim, menor será a tendência à agregação. Estudos mostram que valores de potencial zeta maiores que + 30 mV ou menores que - 30 mV podem favorecer a estabilidade da solução coloidal (NEGM; TAWFIK; ABD-ELAAL, 2015). As análises foram realizadas em triplicata e as médias dos valores obtidos foi de $-36,7 \text{ mV} \pm 8,1 \text{ mV}$. O experimento indica que a carga nas superfícies das partículas é alta, o que contribui para manter a suspensão estável, confirmando, portanto, os resultados obtidos na análise de DLS.

5.3 Morfologia das membranas bicamadas

Na Figura 11 estão representadas fotografias das membranas de PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofiação antes das etapas de modificação. Pode-se observar que a membrana de SBS apresenta um aspecto mais rugoso em comparação ao aspecto mais liso da superfície da membrana de eletrofiação. As medidas de espessura das membranas obtidas por micrômetro digital mostraram que a membrana de SBS é mais espessa em relação à obtida por eletrofiação, apresentando um valor médio de $0,220 \pm 0,035 \text{ mm}$ para o processo de SBS e $0,069 \pm 0,002 \text{ mm}$ para o processo de eletrofiação.

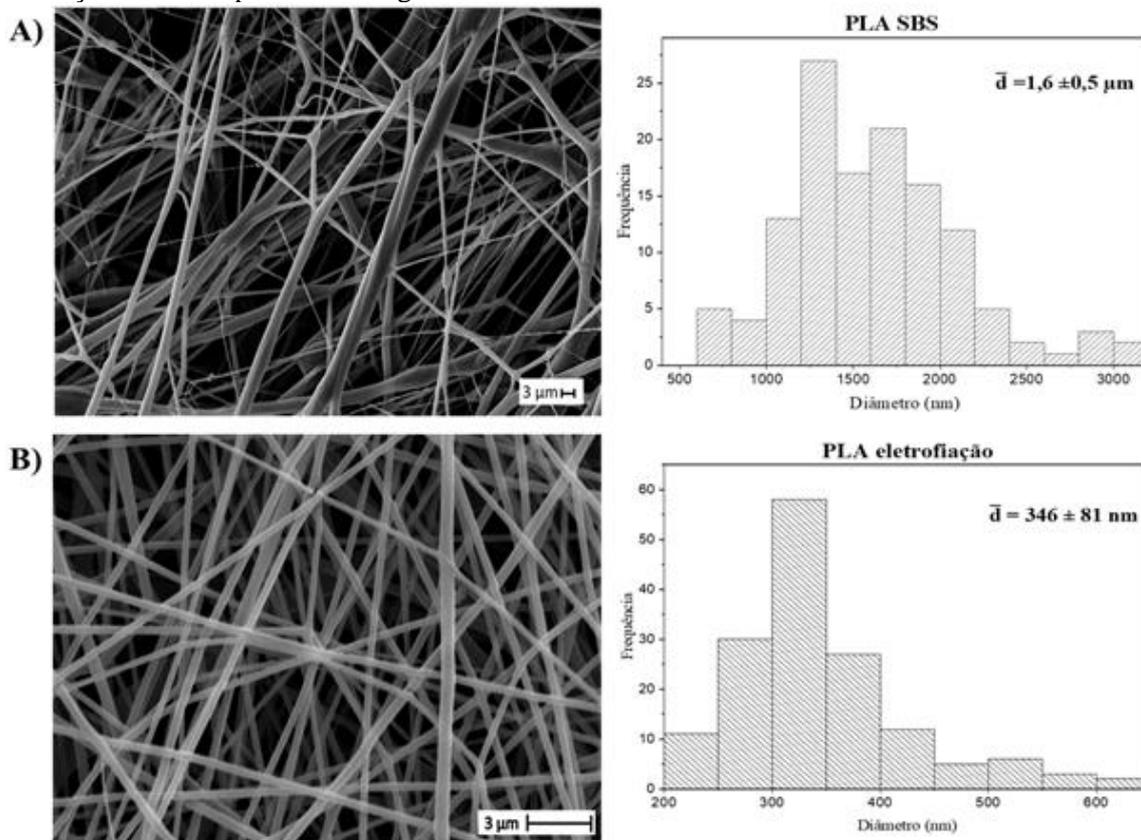
Figura 11 – Imagens das mantas de PLA obtidas pelos processos de (A) SBS e (B) eletrofição.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 12 podem ser observadas as morfologias das fibras compostas somente por PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofição, bem como os histogramas dos diâmetros das fibras obtidas.

Figura 12 - Micrografias das superfícies das mantas de PLA obtidas pelos processos de (A) SBS e (B) eletrofiação e seus respectivos histogramas de diâmetro das fibras.



Fonte: Autoria própria.

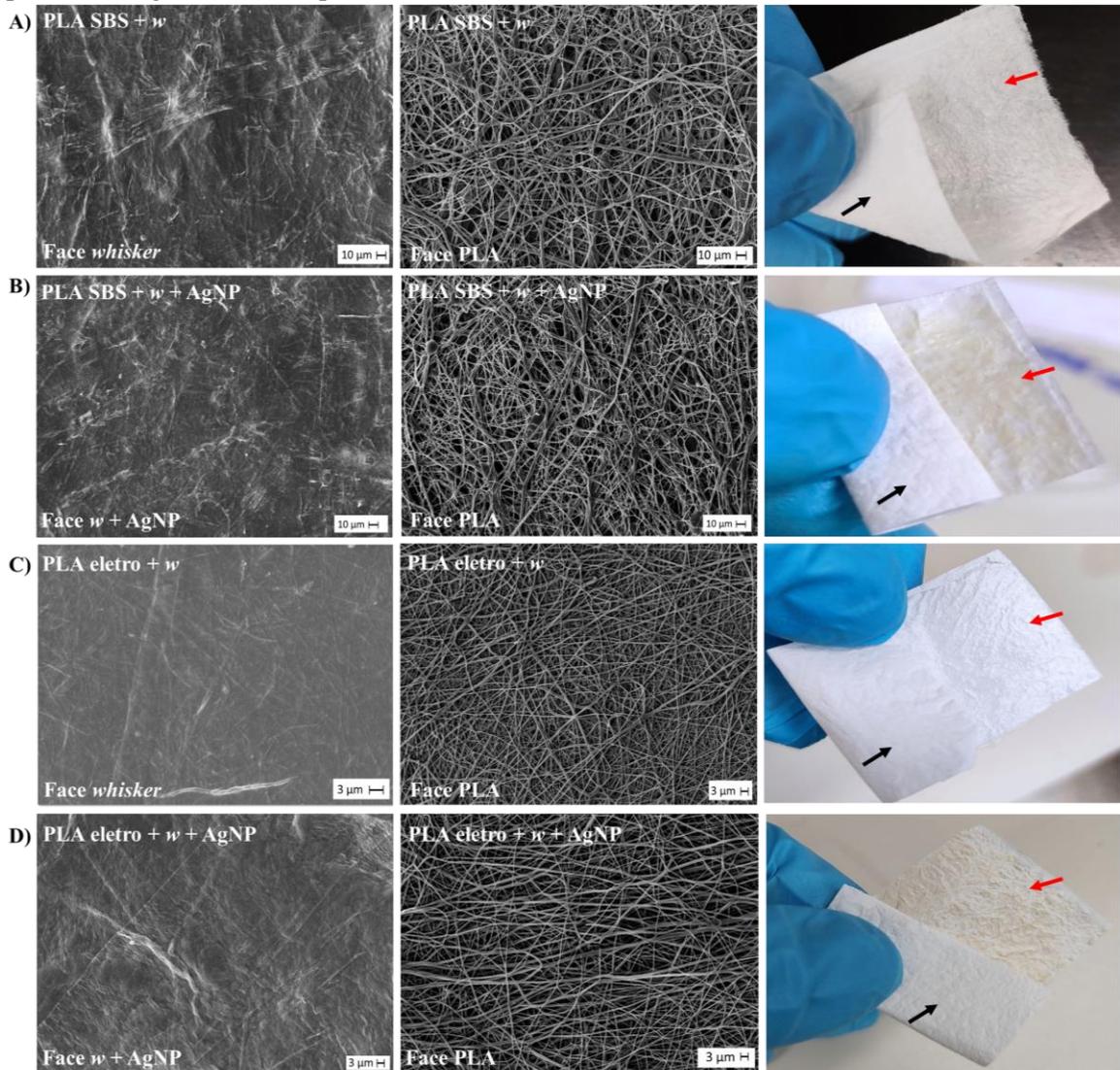
Na Figura 12 observa-se que foi possível a formação de fibras por ambos os processos, com quantidade insignificante de *beads*, indicando êxito na etapa de obtenção dos nãotecidos de PLA. As diferenças entre os processos já se evidenciam na morfologia, em que se observa fibras mais homogêneas, com menor dispersão de valores de diâmetros, comparadas àquelas obtidas por SBS em solução. Além disso, o diâmetro médio das fibras eletrofiadas tem aproximadamente $346 \text{ nm} \pm 81 \text{ nm}$, enquanto este valor é de $1,6 \text{ } \mu\text{m} \pm 0,5 \text{ } \mu\text{m}$ para as fibras obtidas por SBS. A diferença nos valores de diâmetro observada para os diferentes processos pode ser explicada, em parte, pelas diferentes concentrações de polímeros utilizadas, sendo 10% (m/v) para eletrofiação e 12% (m/v) para SBS. Estudos evidenciam que quanto maior a concentração da solução polimérica, maior a viscosidade da solução e, conseqüentemente, maior será o diâmetro das fibras obtidas para ambos os processos. Entretanto, conforme citado anteriormente, a obtenção das fibras por ambos os processos passou por etapas de otimização, sendo que essas concentrações, 10% (m/v) para eletrofiação e 12% (m/v) para SBS, levaram às melhores fibras e mantas de aspecto semelhante, não sendo possível utilizar a mesma concentração para a solução polimérica. Outra explicação está nas diferenças dos próprios processos, pois, durante a formação de fibras por SBS, um jato de solução é submetido a arraste

aerodinâmico, sendo assim, as forças de cisalhamento que atuam sobre a solução polimérica são responsáveis pelo alongamento da fibra e, portanto, pela distribuição de diâmetro das mesmas (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013). O maior diâmetro médio e heterogeneidade das fibras de SBS podem ser resultado de turbulências causadas por alto fluxo de ar. Entretanto, o alto fluxo foi necessário devido à alta viscosidade da solução polimérica. Já a formação de fibras por eletrofiação é controlada por forças repulsivas eletrostáticas que superam a tensão superficial, enquanto o jato é ejetado de uma agulha (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013). O alongamento por forças elétricas que ocorrem na superfície do jato é mais dependente da tensão superficial e da tensão aplicada, sofrendo menos oscilações, podendo ser responsável pela maior homogeneidade dos diâmetros das fibras (DARISTOTLE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013).

Nas Figuras 13 (A) e (B) são apresentadas as micrografias das membranas produzidas por SBS, evidenciando as superfícies modificadas e não-modificadas com *whiskers*, Figura 13 (A), e com *whiskers* e AgNP, Figura 13 (B) e suas respectivas imagens macroscópicas.

Nas Figura 13 (C) e (D) são apresentadas as micrografias das membranas produzidas por eletrofiação, evidenciando as superfícies modificadas e não-modificadas com *whiskers*, Figura 13 (C), e com *whiskers* e AgNP, Figura 13 (D) e suas respectivas imagens macroscópicas. As setas pretas indicam as faces contendo as fibras de PLA e as setas vermelhas indicam as faces modificadas.

Figura 13 - Micrografias das superfícies das membranas obtidas por SBS (A) modificada com *whiskers* de β -quitina e (B) *whiskers* de β -quitina e AgNP, e por eletrofiação (C) modificada com *whiskers* de β -quitina e (D) *whiskers* de β -quitina e AgNP, evidenciando as faces com e sem modificação, e suas respectivas imagens macroscópicas.



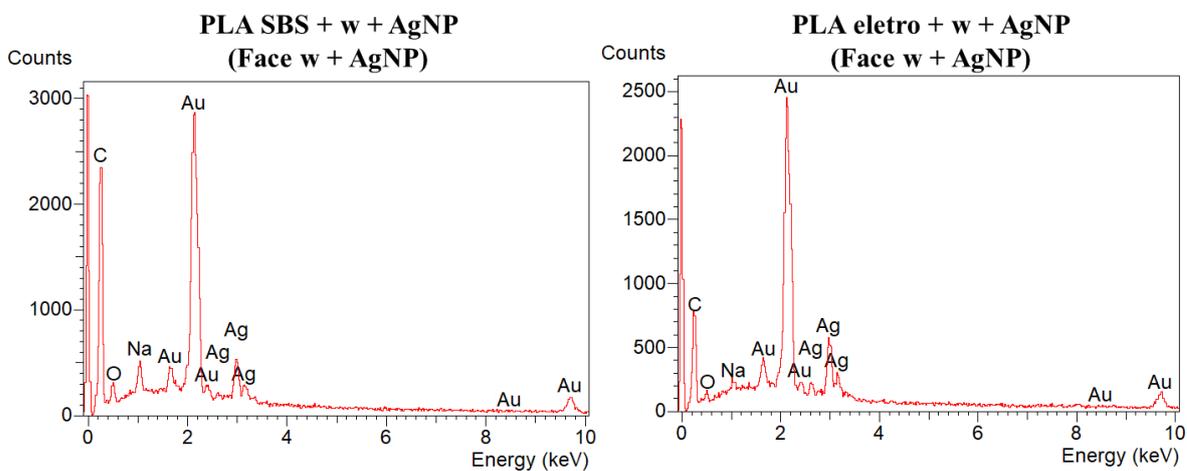
Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, a primeira etapa de modificação, filtração de suspensão de *whiskers* de β -quitina sobre a membrana composta por fibras de PLA, resulta em um filme em uma de suas faces, através do qual é possível observar a estrutura das fibras, sendo este, portanto, um filme supostamente fino. Esse filme teria por função tornar essa superfície da membrana bicamada hidrofílica, uma vez que ficará em contato com a lesão. Por meio da imagem macroscópica é possível visualizar duas camadas distintas, em que uma apresenta um aspecto mais brilhante, *whiskers* de β -quitina, e a outra mais opaca, nanofibras de PLA.

A segunda etapa, consistindo na aspersão de AgNP sobre o filme de *whiskers*, não causa mudanças na superfície das membranas preparadas for SBS e eletrofiação, conforme pode ser

visto nas micrografias 11 (B) e (D), respectivamente. Nas fotografias é possível, novamente, visualizar duas camadas distintas, em que uma apresenta o aspecto mais opaco, composto por nanofibras de PLA, e a outra apresenta um aspecto brilhante, porém agora, com coloração mais amarelada, composta por *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata. Conforme mencionado, o aspecto brilhante surge a partir da deposição dos *whisker*, enquanto que a coloração amarelada aparece após a deposição das nanopartículas de prata, sendo esta uma evidência da presença das mesmas nas superfícies das membranas. Para confirmar a presença da prata nas membranas bicamadas foi realizada análise de Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS), a qual é uma técnica associada à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que permite uma análise semi-qualitativa da composição química do material. A análise foi feita em uma área relativamente pequena do material, portanto, não é possível analisar a concentração do metal encontrado, apenas verificar sua presença, sendo utilizada neste estudo, de forma qualitativa. Na Figura 14 podem ser observados os gráficos de EDS para as faces contendo AgNP + *whiskers* das membranas obtidas após segunda modificação.

Figura 14. Gráficos de Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS) das faces contendo AgNP + *whiskers* das membranas obtidas por SBS e eletrofição.



Fonte: Autoria própria.

Nos gráficos presentes na Figura 14, pode-se observar picos característicos de C e O devido à presença de quitina e PLA. O pico de Na pode ser devido à síntese das nanopartículas de prata ser realizada em meio de citrato de sódio. O pico intenso de Au ocorre devido ao recobrimento das amostras com este metal. Também observam-se picos característicos de Ag, confirmando a presença das nanopartículas de prata nos materiais. Conforme citado, a

deposição de AgNP nas superfícies deverá conferir função antimicrobiana para as membranas, propriedade de extrema importância para o processo de regeneração tecidual.

Adicionalmente, na Tabela 1 podem ser observados os diâmetros médios das fibras e as espessuras médias das membranas obtidas pelos processos de SBS e eletrofição após seu processamento, bem como após as deposições de outras camadas sobre as superfícies. As espessuras médias foram medidas por meio de micrômetro digital, utilizando-se ao mínimo 20 medidas por membrana para realizar o cálculo da média.

Tabela 1 - Diâmetros médios das fibras e espessuras médias das membranas de PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofição.

Processo SBS	Diâmetro (μm)*	Processo eletrofição	Diâmetro (nm)*
PLA	$1,6 \pm 0,5^a$	PLA	346 ± 81^b
PLA + w (Face PLA)	$1,6 \pm 0,5^a$	PLA + w (Face PLA)	366 ± 98^b
PLA + w + AgNP (Face PLA)	$1,7 \pm 0,6^a$	PLA + w + AgNP (Face PLA)	371 ± 77^b

Processo SBS	Espessura (mm)*	Processo eletrofição	Espessura (mm)
PLA	$0,220 \pm 0,035^a$	PLA	$0,069 \pm 0,004^a$
PLA_w	$0,182 \pm 0,018^{a,b}$	PLA_w	$0,073 \pm 0,002^b$
PLA_w_Ag	$0,190 \pm 0,015^b$	PLA_w_Ag	$0,076 \pm 0,011^b$

*Média \pm desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade de acordo com o teste de *Tukey*.

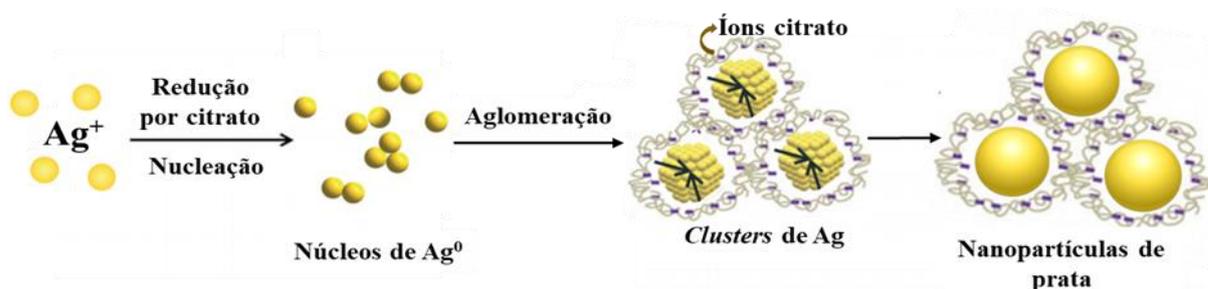
Fonte: Autoria própria.

É possível observar que os diâmetros das fibras das membranas não sofreram mudanças com os processos de modificação. Também não foi possível observar diferenças morfológicas por meio das microscopias, confirmando assim, que as etapas de modificação não alteram drasticamente a morfologia das fibras. Em todas as membranas, a camada de fibras permanece com seu aspecto original, mostrada na Figura 12, a qual teria a capacidade de mimetizar a matriz extracelular, funcionando como suporte para fixação e proliferação de células.

5.4 Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata (AgNP)

A prata coloidal é particularmente interessante devido às suas propriedades como boa condutividade elétrica, estabilidade química, atividades catalítica e antibacteriana (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). O método mais frequentemente utilizado para produção de AgNP é a redução química, utilizando redutores tais como boro-hidreto de sódio, citrato de sódio, ácido ascórbico, entre outros (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). O método de redução química do nitrato de prata, também conhecido como Método do Citrato, foi proposto originalmente por Turkevich, sendo muito utilizado devido ao fato de ser atóxico, de simples execução, baixo custo e reprodutível (KUMAR; GANDHI; KUMAR, 2007; NGO et al., 2016). Um esquema do mecanismo da síntese está representado na Figura 15, em que, inicialmente, a redução de complexos com íons Ag^+ leva à formação de átomos de prata (Ag^0). Neste estágio, há a tendência de que os átomos reduzam a sua área de superfície e formem *clusters* por aglomeração, os quais, finalmente, levam à formação de partículas (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Entretanto, apenas uma fração dos íons prata é reduzida, resultando em íons prata no meio e, conseqüentemente, novos núcleos serão formados enquanto as partículas formadas inicialmente continuarão a crescer. Este processo causa uma ampla distribuição de tamanho das nanopartículas. A utilização do hidróxido de amônio ao final da reação tem por justificativa impedir o crescimento de partículas e a geração de novos núcleos, uma vez que o excesso adicionado forma imediatamente os complexos solúveis de diamin prata (I), ligando todo o Ag^+ livre no sistema após a nucleação (GORUP et al., 2011).

Figura 15 - Representação do mecanismo da síntese de Nanopartículas de prata, mostrando suas etapas de redução, aglomeração e por fim, formação das nanopartículas.

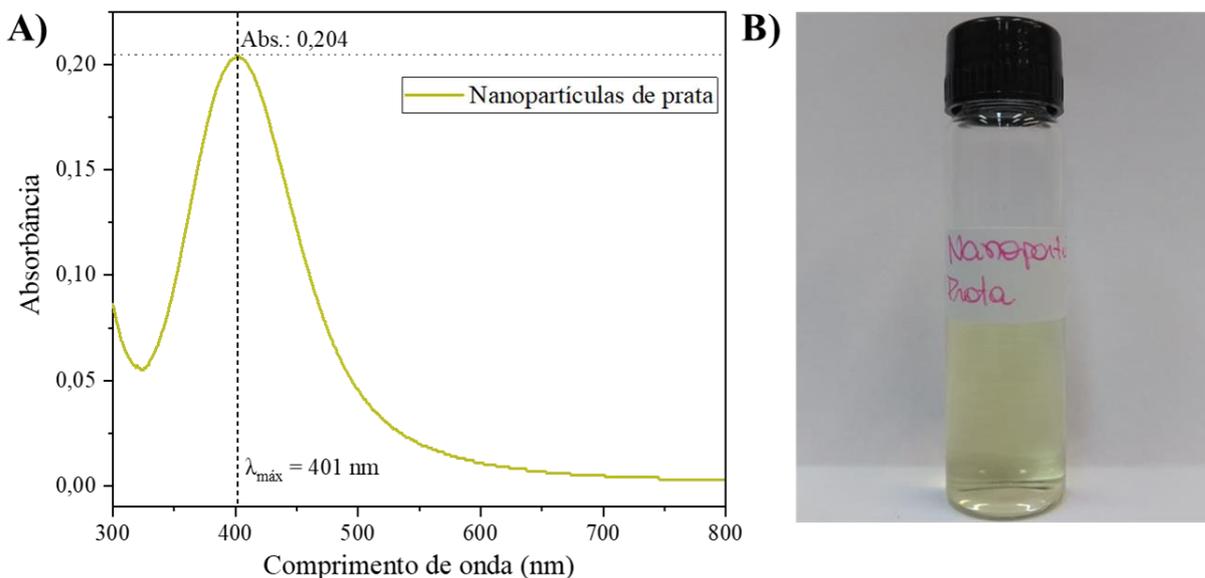


Fonte: Adaptado de Agnihotri et al., 2014, p. 3977 e Polte, 2015, p. 6818.(AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014);(POLTE, 2015).

Quando as partículas coloidais são muito menores que o comprimento de onda da luz visível, as soluções apresentam uma cor amarela com uma banda intensa na faixa de 400 nm

no espectro de absorção, o que pode ser observado na Figura 16 (B) e (A), respectivamente (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Figura 16 - (A) Espectro de UV-Vis das nanopartículas de prata (AgNP) sintetizadas e (B) Foto digital da solução coloidal de nanopartículas de prata sintetizada.



Fonte: Autoria própria.

A banda de absorção centrada em 401 nm é atribuída à banda de ressonância plasmônica de superfície da prata (MASOOD et al., 2019; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; ZHANG et al., 2019). Além disso, essa banda também evidencia que as nanopartículas obtidas têm forma principalmente esférica, de acordo com a teoria de Mie, e não formam partículas anisotrópicas (BIAO et al., 2017; ZHANG et al., 2019). A forma esférica das nanopartículas também pôde ser comprovada por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

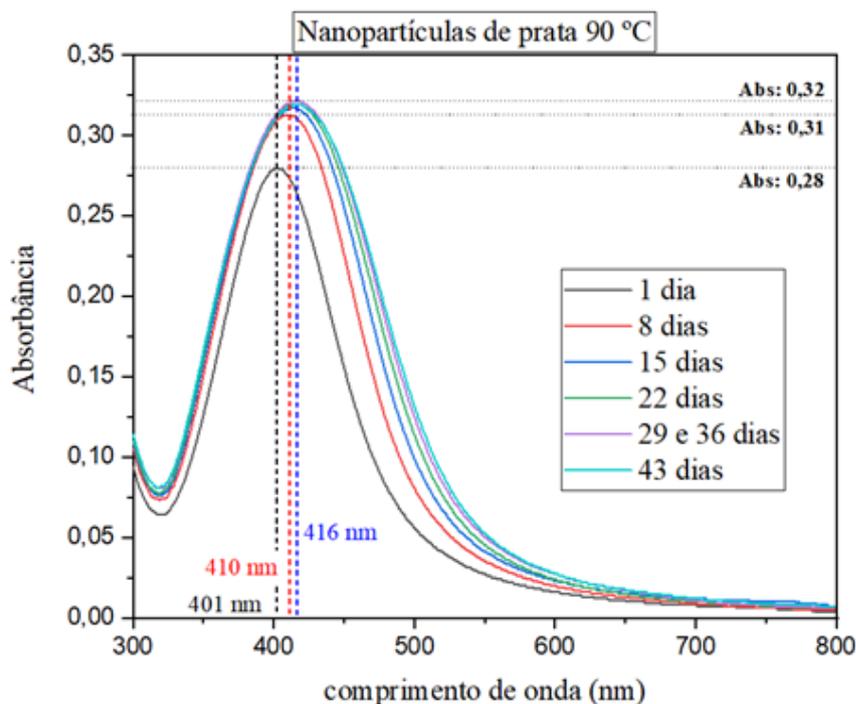
A concentração de Ag^0 na solução foi estimada por meio da Equação 3 descrita por Dong *et al.* (2012).



Sabe-se que apenas uma fração de prata é reduzida e que o processo ocorre de acordo com a Equação 3. Dessa forma, a concentração máxima possível da solução coloidal pode ser estimada, considerando que toda a prata sofreu redução, sendo essa $105 \mu g mL^{-1}$. Este cálculo será importante para determinação da mínima concentração inibitória (MIC), descrita posteriormente.

A estabilidade da solução coloidal de nanopartículas de prata foi avaliada por meio de espectroscopia UV-Vis, mostrada na Figura 17. Dessa forma, uma nova síntese foi realizada e sua absorvância foi monitorada durante 43 dias, com intervalos de 7 dias entre as medidas.

Figura 17 - (A) Espectro de UV-Vis das AgNPs durante o período de 43 dias, sendo medidas a cada 7 dias.



Fonte: Autoria própria.

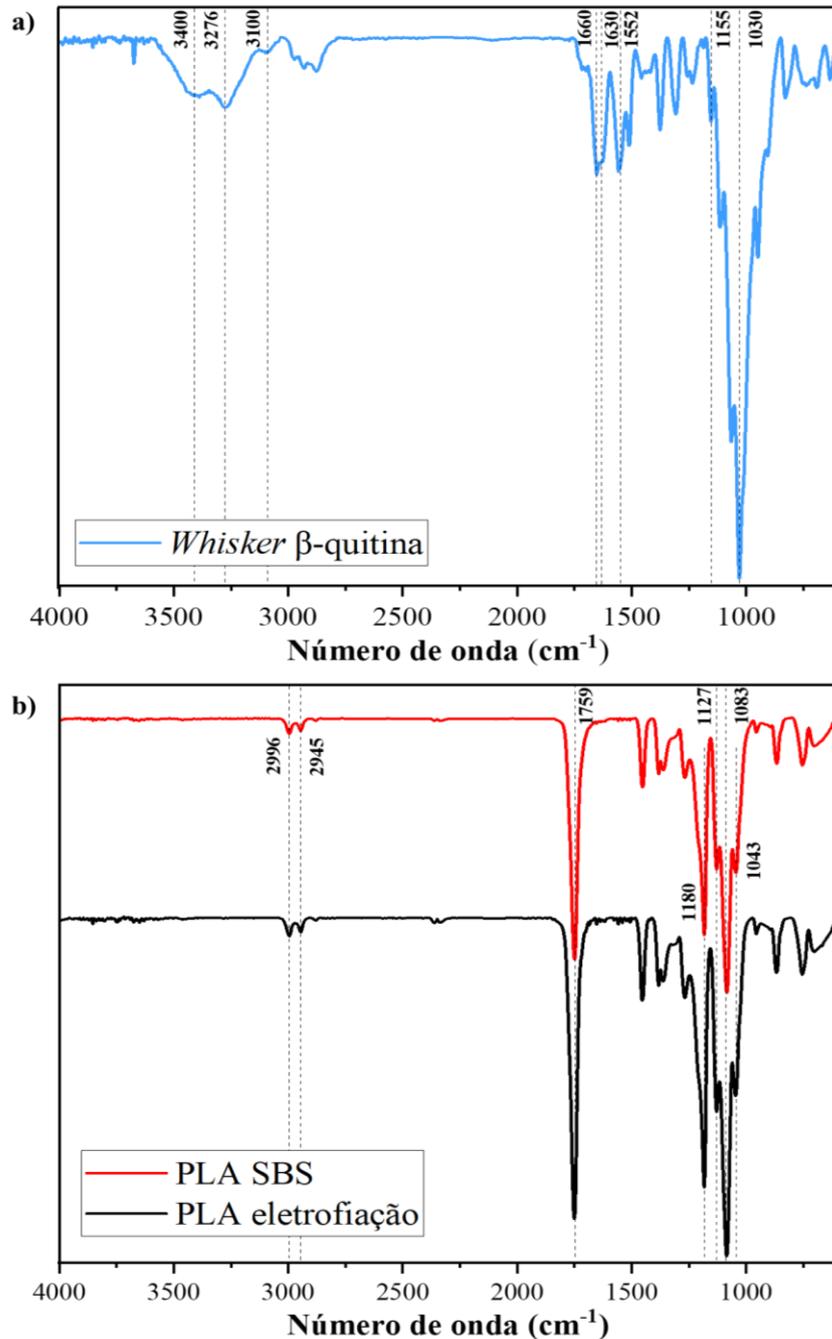
Pode-se observar que no primeiro dia de síntese as nanopartículas apresentavam absorvância de 0,28 e $\lambda_{max} = 401$ nm. No gráfico, observa-se que após 7 dias, as nanopartículas apresentaram absorvância de 0,31 e $\lambda_{max} = 410$ nm e após 15 dias, apresentaram absorvância de 0,32 e $\lambda_{max} = 416$ nm. Entretanto, as pequenas mudanças observadas não apresentam diferenças significativas, podendo ter sido causadas pelo erro intrínseco do equipamento. Após esse período, os valores que se mantiveram quase sem alteração até completar os 43 dias de observação, indicando a estabilidade da solução. O deslocamento da banda de plasmon de superfície para maiores valores de comprimento de onda e seu alargamento indicam um ligeiro aumento das dimensões das nanopartículas de prata (JEONG et al., 2015; SOLOMON et al., 2007). Entretanto, o formato das bandas continua semelhante ao apresentado pelas AgNPs no primeiro dia da análise, indicando, portanto, que as nanopartículas continuam apresentando formato esférico. O experimento permite concluir que o método de síntese permitiu a obtenção de uma solução coloidal estável, mesmo após 43 dias de síntese.

5.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho dos *whiskers* de β -quitina, bem como das fibras de PLA obtidas pelos processos de eletrofição e SBS encontram-se na Figura 18. No espectro dos *whiskers* é possível observar bandas características de deformações axiais de N-H e O-H em 3276 cm^{-1} , 3100 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , respectivamente (MA et al., 2014; ZHANG et al., 2016). As bandas presentes em 1660 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} correspondem às vibrações de amida I (deformação axial de -C=O e deformação angular de -NH_2 , respectivamente), que são associadas a interações intermoleculares, sendo a primeira banda relacionada às ligações hidrogênio de grupos C=O e N-H , enquanto a segunda está relacionada às ligações hidrogênio envolvendo grupos C=O , N-H e O-H ligado ao carbono da posição 6 do anel de glicopiranosose (CAMPANA-FILHO; SIGNINI, 2001). A banda em 1552 cm^{-1} é referente à amida II, referente aos estiramentos da ligação C-N e deformação angular da ligação N-H . As bandas observadas na região de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} correspondem a deformação axial de C-H e as localizadas em torno de 1155 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} estão relacionadas aos estiramentos das ligações glicosídica C-O-C e C-O , respectivamente (LIU et al., 2016; OUN; RHIM, 2017).

Os espectros das fibras de PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofição apresentaram as mesmas bandas características do PLA. A banda em 1759 cm^{-1} é correspondente ao estiramento do grupo C=O , aquela presente em aproximadamente 1180 cm^{-1} equivale aos estiramentos do grupo C-O-C e a banda central em 1083 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C-O . É possível, também, observar duas bandas em 2996 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , as quais correspondem às deformações axiais assimétrica e simétrica do grupo CH_3 , respectivamente. Além disso, as bandas presentes em 1127 cm^{-1} e 1043 cm^{-1} são devidas à deformação angular assimétrica do grupo CH_3 e ao estiramento do grupo C-CH_3 , respectivamente (FLORES et al., 2019; PAPADOPOULOU et al., 2019; QI et al., 2019).

Figura 18 - Espectros na região de infravermelho dos materiais: a) *whisker* de β -quitina e b) Fibras de PLA obtidas pelos processos de eletrofiação e SBS.

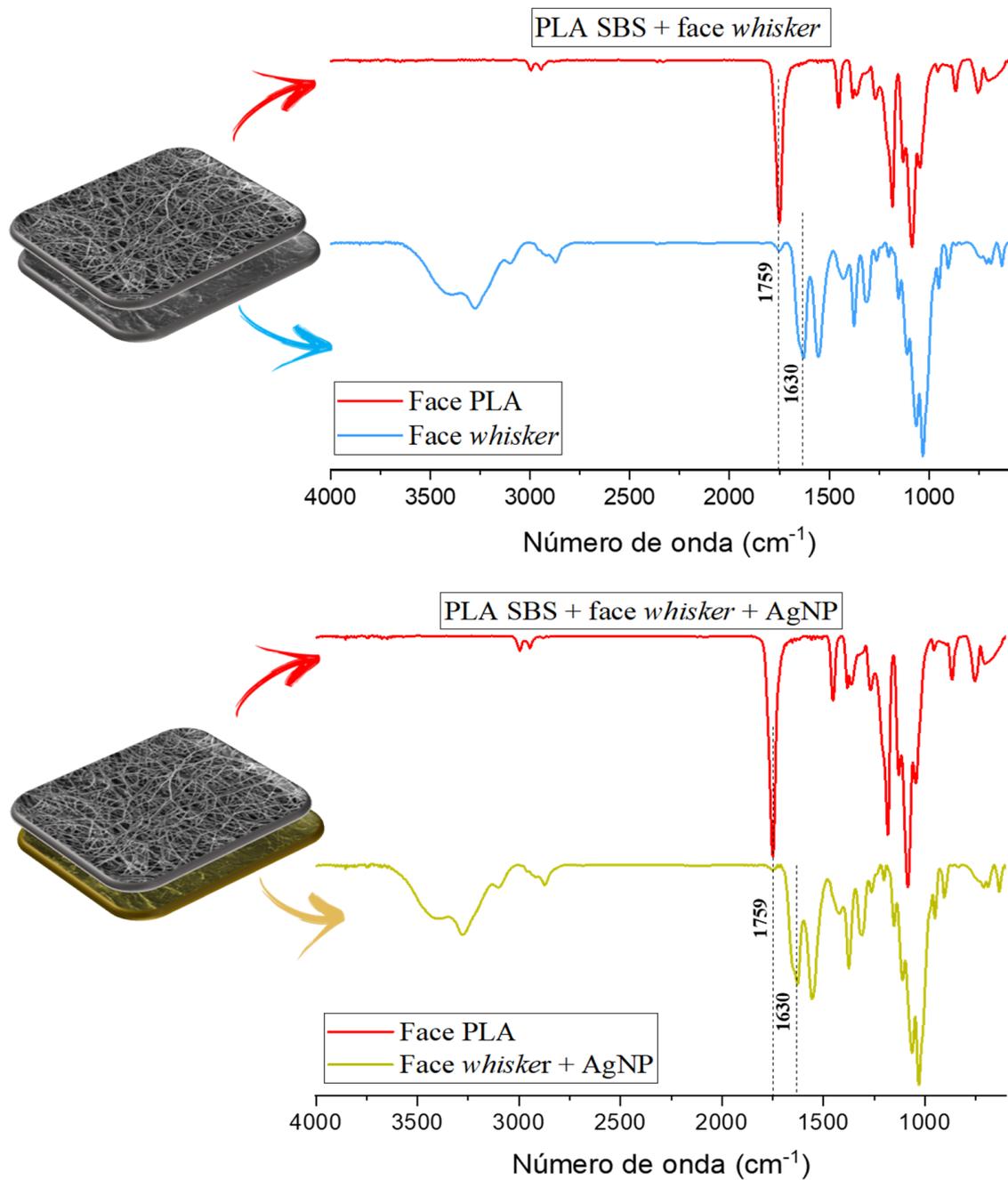


Fonte: Autoria própria.

Nas figuras 19 e 20 estão apresentados os espectros na região de infravermelho das membranas bicamadas de PLA produzidas tanto pelos métodos de SBS como por eletrofiação, exibindo a primeira etapa de modificação (camada de *whiskers* de β -quitina) e após a segunda etapa de modificação (aspersão de AgNP sobre a camada de *whiskers*). Em relação às amostras resultantes da primeira modificação, pode-se observar que o espectro da face composta por fibras de PLA apresentou as mesmas bandas referentes à fibra não modificada e não apresentou

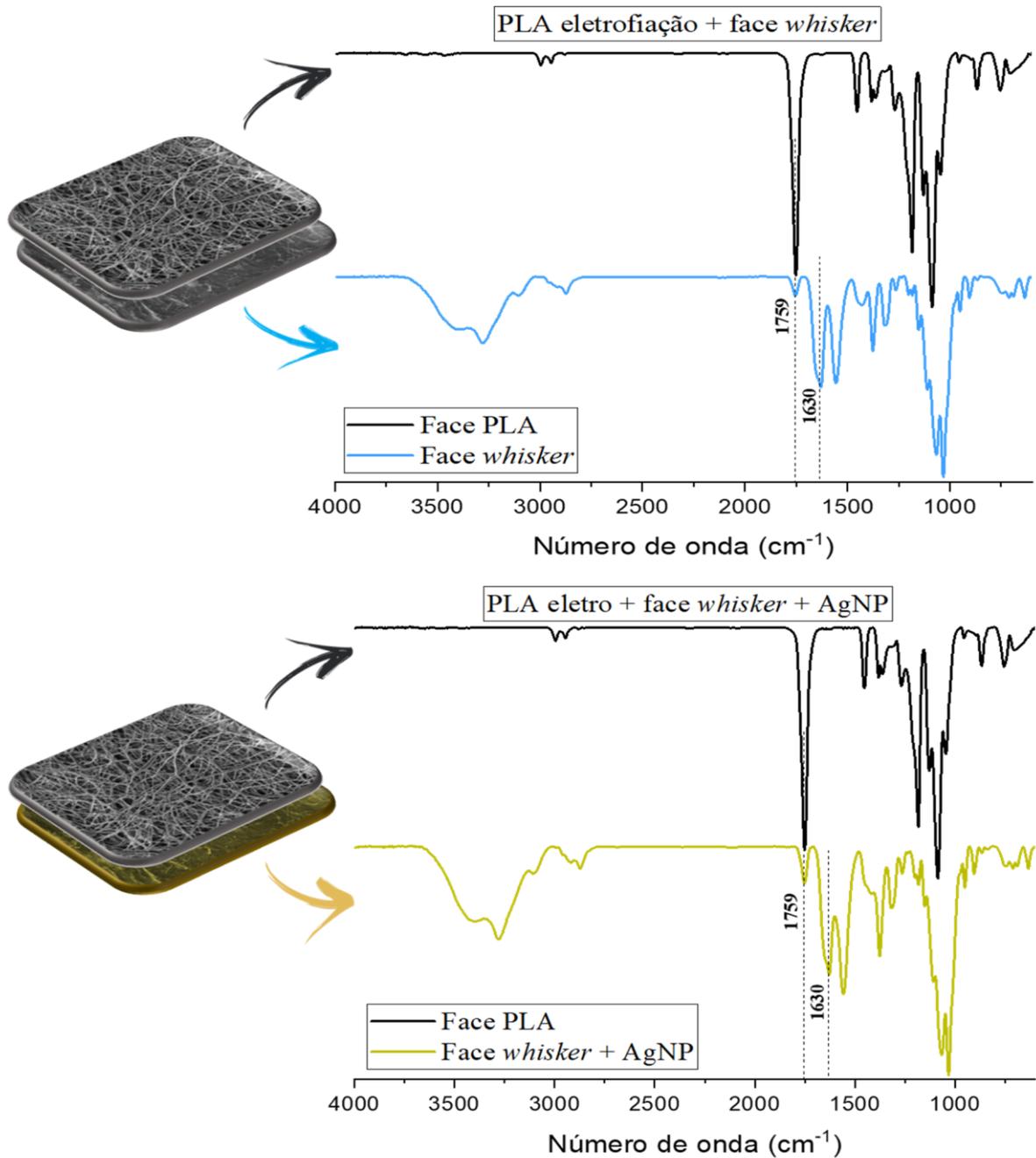
bandas características dos *whiskers* de β -quitina. A face composta por *whiskers* de β -quitina também apresenta as bandas características observadas em seu espectro anterior à modificação. Entretanto, é possível observar uma banda característica de PLA em 1759 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo C=O, mas pouco intensa. Uma possível explicação para o aparecimento dessa banda seria a espessura muito fina do filme de *whiskers* de β -quitina. Além disso, as bandas de amida I da quitina, anteriormente divididas em duas, 1660 e 1630 cm^{-1} , passaram a ter intensidades praticamente iguais, apresentando apenas uma banda, o que confirma a presença de ligação hidrogênio entre os grupos C=O de PLA e os grupos amida da quitina, confirmando a interação entre as faces, fenômeno também observado no estudo realizado por SHAMSHINA et al. (2018), no qual foram produzidas fibras à base de PLA e quitina. Dessa forma, os espectros comprovam que foi possível a obtenção de uma membrana bicamada, em que uma face é composta apenas por fibras de PLA (independente do processo pelo qual foi obtida) e a face oposta é revestida por uma camada fina de *whiskers* de β -quitina.

Figura 19 - Espectros de FTIR das membranas obtidas por SBS: Fibras de PLA (SBS) + *whisker* de β -quitina, e fibras de PLA (SBS) + *whisker* de β -quitina + AgNP, evidenciando ambas as faces das membranas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Espectros de FTIR das membranas obtidas por eletrofiação: Fibras de PLA (eletrofiação) + *whisker* de β -quitina, e Fibras de PLA (eletrofiação) + *whisker* de β -quitina + AgNP, evidenciando ambas as faces das membranas.



Fonte: Autoria própria.

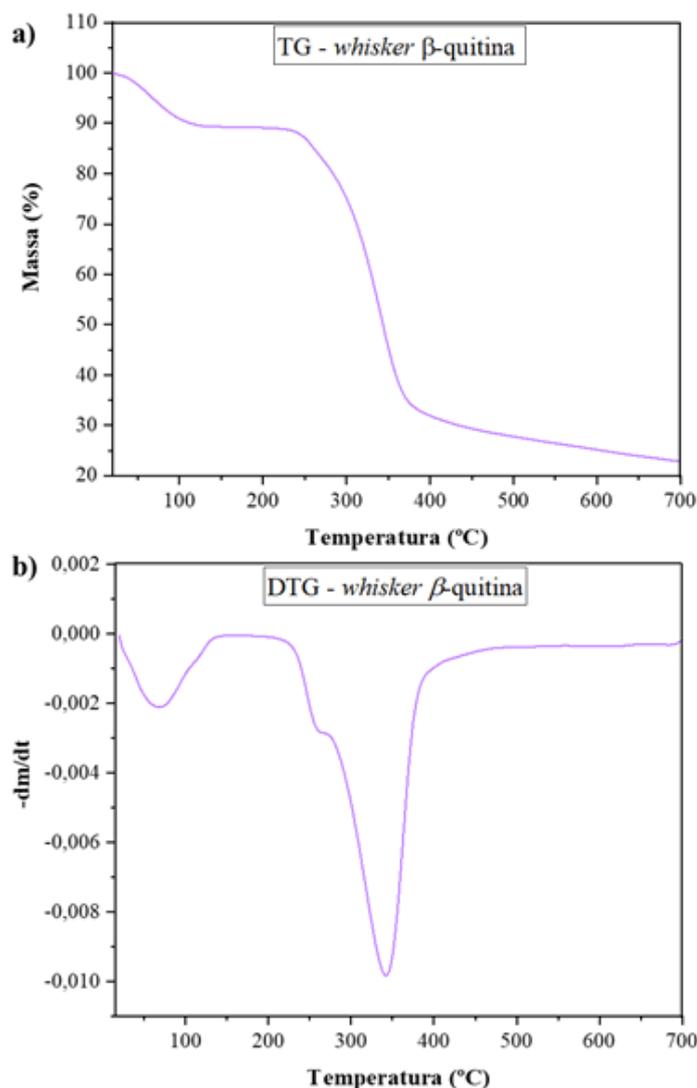
O mesmo padrão de espectros é observado após a segunda modificação, comprovando a existência de duas camadas de estruturas químicas diferentes. Geralmente, evidências da presença de nanopartículas podem ser observadas, como no estudo realizado por SONG *et al.* (2019), no qual foi desenvolvido um hidrogel à base de β -quitina e nanopartículas de prata. Os resultados obtidos por estes autores pela espectroscopia na região de infravermelho mostraram

uma diminuição da intensidade das bandas de OH e NH, podendo ser uma evidência da interação de coordenação entre as AgNP e a matriz de quitina. Características semelhantes foram observadas por GUO; DUAN e ZHANG (2016), os quais produziram microesferas compostas por nanofibras de quitina e AgNP, em que houve uma diminuição da intensidade relativa em bandas características do espectro no infravermelho, indicando que a prata interagiu com os grupos OH, C-O-C ou amida da quitina. A única diminuição de intensidade perceptível no espectro das membranas após a segunda modificação é a da banda presente em aproximadamente 1630 cm^{-1} , referente à amida I, podendo ser um indício da interação com as AgNP.

5.6 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica dos *whiskers* de β -quitina e das membranas obtidas foi determinada por meio da análise termogravimétrica. As curvas de TG e DTG dos *whiskers* de β -quitina estão apresentadas na Figura 21, e na Tabela 2 estão as temperaturas características dos eventos e correspondentes perdas de massa. Podem ser observados dois eventos térmicos principais, sendo que o primeiro ocorre na faixa de 21-150 °C, o qual apresentou uma perda de massa de 10,7% e corresponde à evaporação da água adsorvida nos *whiskers* (WANG et al., 2020). O segundo evento ocorre na faixa 206-456 °C, em que houve perda de massa de 67,2%, e é referente à decomposição térmica do polissacarídeo, incluindo a desidratação dos anéis e decomposição de unidades acetiladas e desacetiladas de quitina (WANG et al., 2013).

Figura 21 - Curvas de TG (a) e DTG (b) dos *whiskers* de β -quitina.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica dos *whiskers* de β -quitina.

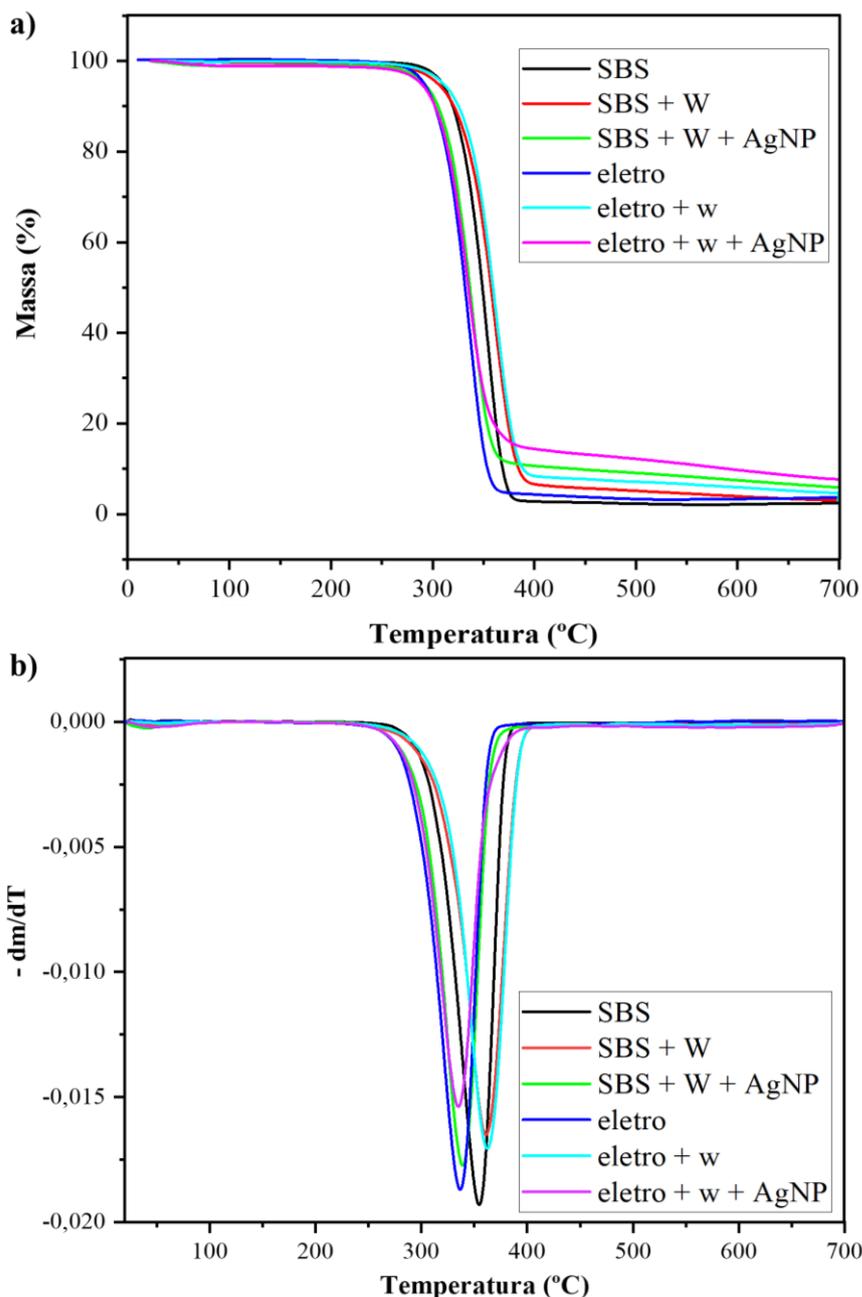
Amostra	Primeiro estágio		Segundo estágio		
	Faixa	Δm (%)*	Faixa	Tonset (°C)**	Δm (%)*
<i>Whiskers</i> de β -quitina	21-150	10,7	206-453	283,7	67,2

* Δm (%) = perda de massa; ** Tonset = Temperatura onset.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 22 podem ser observadas as curvas de TG e DTG das membranas de PLA obtidas pelos processos de SBS e eletrofiação, bem como das membranas bicamadas obtidas após a primeira e segunda etapa de modificação. Na Tabela 3 estão as temperaturas características dos eventos e correspondentes perdas de massa.

Figura 22 - Curvas de TG (a) e DTG (b) das membranas bicamadas.



Fonte: Autoria própria.

Para as amostras contendo apenas PLA, independente do processo pelo qual as fibras foram obtidas, é possível observar apenas um evento térmico, o qual é resultado da degradação e despolimerização do poli (ácido láctico) (LV; ZHANG; TAN, 2019). Entretanto, para as fibras obtidas por SBS este evento encontra-se na faixa de 236-408°C, com valor de $T_{onset} = 323$ °C, enquanto que para as obtidas por eletrofiação a faixa corresponde a 203-400 °C, com valor de $T_{onset} = 304$ °C, mostrando que as mantas obtidas pelo processo de SBS possuem maior estabilidade térmica. Uma possível explicação encontra-se nos diferentes diâmetros médios das fibras, sendo esses $1,6 \pm 0,5$ μm e 346 ± 81 nm para os processos de SBS e eletrofiação,

respectivamente, o que resulta em maior razão área superficial/volume para as fibras eletrofiadas, diminuindo sua estabilidade térmica (OLIVEIRA et al., 2013). Resultados similares foram encontrados por REZAEI et al. (2014), os quais analisaram a estabilidade térmica de fibras eletrofiadas de diferentes diâmetros (223 nm e 545 nm), observando maior estabilidade para aquelas com maior diâmetro. Além disso, sabe-se que a cristalinidade de um polímero influencia suas propriedades, incluindo mecânicas e térmicas. Nesse sentido, um menor grau de cristalinidade geralmente implica temperaturas mais baixas de decomposição térmica (TAMPAU; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; CHIRALT, 2020). Os processos de SBS e eletrofiação geram fibras com diferentes graus de cristalinidade, e isso se deve à velocidade mais alta e as forças características do SBS que favorecem a orientação das cadeias, levando a uma maior cristalinidade do que a eletrofiação (SOUZA et al., 2014). Sendo esta outra explicação possível para as diferenças nas temperaturas de T_{onset} para os processos (SOUZA et al., 2014).

Tabela 3 - Temperaturas características e correspondentes perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas bicamadas.

Amostra		PLA SBS	PLA SBS + <i>whiskers</i>	PLA SBS + <i>whiskers</i> + AgNP	PLA eletro	PLA eletro + <i>whiskers</i>	PLA eletro + <i>whiskers</i> + AgNP
Primeiro estágio	Faixa (°C)	236-408	25-125	25-125	203-400	25-125	25-125
	Δm (%)*	97,2	0,4	1	95,7	0,1	1,1
	Tonset (°C)**	323,5	-	-	304,4	-	-
Segundo estágio	Faixa	-	206-455	220-423	-	228-444	212-444
	Δm (%)	-	94,3	89,6	-	92,2	86,5
	Tonset (°C)**	-	329,7	309	-	330,5	304,8
	Resíduo (%)	2,7	5,7	10,3	4,3	7,8	13,5

* Δm (%) = perda de massa; ** Tonset = Temperatura onset.

Fonte: Autoria própria.

As membranas bicamadas modificadas com *whiskers* de β -quitina apresentaram dois eventos térmicos, sendo o primeiro na faixa de 25-125 °C, o qual é resultado da evaporação da água adsorvida nos *whiskers*. Para as membranas obtidas após a primeira modificação (PLA SBS + *whiskers* e PLA eletro + *whiskers*), a perda de massa desse evento foi de 0,4 e 0,1%. O segundo evento térmico, na faixa de 206-445 °C, corresponde à decomposição térmica do polissacarídeo, incluindo a desidratação dos anéis e decomposição de unidades acetiladas e

desacetiladas de quitina, além da degradação e decomposição do poli (ácido láctico), cuja perda de massa foi de 94,3 e 92,2% para as membranas obtidas por SBS e eletrofiação, respectivamente. Além disso, pode-se observar que houve um pequeno aumento nos valores de T_{onset} das membranas após a primeira modificação, mostrando uma ligeira maior estabilidade térmica após essa etapa. Conforme mencionado, é provável que existam ligações hidrogênio entre os grupos C=O do PLA e os grupos amida da quitina (SHAMSHINA et al., 2018), sendo assim, essa interação pode dificultar o movimento das cadeias moleculares, resultando em maior estabilidade térmica para as membranas contendo *whiskers* e, conseqüentemente, maiores valores de T_{onset} . LIU et al. (2017b) obtiveram resultados semelhantes, os quais desenvolveram nanofibras de PLA e *whiskers* de celulose, as quais também apresentaram maior estabilidade térmica com o aumento da concentração de *whiskers* na fibra.

Para as membranas posteriores à segunda modificação, PLA SBS + *whiskers* + AgNP e PLA eletro + *whiskers* + AgNP, a perda de massa foi de 1,0 e 1,1 % no primeiro evento. Uma hipótese para este aumento seria a maior adsorção de água na superfície dos *whiskers* durante o processo da segunda modificação (aspersão de AgNP). O segundo evento térmico, na faixa de 212-444 °C, corresponde à degradação da quitina e do PLA, cuja perda de massa foi de 89,6 e 85,6% para as membranas obtidas por SBS e eletrofiação, respectivamente. Em contraste com dados encontrados na literatura (ABDEL-MOHSEN et al., 2013; BLANCO; BOTTINO, 2016; MAZIYA; DLAMINI; MALINGA, 2020), em que a incorporação de nanomateriais inorgânicos aumenta a estabilidade térmica dos polímeros, foi observada uma diminuição da T_{onset} das membranas bicamadas após a incorporação de AgNP. Esse fenômeno pode ser explicado devido à atividade catalítica das nanopartículas de Ag, que ocasionaram diminuição da energia de ativação, favorecendo a degradação (KAMAL et al., 2017).

Outro fator a ser analisado é o aumento na porcentagem de resíduo carbonizado de acordo com as etapas de modificação. O aumento observado para a primeira modificação é consequência da adição de *whiskers* de β -quitina, e o aumento para a segunda é gerado pela adição de AgNP, sendo esta uma evidência da presença de nanopartículas.

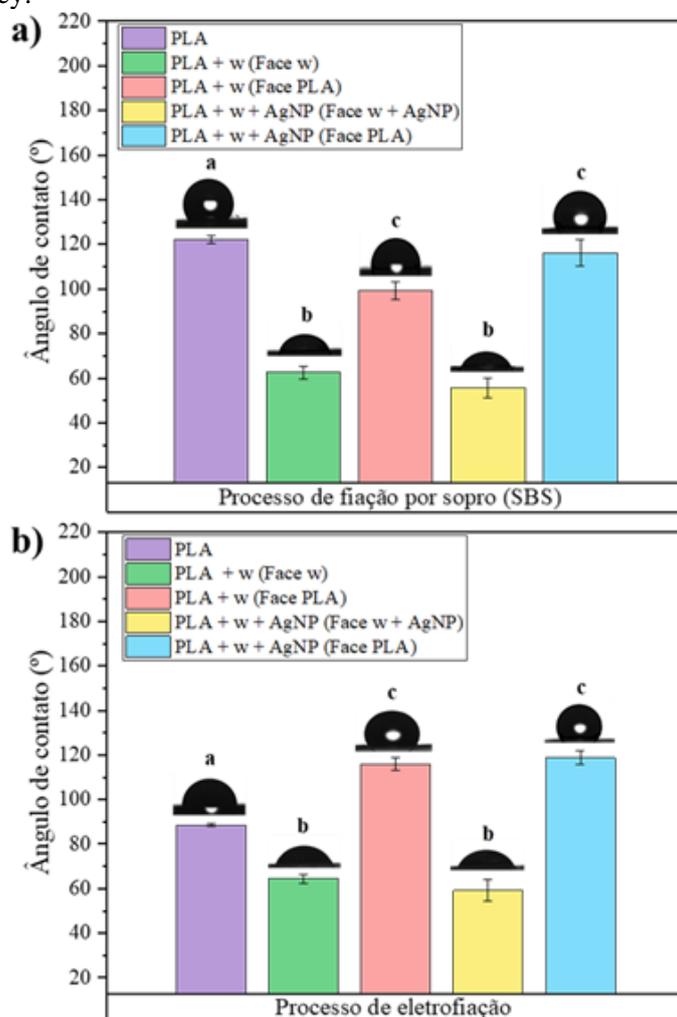
5.7 Medidas de ângulo de contato

A molhabilidade de uma superfície em relação à água, também conhecida como hidrofobicidade / hidrofiliçidade, é considerada uma das propriedades de superfície que mais afeta a resposta biológica de um material a ser implantado, sendo de fundamental importância para aplicações em curativos (OLIVEIRA; ALVES; MANO, 2014). Estudos mostram que para

uma atividade eficaz das membranas bicamadas em curativos, é necessário que a camada interna, em contato com a pele, seja hidrofílica, de modo a absorver o exsudato em excesso liberado em feridas (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; WU et al., 2016). Já a face externa de um curativo é desejável que apresente comportamento hidrofóbico, de forma a evitar a desidratação do leito da ferida (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; WU et al., 2016). Além disso, as células são mais propensas a aderir e proliferar em curativos com hidrofiliidade moderada (ângulo de contato com a água em torno de $40^\circ - 70^\circ$) do que em hidrofílicos (ângulo de contato com água $< 20^\circ$) ou hidrofóbicos (ângulo de contato com água $> 90^\circ$) (MIGUEL et al., 2014; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; OLIVEIRA; ALVES; MANO, 2014). A molhabilidade de uma superfície pode ser alterada de várias formas, por exemplo, pela introdução de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos ou até mesmo alterando sua rugosidade (MIGUEL et al., 2014; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; OLIVEIRA; ALVES; MANO, 2014; WU et al., 2016).

Na Figura 23 podem ser observados os valores médios de ângulos de contato obtidos para cada superfície das membranas bicamadas desenvolvidas neste trabalho. Observa-se que, tanto o nãotecido obtido por SBS quanto o obtido por eletrofiação apresentaram caráter hidrofóbico, visto que os valores de ângulo de contato foram de $122,2^\circ \pm 3,5$ e $88,6^\circ \pm 1,2$, respectivamente.

Figura 23 - Ângulo de contato médio das membranas bicamadas produzidas pelos métodos de a) SBS e b) eletrofição, e suas consequentes modificações com *whiskers* de β -quitina e AgNP. Valores com letras diferentes no mesmo gráfico apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey.



Fonte: Autoria própria.

A diferença de valores pode ser atribuída à morfologia das fibras, sendo que as obtidas por SBS são mais heterogêneas, conforme observado pelas micrografias, em que a superfície por elas compostas, supostamente, mais rugosas em comparação àquelas das mantas eletrofiadas. A rugosidade é um amplificador na teoria de Wenzel: se uma superfície quimicamente hidrofóbica é rugosa, torna-se ainda mais hidrofóbica; se uma superfície hidrofílica é rugosa, torna-se mais hidrofílica, sendo uma possível explicação para o comportamento observado neste estudo (WENZEL, 1936; WU et al., 2016). Outro fator que pode ter contribuído para esse resultado é a capilaridade, sendo esta a propriedade física que os fluídos têm de subirem ou descerem tubos extremamente finos. Em fibras, capilaridade pode ser considerada como o fluxo de um líquido em um substrato poroso, impulsionado por forças capilares (PATNAIK et al., 2010). As fibras obtidas por eletrofição possuem diâmetros e poros

menores do que as fibras obtidas por SBS, conforme observado nas micrografias da Figura 12, apresentando mais intensamente forças capilares do que as fibras obtidas por SBS. Embora essas forças não sejam suficientes para molhar completamente o tecido, podem favorecer para que sua superfície exiba menor hidrofobicidade em relação às obtidas pelo processo de SBS.

É possível observar também a diferença no comportamento das faces das membranas após a modificação com *whiskers* de β -quitina, diminuindo o ângulo de contato consideravelmente para um comportamento hidrofílico moderado ($40^\circ - 70^\circ$), mais indicado para curativos, apresentando ângulos de contato na faixa intermediária de $55,7^\circ - 64,4^\circ$ (MIGUEL et al., 2014; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; OLIVEIRA; ALVES; MANO, 2014). Este comportamento encontra-se de acordo com o esperado, uma vez que os *whiskers* possuem um grande número de grupos hidrofílicos em sua superfície, como hidroxila, *N*-acetil e um pequeno número de grupos amino, os quais são responsáveis pelo seu comportamento hidrofílico (OU et al., 2018, 2019; YU et al., 2017). A adição de prata não causou alterações no comportamento desta superfície, sendo que tal afirmação pode ser comprovada pelo teste de Tukey (5%), demonstrando que as faces contendo somente *whiskers* e as contendo *whiskers* e AgNP não apresentaram diferenças significativas nos valores de ângulo de contato.

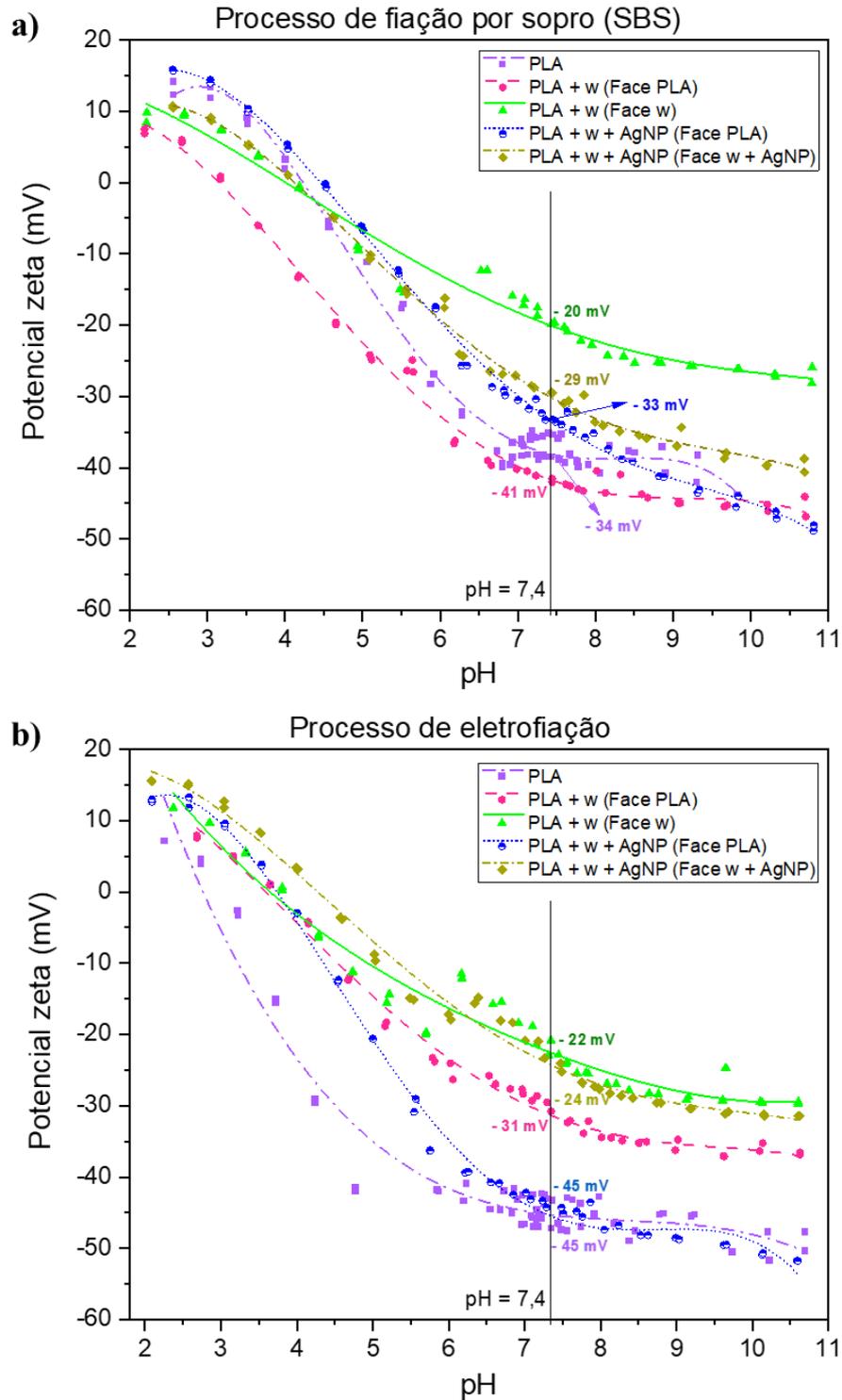
Outro comportamento interessante é a diferença no ângulo de contato da face hidrofóbica após a primeira modificação (com *whiskers* de β -quitina). Para a membrana obtida por SBS, o ângulo de contato da face de PLA diminuiu de $122,2^\circ \pm 3,5$ para $99,3^\circ \pm 3,8$, enquanto para a membrana eletrofiada o comportamento foi contrário, aumentando de $88,6^\circ \pm 1,2$ para $115,9^\circ \pm 2,7$. Uma possível explicação está nos diferentes tamanhos de poros das mantas resultantes do emprego de diferentes técnicas de fiação. Nas micrografias, Figura 12, é possível observar poros maiores para as mantas obtidas por SBS, causando alojamento dos *whiskers* não só na superfície, mas também no interior da manta, em comparação às mantas eletrofiadas, nas quais os *whiskers* permanecerem aderidos apenas à superfície. Por meio das observações realizadas é possível concluir que a modificação com *whiskers* de β -quitina surtiu o efeito esperado de tornar uma superfície da membrana hidrofílica enquanto a outra permaneceu hidrofóbica. Portanto, o comportamento de molhabilidade das membranas está de acordo com o desejado para curativos de pele.

5.8 Potencial zeta de superfície

A interação do líquido com grupos funcionais da superfície do sólido provoca o acúmulo de cargas elétricas na interface sólido/líquido, sendo que o potencial elétrico gerado é chamado de potencial zeta (LUXBACHER et al., 2009; PETRINIĆ et al., 2018). Em se tratando de uma propriedade interfacial, o potencial zeta é influenciado pelas propriedades da superfície sólida e do líquido circundante, além de ser dependente do pH da solução em que o sólido está em contato (LUXBACHER et al., 2009; PETRINIĆ et al., 2018). Portanto, quando um curativo entra em contato com os fluído fisiológicos presentes na ferida, haverá formação de uma carga na interface.

O processo de cicatrização de feridas cutâneas compreende três fases principais, a saber: inflamação, proliferação e remodelação do tecido (SCHREML et al., 2010). Estudos mostram que, durante as fases da cicatrização, a superfície da pele apresenta mudanças nos valores de pH, o que pode afetar o processo de cicatrização, levando à inibição de enzimas endógenas e alterando a probabilidade de colonização de bactérias (SCHREML et al., 2010). Apesar de não haver consenso na literatura, estudos mostram que o pH da pele saudável pode variar de 4,0 a 6,3, podendo ser influenciado por diversos fatores, como local em que foi realizado a medida e até mesmo pH da água de banho (LAMBERS et al., 2006). Quando a pele é lesionada ocorre uma perda local do estrato córneo, levando a valores de pH mais altos em feridas em comparação com a pele saudável (SCHREML et al., 2010). Estudos mostraram valores de pH médio de 7,4 para feridas agudas, portanto torna-se importante avaliar o comportamento das membranas neste meio (SCHNEIDER et al., 2006). Na Figura 24 estão as curvas que demonstram o comportamento do potencial zeta das superfícies das membranas quando em contato com diferentes valores de pH, os quais variam de 2 a 11. Os valores obtidos para o pH de 7,4 encontram-se em destaque.

Figura 24 – Curvas de Potencial zeta (mV) *versus* pH das membranas bicamadas obtidas por (a) processo de SBS e (b) processo de eletrofiação.



Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que, no geral, os menores valores, em módulo, observados de potencial zeta foram referentes às faces modificadas, seja somente com *whiskers* de β -quitina, ou com nanopartículas de prata, sendo o menor valor encontrado de -20 mV correspondente à

face contendo *whiskers* de β -quitina da membrana obtida por SBS. Já os maiores valores obtidos foram referentes às faces contendo PLA, sendo o maior valor encontrado de -45 mV para a membrana de PLA obtida por eletrofiação.

O estudo realizado por ALTANKOV; RICHAU e GROTH (2003) traz resultados interessantes de correlação entre potencial zeta, grupos funcionais presentes na superfície, molhabilidade da superfície e proliferação e adesão de fibroblastos humanos. Os resultados mostraram magnitudes de potencial zeta na seguinte ordem: OH (-16 mV) < NH₂ ~EPOXY (-24 mV) < COOH (-29 mV) < CF₃ (-37 mV) < SO₃ (-54 mV) para o valor de pH = 7,4. A interação do fibroblasto caracterizada pela eficácia da adesão celular e propagação diminuiu quase na ordem oposta: funções NH₂ > OH > EPOXY > SO₃ > COOH > CF₃, em que NH₂ obteve a melhor interação. Curiosamente, a melhor interação celular foi encontrada na superfície NH₂ moderadamente molhada, a qual apresentou ângulo de contato com a água de 65°, e a pior interação foi encontrada para a superfície CF₃ (ângulo de contato = 85°), indicando que não apenas o potencial zeta de superfície, mas também o tipo de grupos funcionais e a molhabilidade da superfície podem desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas (ALTANKOV; RICHAU; GROTH, 2003).

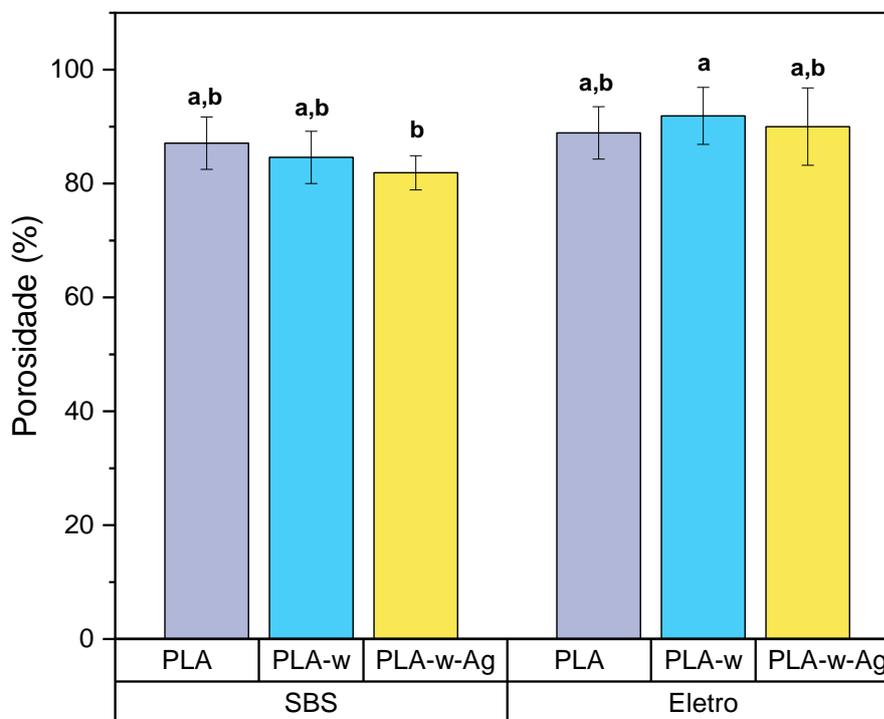
Conforme já apresentado, as faces das membranas após a modificação com *whiskers* de β -quitina e AgNP apresentam comportamento hidrofílico moderado, variando de 55,7° – 64,4°. Já as faces contendo PLA apresentam ângulos de contato acima de 88°. Além disso, os grupos funcionais que apresentaram as melhores interações com células no estudo de ALTANKOV; RICHAU e GROTH (2003). estão presentes nas faces modificadas com *whiskers* de beta-quitina, ricos em grupos OH e, em muito menor quantidade, grupos NH₂. Portanto, as faces modificadas possuem propriedades de potencial zeta, grupos funcionais e molhabilidade de acordo com o desejado para proliferação e adesão de fibroblastos.

5.9 Porosidade (%)

A porosidade de um curativo é um fator muito importante para sua caracterização, pois afeta a capacidade de absorção de exsudatos da ferida, o que pode reduzir a probabilidade de infecção (AMINI MOGHADDAM et al., 2021). A porosidade tem impactos significativos na adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, além de favorecer a troca de gases e nutrientes com o meio ambiente, bem como fatores de crescimento, auxiliando no processo de regeneração tecidual (YAO et al., 2017). O estudo da porosidade das membranas foi realizado

pelo método de deslocamento de líquidos utilizando etanol e os resultados encontram-se na Figura 25.

Figura 25 – Porosidade média (%) das membranas bicamadas. Valores com letras diferentes no mesmo gráfico apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostram que todas as membranas desenvolvidas possuem alta porosidade, acima de 80%, independentemente do método empregado (SBS ou eletrofição), e da etapa de modificação da superfície em que a membrana se encontra. No geral, os valores não apresentam diferenças significativas, exceto pelas membranas de PLA + *whisker* + AgNP (SBS) apresentando 82% (menor valor) e a membrana de PLA + *whiskers* (eletrofição) apresentando 92% (maior valor). Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de as membranas obtidas por SBS apresentarem poros maiores, o que causou alojamento dos *whiskers* não somente na superfície, mas também no interior das mantas, diminuindo sua porosidade. Já para as mantas eletrofiadas, os *whiskers* permaneceram aderidos apenas à superfície. Tal comportamento foi citado anteriormente e associado às mudanças nos ângulos de contato.

De acordo com CHONG *et al.* (2007), geralmente a porosidade de uma estrutura a ser utilizada como suporte de proliferação celular deve estar entre 60-90%, uma vez que favorece a penetração celular. Dessa forma, todas as membranas desenvolvidas nesse estudo estão aptas para serem utilizadas como curativos para lesões de pele.

De modo a compararmos os valores de porosidade obtidos com outros estudos utilizando a técnica de SBS, podemos citar o estudo de SOARES DE AZERÊDO; MARCONCINI (2021). Neste estudo foram produzidas membranas de PLA utilizando a técnica de SBS para serem utilizadas como sistema de filtração de água. As membranas obtidas por meio de soluções contendo 10% e 16% (em massa) de PLA em diclorometano apresentaram porosidade de $87,3\% \pm 1,6\%$ e $88,0\% \pm 0,9\%$, respectivamente. Assim, as membranas desenvolvidas no presente estudo apresentam porosidades semelhantes às membranas obtidas por outros pesquisadores utilizando a mesma técnica.

Como exemplo de membrana de PLA obtida pela técnica de eletrofiação, podemos citar o estudo de ALIPPILAKKOTTE; KUMAR e SREEJITH (2017) Foram desenvolvidas membranas partindo de soluções de PLA e nanopartículas de prata em 2,2,2-Trifluoroetanol para utilização como curativos, variando-se as concentrações de prata em 1% (PLA-1 Ag), 2% (PLA-2 Ag) e 3% (PLA-3 Ag). Os resultados mostraram valores de porosidades de 78,05%, 68,52% e 79,4% para PLA-1 Ag, PLA-2 Ag e PLA-3 Ag, respectivamente. Também foi possível observar que, até 2% de AgNP, as amostras não causaram mudanças repentinas no crescimento celular. Além disso, PLA-1 Ag e PLA-2 Ag não foram tóxicas para as células de fibroblastos, mas também apresentaram biocompatibilidade para acelerar a proliferação e diferenciação celular (ALIPPILAKKOTTE; KUMAR; SREEJITH, 2017). As membranas eletrofiadas desenvolvidas no presente estudo apresentam porosidades ainda maiores que as do estudo mencionado, evidenciando as altas porcentagens de porosidades obtidas pela técnica de eletrofiação.

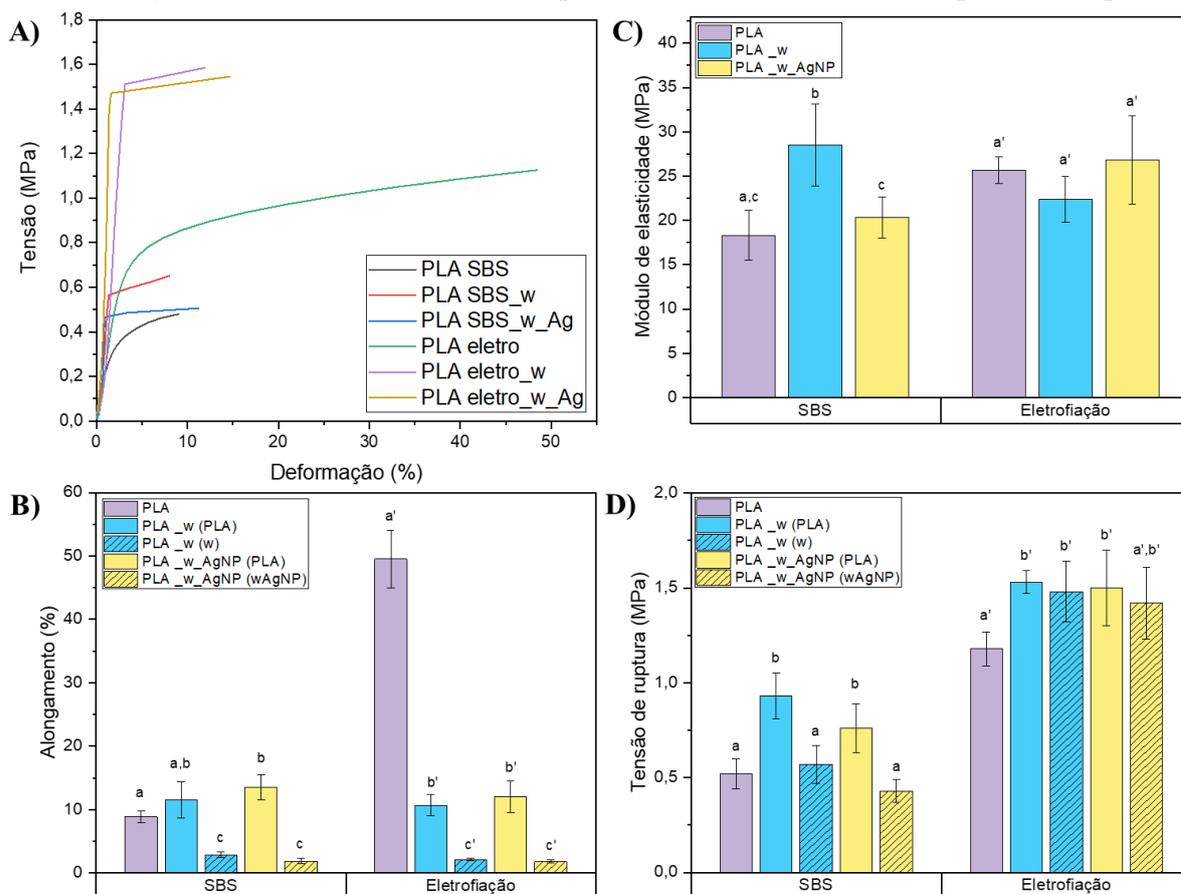
Em suma, os resultados de porosidade estão compatíveis com dados encontrados na literatura para esses materiais, além disso, encontram-se com dentro dos valores desejados para sua utilização como curativos.

5.10 Propriedades mecânicas (Tração)

As propriedades mecânicas de um curativo são fundamentais para sua aplicação e para o bom desempenho de suas funcionalidades (LI et al., 2019a). É necessário que as membranas a serem utilizadas como curativos possuam propriedades mecânicas adequadas para atuar como barreira física, protegendo o leito da ferida (HE et al., 2020). Além disso, o material a ser aplicado precisa suportar as forças fisiológicas durante o processo de reparo da ferida e fornecer suporte físico para o crescimento e migração celular (LIU et al., 2018; RAMALINGAM et al., 2019). Considerando a importância do conhecimento dessas propriedades, as análises

mecânicas de tração das membranas desenvolvidas neste trabalho foram analisadas. Na Figura 26 (A) estão apresentadas as curvas de tensão em função da deformação das membranas, por meio das quais foi possível obter os dados de alongamento (%) (B), módulo de elasticidade (MPa) (C) e Tensão de ruptura (D).

Figura 26 – Propriedades mecânicas das membranas. (A) Tensão (MPa) versus Deformação (%), (B) Alongamento (%), (C) Módulo de elasticidade (MPa), (D) Tensão de ruptura (MPa). Valores com letras diferentes no mesmo gráfico apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey, as análises foram realizadas comparando-se as membranas obtidas pelo mesmo processo.



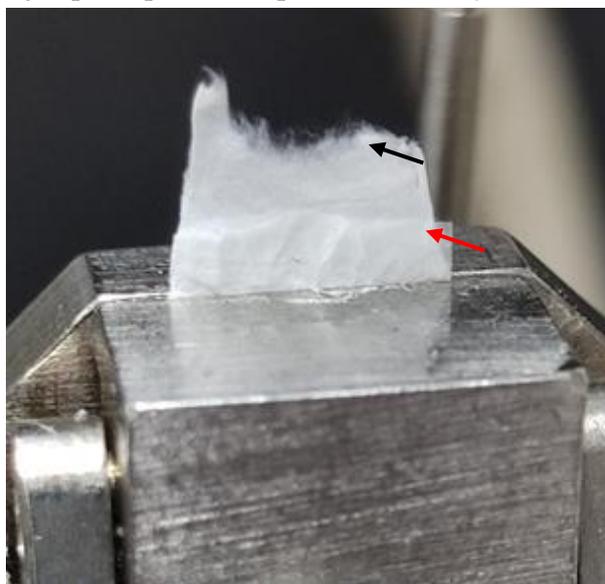
Fonte: Autoria própria.

Na Figura 26 (A) podemos observar que as curvas de tensão em função da deformação das membranas de PLA sem modificações apresentam perfil contínuo, sendo o seu último ponto caracterizado pela tensão de ruptura (MPa). Observa-se que as fibras eletrofiadas apresentaram maiores valores de tensão de ruptura, tal fato pode ser consequência de um maior efeito adesivo para as fibras eletrofiadas em relação às fibras SBS, devido ao seu menor diâmetro e maior compactação. Também pode-se observar que essas membranas apresentam alongamento (%) (Figura 26 (B)) na faixa de 8,9% e 49,5%, módulo de elasticidade (MPa) (Figura 26 (C)), de

18,3 MPa e 25,6 MPa, e tensão de ruptura (MPa) (Figura 26 D) de 0,5 MPa e 1,2 MPa para os processos de SBS e eletrofiação, respectivamente.

Já para as membranas após as modificações de superfície foi possível observar dois pontos de ruptura, o primeiro é devido à ruptura da camada de *whiskers* de β -quitina, sendo representado por uma quebra na curva, e o segundo ponto de ruptura é devido à ruptura da segunda camada do curativo, as fibras de PLA, sendo representado pelo último ponto das curvas. Também foi possível observar esse comportamento para membranas após a segunda modificação, entretanto, neste caso, o primeiro ponto de ruptura é devido à ruptura da camada contendo *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata. Esse comportamento é facilmente observado na Figura 27, mostrando uma membrana de PLA + *whiskers* de β -quitina obtida pelo processo de SBS logo após a sua ruptura no experimento de tração. É possível observar que as camadas de PLA e de *whiskers* romperam em momentos diferentes, ilustrando o comportamento observado no gráfico de tensão em função da deformação. Esse comportamento foi observado para todas as membranas que passaram por modificações, mostrando que as membranas de PLA provavelmente possuem maior alongamento em relação às camadas de *whiskers*.

Figura 27 - Imagem de membrana composta por camada de PLA + camada de *whiskers* de β -quitina obtida pelo processo de SBS logo após ruptura no experimento de tração.



Fonte: Autoria própria.

Os gráficos apresentados nas Figuras 26 (B), (C) e (D) contêm os resultados de ambas as faces, modificada e não modificada das membranas, em que as colunas das faces modificadas estão hachuradas. Na Figura 26 (B) podem ser observados os valores de alongamento (%) das

membranas bicamadas. Primeiramente discutiremos os resultados para as membranas obtidas pelo processo de SBS. Neste caso, após as modificações, foi possível observar um ligeiro aumento no alongamento (%) para a camada de PLA em comparação com essa camada sem modificação de superfície. Porém, esse valor somente foi significativamente diferente para as membranas após a segunda modificação com a deposição das AgNPs, apresentando alongamento de 13,5%. Também é possível observar os valores de alongamento das camadas contendo *whiskers*, os quais estão na ordem de 2,9% (contendo apenas *whiskers*) e 1,9% (contendo *whisker* e AgNPs). Portanto, foi possível confirmar a observação constatada na Figura 27, de que as camadas de fibras de PLA possuem maior alongamento (%) do que as camadas de *whiskers* e *whiskers* + AgNP.

Para as membranas obtidas pelo processo de eletrofição, o mesmo perfil foi observado, com valores de alongação de magnitudes similares, como pode ser observado na Figura 26 (B). Entretanto, ao se comparar o comportamento da fibra de PLA sem modificação e seu comportamento após as modificações, pode-se observar que o valor de alongamento (%) sofreu redução de 49,5 % para 10,7% (após primeira modificação – deposição de *whiskers*) e 12,0% (após segunda modificação – deposição de AgNPs). Conforme mencionado, é provável que existam ligações hidrogênio entre os grupos C=O do PLA e os grupos amida da quitina (SHAMSHINA et al., 2018), impactando tanto nas propriedades térmicas quanto mecânicas, pois essa interação pode dificultar o movimento das cadeias moleculares. Assim, essas interações fazem com que as fibras de PLA sejam capazes de alongar menos, pois estão fortemente ligadas à camada de *whiskers*, afetando as propriedades mecânicas quando comparadas às amostras sem modificação. Esse perfil somente pôde ser observado para as membranas eletrofiadas, pois seus valores de alongamento são superiores aos valores observados para SBS.

O gráfico de Módulo de elasticidade, Figura 26 (C), mostra que as membranas apresentam valores próximos, entre 18,3 MPa e 28,5 MPa, sendo o menor valor para a membrana de PLA sem modificação (SBS) e o maior para a membrana de PLA + *whiskers* de β -quitina e AgNP (SBS).

Com relação ao gráfico de Tensão na ruptura (MPa), Figura 26 (D), primeiramente discutiremos os resultados para as membranas obtidas pelo processo de SBS. Neste caso, após as modificações foi possível observar um aumento na tensão de ruptura (MPa) de 0,5 MPa (sem modificação) para 0,9 MPa (após primeira modificação – deposição de *whiskers*) e 0,8 MPa (após segunda modificação – deposição de AgNPs). No geral, conclui-se que, após as

modificações de superfície, as fibras de PLA obtidas por SBS apresentaram maiores tensões de rupturas.

O mesmo comportamento pôde ser observado para as membranas eletrofiadas, em que foi possível observar um aumento na tensão de ruptura de 1,2 MPa (sem modificação) para 1,5 MPa, valor obtido tanto após a primeira, quanto após a segunda modificação. Portanto, apesar de as fibras de PLA eletrofiadas apresentarem valores inferiores de alongamento (%) após as modificações, elas apresentam valores de tensão de ruptura (MPa) superiores.

A literatura mostra dados muito variados com relação às propriedades mecânicas da pele, sendo encontrados valores de tensão de ruptura de 0,1-32 MPa e alongamento na ruptura de 17-207%; essa divergência ocorre devido à heterogeneidade da pele humana e dependem de diversos fatores como idade, cor da pele e herança genética (ADELI; KHORASANI; PARVAZINIA, 2019; QU et al., 2018; ULLAH et al., 2020). Os valores de Módulo de elasticidade também divergem bastante na literatura, sendo encontrados valores na faixa de 4,5 KPa a 87,1 MPa, e essa variação depende do método de análise realizado e local do corpo, além dos fatores citados anteriormente (KANG et al., 2018). Assim, as membranas obtidas apresentaram valores de tensão de ruptura e módulo de elasticidade dentro da faixa dos valores encontrados na literatura para a pele humana. Além disso, em casos em que o curativo não atenda à propriedade mecânica exigida, há também a possibilidade de se utilizar um curativo secundário. Um curativo pode ser caracterizado por um único produto ou pela combinação de dois ou mais materiais, em que um dos materiais fique em contato com a pele e o segundo seja um material secundário que não ficará em contato com a pele, sendo que esta segunda camada pode ter diversas funções como sustentação do material primário ou até mesmo absorção (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; VOWDEN; VOWDEN, 2017).

5.11 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana da solução coloidal de AgNP foi comprovada por meio do experimento de diluição seriada para calcular a concentração inibitória mínima (MIC) contra as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e a *Staphylococcus aureus* (Gram positiva). Para ambas as espécies de bactérias a solução apresentou atividade antimicrobiana até o 5º poço das fileiras E, F e G. Considerando-se a máxima concentração possível da solução de $105 \mu\text{g mL}^{-1}$, a MIC encontra-se em aproximadamente $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como exemplos de MIC encontrados na literatura podem ser citados: MIRZAJANI et al. (2011) produziram AgNP esféricas com diâmetro médio de 17 nm, as quais apresentaram MIC de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a bactéria Gram-

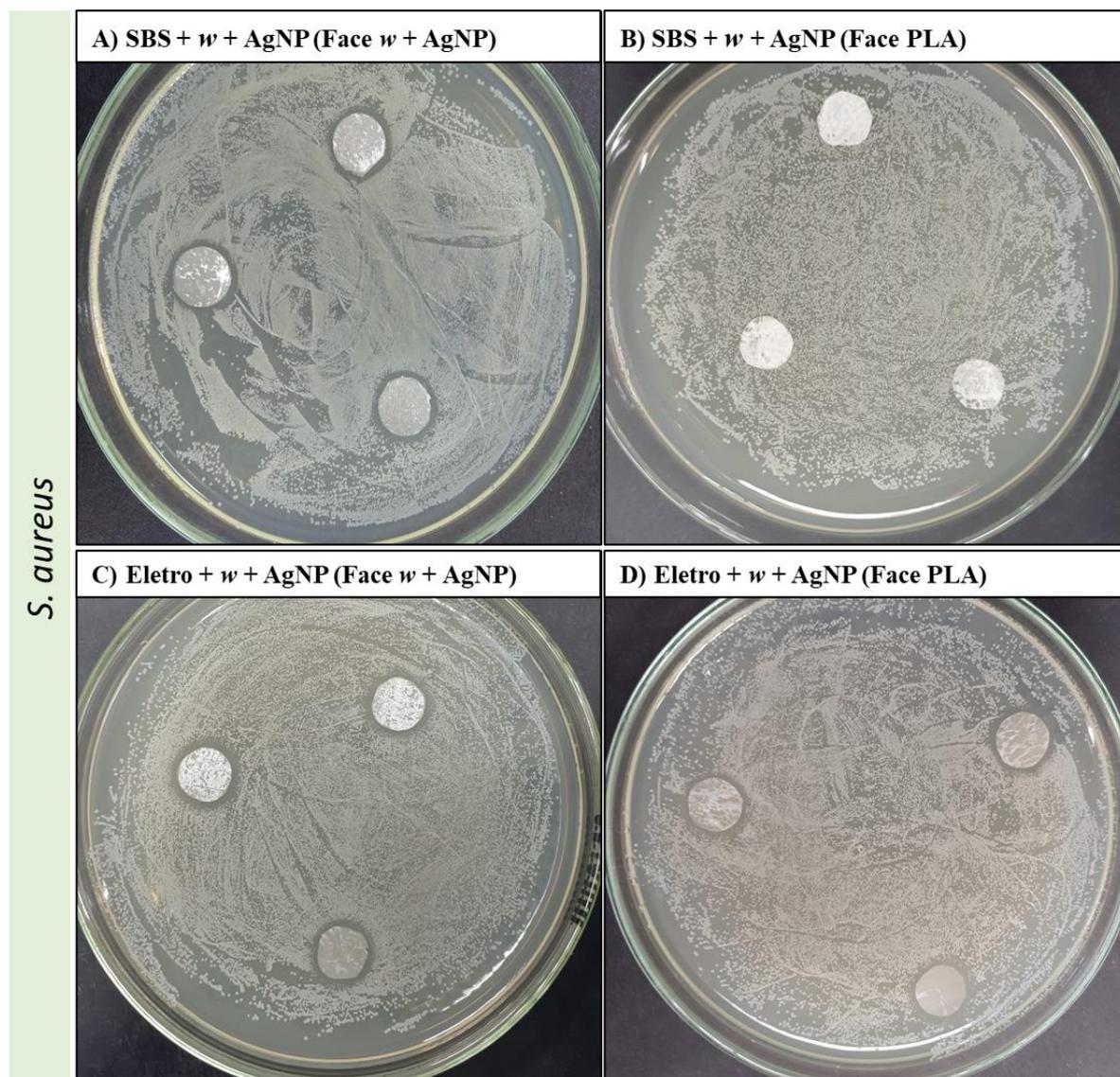
positiva *S. aureus*, GURUNATHAN (2015) também obteve AgNP esféricas, as quais possuíam diâmetro médio de 8 nm e apresentaram MIC de $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a bactéria gram-negativa *E. Coli*. Os dados encontrados na literatura para MIC de AgNP são muito variados, sendo que essas diversas MICs podem ser consequência de dois fatores principais: o formato e o diâmetro das nanopartículas (ZHENG et al., 2018).

Conforme mencionado, a atividade antimicrobiana está fortemente associada ao tamanho da nanopartícula, em que menores diâmetros são responsáveis por atividades antimicrobianas melhores (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Tal fato pode justificar a baixa concentração obtida para o valor de MIC do presente estudo, uma vez que as AgNPs obtidas possuem diâmetro de $2,1 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$.

De forma a ratificar a eficiência das AgNP sintetizadas, as membranas bicamadas de PLA produzidas por SBS e eletrofiação modificadas tanto com *whiskers* de β -quitina, como com AgNP foram submetidas a estudo de disco-difusão em ágar contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo avaliada apenas a face modificada, ou seja, aquela contendo *whiskers* e AgNP.

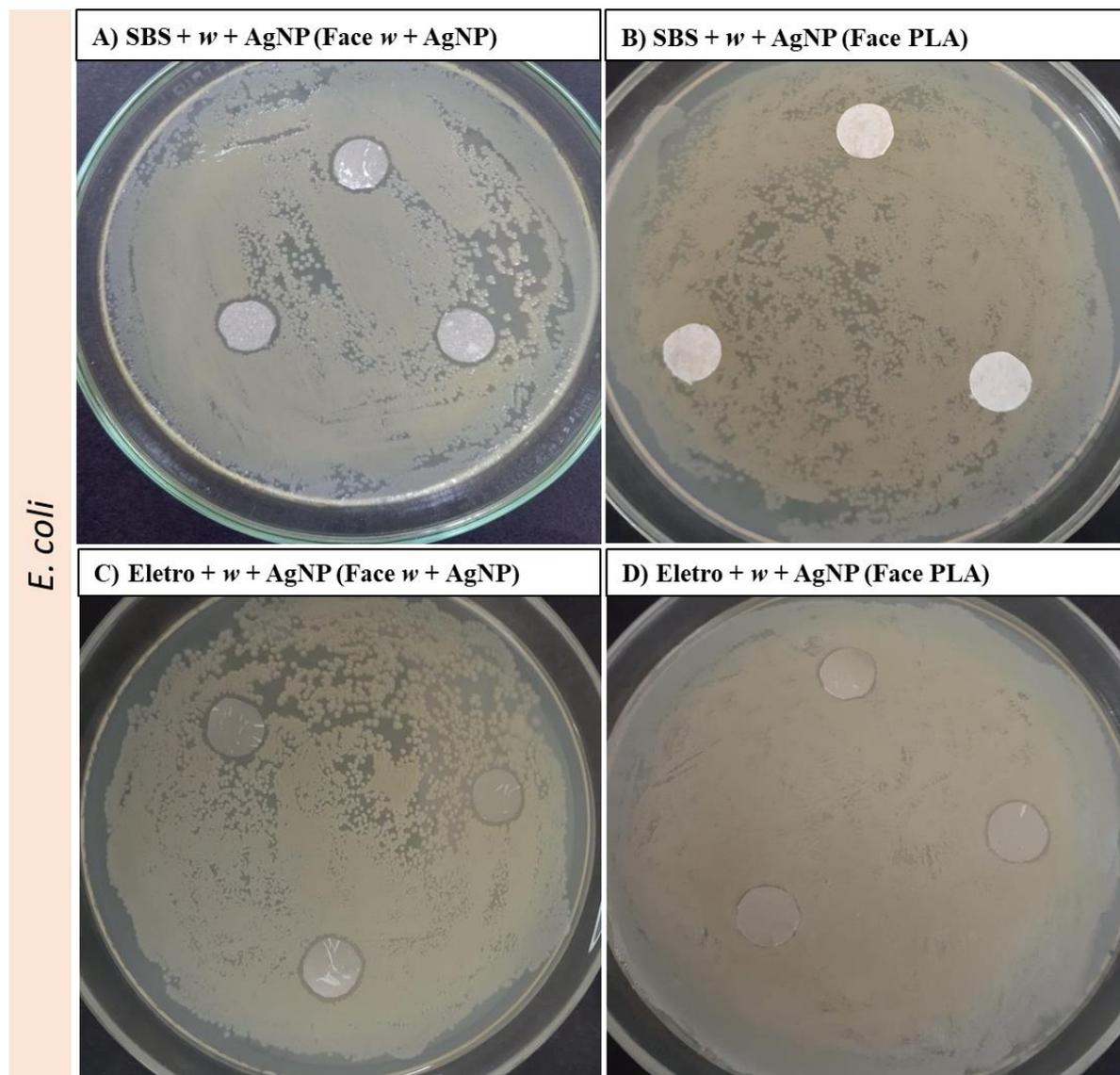
Com a finalidade de comprovar que a atividade antimicrobiana das membranas é referente à ação das AgNP e não aos *whiskers* ou ao PLA, superfícies de membranas compostas apenas por PLA ou *whiskers* também foram submetidas ao ensaio. Os ensaios de disco-difusão em ágar das membranas obtidas após a primeira modificação (deposição de *whiskers*), tanto para as amostras eletrofiadas como as obtidas por SBS não apresentaram atividade antimicrobiana, em nenhuma das faces das membranas, isto é, face contendo somente fibras de PLA e face contendo *whiskes* de β -quitina. Para as membranas após a segunda modificação (deposição de AgNP) todas as membranas exibiram atividade antimicrobiana para ao menos em uma das faces, cujos resultados encontram-se nas figuras 28 e 29. Os resultados de todos os ensaios encontram-se resumidos na Tabela 4.

Figura 28. Experimento de disco-difusão em ágar das amostras após as 2 etapas de modificação em relação à bactéria *S. aureus*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Experimento de disco-difusão em ágar das amostras após as 2 etapas de modificação em relação à bactéria *E. coli*.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Halos de inibição médios obtidos para as bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* e Gram positiva *Staphylococcus aureus* de membranas bicamadas obtidas por SBS e eletrofiação modificadas com *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata.

Bactéria	Método	Amostra	Atividade antimicrobiana	Halo de inibição (mm)
S. aureus	SBS	PLA + <i>whisker</i> (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + <i>whisker</i> (Face <i>whisker</i>)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face w + AgNP)	SIM	12,0 ± 0,4 ^{a,b}
	Eletro	PLA + <i>whisker</i> (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + <i>whisker</i> (Face <i>whisker</i>)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face PLA)	SIM	11,5 ± 0,6 ^b
		PLA + w + AgNP (Face w + AgNP)	SIM	12,4 ± 0,5 ^a
E. coli	SBS	PLA + <i>whisker</i> (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + <i>whisker</i> (Face <i>whisker</i>)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face w + AgNP)	SIM	12,6 ± 0,7 ^a
	Eletro	PLA + <i>whisker</i> (Face PLA)	NÃO	-
		PLA + <i>whisker</i> (Face <i>whisker</i>)	NÃO	-
		PLA + w + AgNP (Face PLA)	SIM	10,5 ± 0,2 ^c
		PLA + w + AgNP (Face w + AgNP)	SIM	11,5 ± 0,3 ^b

* Média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade de acordo com o teste de *Tukey*.

Fonte: Autoria própria.

Para as membranas obtidas por meio de SBS pode-se observar que as faces contendo fibras de PLA não apresentaram halo de inibição. Já a face contendo *whisker* e AgNP apresentou halo de inibição para ambas as bactérias. Para as membranas obtidas por eletrofiação, pode-se observar que há formação de halo de inibição para ambas as faces, tanto para a face sem modificação, nanofibras de PLA, como para a face modificada, *whiskers* de β -quitina + AgNP. Portanto, apesar de neste último caso a deposição ter ocorrido apenas de um lado da membrana, o lado em que não houve modificação também possivelmente apresenta nanopartículas de prata. Uma possível explicação para este fenômeno é com relação à espessura da membrana (0,076 mm), facilitando a deposição de AgNP também na outra camada uma vez que as membranas obtidas por essa técnica são 2,5× mais finas do que as obtidas por SBS (0,190

mm). Outra possibilidade é que a espessura reduzida pode ter permitido a migração das AgNPs através da membrana durante o contato com o meio de cultura.

Outro fator a ser observado é que para a bactéria *S. aureus*, as membranas não apresentam diferenças significativas entre seus halos de inibição. Já para a *E. coli*, a membrana produzida por SBS (face contendo AgNP) apresenta maior ação contra a bactéria, seguida da membrana produzida por eletrofiação (face AgNP) e a que apresenta menor ação é a face de PLA da membrana produzida por eletrofiação.

Os resultados permitem concluir que a atividade antimicrobiana observada é proveniente das nanopartículas de prata. Conforme citado anteriormente, a ação das nanopartículas pode ser explicada devido à sua grande afinidade com grupos funcionais contendo fósforo e enxofre, os quais são encontrados em proteínas presentes nas membranas de bactérias. Além disso, as nanopartículas também podem interagir no interior do citoplasma com outras proteínas contendo enxofre, bem como com compostos contendo fósforo, caso do DNA. Dessa forma, as alterações morfológicas na membrana das bactérias, bem como os possíveis danos causados pelas nanopartículas que interagem com o DNA, afetarão as bactérias em processos de respiração e divisão celular, causando finalmente a morte da célula (MORONES et al., 2005; VAN DONG et al., 2012).

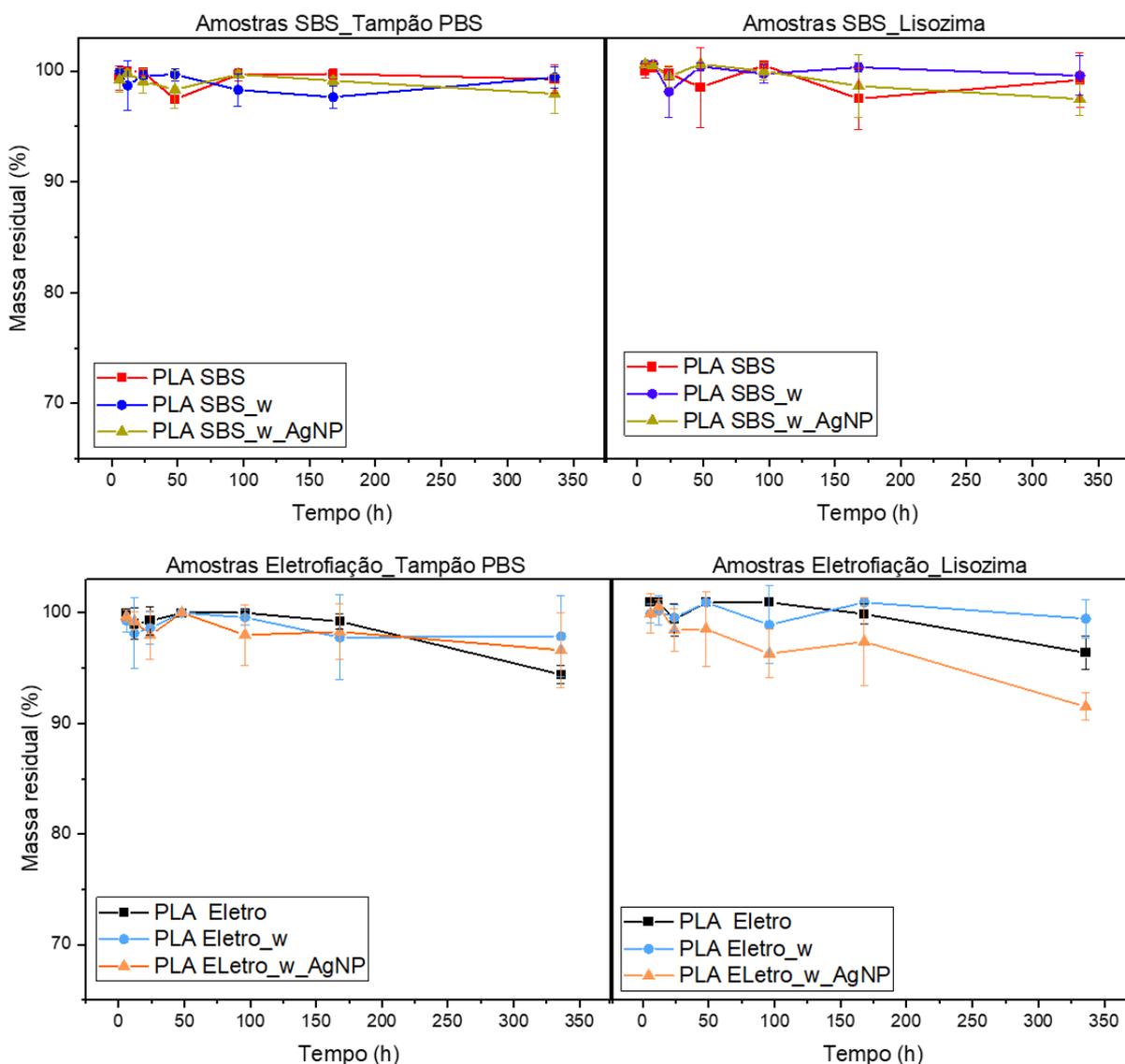
É possível concluir que a modificação da superfície da membrana com AgNP foi efetuada com sucesso e que conferiu à membrana atividade antimicrobiana, estando de acordo com um dos pré-requisitos para um curativo. Devido às suas propriedades, a face contendo AgNP foi projetada para estar em contato direto com a lesão; assim, todas as membranas obtidas após a segunda modificação estão aptas para impedir a infecção de lesões de pele. Esta propriedade é um dos fatores responsável por corroborar com o processo de cicatrização da pele e, assim, auxiliar no fechamento de grandes feridas.

5.12 Degradação enzimática

O estudo de degradação enzimática é muito relevante quando se trata de curativos, uma vez que o experimento tem como objetivo ditar o tempo necessário para que um curativo se degrade, ou seja, seu tempo de vida útil em atividade (ESKANDARINIA et al., 2019). Essa informação pode auxiliar a direcionar o curativo para determinada aplicação, a depender das necessidades que precisam ser atendidas para uma ferida específica. A lisozima, proteína de 14 kDa, é produzida pelo sistema imunológico humano, sendo encontrada abundantemente em secreções, saliva, lágrimas, além de ser encontrada em grande parte dos tecidos (HASAN et al.,

2017; MARTINI et al., 2018). Sua função no sistema imunológico deve-se à sua atuação especificamente na ligação β -1,4 existente entre o ácido N-acetil murâmico e a N-acetilglucosamina na molécula de polissacarídeo peptídico, destruindo assim a parede celular bacteriana (LI; KNETSCH, 2018). Assim, a concentração de lisozima no local da ferida é maior de forma a prevenir infecções microbianas, sendo importante avaliar o comportamento do curativo neste local de aplicação (HASAN et al., 2017). Estudos relataram atividade consideravelmente aumentada da lisozima em feridas, encontrando valores de 4830 ± 1848 U / mL para feridas infectadas e 376 ± 240 U / mL em feridas não infectadas (HASMANN et al., 2011; TALLIAN et al., 2019). Portanto, o experimento foi realizado com solução de tampão fosfato estéril (pH = 7,4) contendo 5.500 U/mL de lisozima de maneira a simular o ambiente de uma ferida. Na figura 30 estão apresentados os resultados de degradação enzimática das membranas em tampão PBS (controle) e solução de lisozima em tampão PBS. A degradação enzimática foi avaliada em função da massa residual (%) de membrana após cada período de incubação.

Figura 30 - Curvas de degradação enzimática das membranas em tampão PBS e solução de lisozima.



Fonte: Autoria própria.

As curvas de degradação enzimática das amostras obtidas por SBS mostram que as mesmas sofrem pouca degradação durante o período de 14 dias de incubação, possuindo massa residual média de 97,3% a 99,3% para tampão PBS e 97,9% a 99,4% para a solução de lisozima.

As curvas de degradação enzimática das amostras obtidas por eletrofição mostram que as mesmas começam a sofrer um leve processo de degradação já na presença de tampão PBS, possuindo a menor porcentagem de massa residual para 14 dias de incubação. Para esse período, as membranas apresentam massa residual média na faixa de 94,4% a 97,9% para tampão PBS. As membranas em solução de lisozima apresentam massa residual média na faixa de 90% a 98,6%, sendo a menor porcentagem observada para aquelas contendo *whisker* e AgNP.

Apesar de os experimentos mostrarem que as membranas de SBS possuem maior estabilidade em solução de lisozima em relação às membranas eletrofiadas, todas as membranas apresentaram massa residual acima de 90%, o que demonstra estabilidade frente ao meio em que serão inseridas. No escopo de engenharia regenerativa, muitas vezes, a rápida degradação do curativo pode não permitir tempo e suporte suficientes para que as células estruturem a sua própria matriz extracelular (OGUERI; LAURENCIN, 2020). Portanto, os resultados sugerem que as membranas possuem a capacidade de se manterem íntegras durante o processo de cicatrização, atuando como *scaffolds* para células, ou seja, como suporte para a adesão e proliferação de células.

6 Conclusões e perspectivas

O presente trabalho permitiu o desenvolvimento de membranas bicamadas compostas por fibras de PLA, *whiskers* de β -quitina e nanopartículas de prata potencialmente aplicáveis no tratamento de lesões de pele com liberação de exsudato. Para tal, nãotecidos de PLA obtidos por eletrofiação e fiação por sopro em solução (SBS) foram submetidos à modificação de superfície em duas etapas; a primeira ocorreu por meio filtração de suspensão aquosa de *whiskers* sobre a superfície e a segunda resultou na deposição de nanopartículas de prata por meio de aspersão utilizando o aparato de SBS.

A otimização de parâmetros de fiação permitiu a obtenção de fibras de PLA, com diâmetros em torno de $1,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e $346 \pm 81 \text{ nm}$ para SBS e eletrofiação, respectivamente. Após a deposição de *whiskers* de β -quitina, as superfícies apresentaram ângulos de contato na faixa de $55,7^\circ - 64,4^\circ$, sendo um comportamento hidrofílico moderado, ambiente no qual as células são mais propensas a aderir e proliferar, além de ser capaz de absorver exsudatos excedentes de fêrias. A superfície sem modificação continuou a apresentar comportamento hidrofóbico, sendo capaz de evitar a desidratação no leito da ferida. A diferença de molhabilidade entre as faces interna (*whiskers* de β -quitina) e externa (fibras de PLA) vai de encontro com o proposto para uma atividade eficaz de membranas bicamadas como curativos. Os *whiskers* utilizados nesta etapa foram obtidos a partir de β -quitina extraída de gládios de lula, os quais apresentaram morfologia e dimensões similares à literatura, com comprimento e diâmetro em torno de $228 \text{ nm} \pm 114 \text{ nm}$ e $15 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, respectivamente.

Após aspersão de AgNPs sobre a camada de *whiskers*, a superfície passou a exibir atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa), comprovada pelo teste de difusão em ágar, podendo ser capaz de impedir a infecção de feridas. As AgNPs utilizadas nesta etapa foram sintetizadas pelo método de Turkevich, as quais apresentaram formato esférico com diâmetro médio de $2,1 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$ e potencial zeta de $-36,7 \text{ mV} \pm 8,1 \text{ mV}$ em média.

Finalizadas as etapas de modificação, imagens de MEV comprovaram a obtenção de membranas bicamadas, em que uma camada apresenta aspecto de fibras (PLA) e a outra de filme (*whiskers* ou *whiskers* + AgNP). As membranas apresentaram altas porosidades (%), variando de 82 % a 92%, podendo favorecer a troca de gases e nutrientes com o meio ambiente, auxiliando no processo de regeneração tecidual. Adicionalmente, as membranas apresentaram propriedades térmicas e mecânicas adequadas. O experimento de degradação enzimática

mostrou que todas as membranas mantiveram ao menos 90% de sua massa após 15 dias de incubação, o que demonstra estabilidade frente ao meio em que serão inseridas.

Para analisar a citotoxicidade das membranas bicamadas obtidas, ensaios *in vitro* em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) estão em andamento, de modo a simular a toxicidade das membranas desenvolvidas nos locais de aplicação. Pretende-se ainda realizar ensaios *in vivo* em camundongos. Ambos os ensaios serão realizados em colaboração com pesquisadores do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo. Os ensaios permitirão avaliar a atividade das membranas e simular a complexidade de interações envolvendo tecidos vascularizados de seres vivos.

7 Referências bibliográficas

ABDEL-MOHSEN, A. M.; HRDINA, R.; BURGERT, L.; ABDEL-RAHMAN, R. M.; HAŠOVÁ, M.; ŠMEJKALOVÁ, D.; KOLÁŘ, M.I; PEKAR, M.; ALY, A. S. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 92, n. 2, p. 1177–1187, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.08.098.

ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, Oxford, GB, v. 29, n. 10, p. 491–495, 2011. DOI: 10.1016/j.mpsur.2011.06.007.

ADELI, H.; KHORASANI, M. T.; PARVAZINIA, M. Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 122, p. 238–254, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.115.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, Cambridge, GB, v. 4, p. 3974–3983, 2014. DOI: 10.1039/c3ra44507k.

ALIPPILAKKOTTE, S.; KUMAR, S.; SREEJITH, L. Fabrication of PLA/Ag nanofibers by green synthesis method using *Momordica charantia* fruit extract for wound dressing applications. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, NL, v. 529, p. 771–782, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.06.066.

ALTANKOV, G.; RICHAU, K.; GROTH, T. The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblasts interaction. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, Weinheim, DE, v. 34, n. 12, p. 1120–1128, 2003. DOI: 10.1002/mawe.200300699.

AMINI MOGHADDAM, M.; DI MARTINO, A.; ŠOPÍK, T.; FEI, H.; CÍSAŘ, J.; PUMMEROVÁ, M.; SEDLAŘÍK, V. Polylactide/polyvinylalcohol-based porous bioscaffold loaded with gentamicin for wound dressing applications. **Polymers**, Basel, CH, v. 13, n. 6, p. 921, 2021. DOI: 10.3390/polym13060921.

ANDRE, R. S.; DOS SANTOS, D. M.; MERCANTE, L. A.; FACURE, M. H. M.; CAMPANA-FILHO, S. P.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Nanochitin-based composite films as a disposable ethanol sensor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, NL, v. 8, n. 5, p. 104163, 2020. DOI: 10.1016/J.JECE.2020.104163.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, GB, v. 48, n. Suppl. S1, p. 5–16, 2001.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P. T. S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K. P.; EHRLICH, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, London, GB, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008.

ARAGÓN, J.; COSTA, C.; COELHO, I.; MENDOZA, G.; AGUIAR-RICARDO, A.; IRUSTA, S. Electrospun asymmetric membranes for wound dressing applications. **Materials**

Science and Engineering C, Amsterdam, NL, v. 103, n. October 2018, p. 109822, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109822.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13370:2017**: nãotecido - terminologia. Rio de Janeiro, BR, 2017.

BANERJI, A.; JIN, K.; LIU, K.; MAHANTHAPPA, M. K.; ELLISON, C. J. Cross-linked nonwoven fibers by room-temperature cure blowing and in situ photopolymerization. **Macromolecules**, Washington, DC, v. 52, p. 6662–6672, 2019. DOI: 10.1021/acs.macromol.9b01002.

BATOOL, S.; HUSSAIN, Z.; NIAZI, M. B. K.; LIAQAT, U.; AFZAL, M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and evaluation of physical and antimicrobial properties of Ag/PVA/starch nanocomposites hydrogel membranes for wound dressing application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Amsterdam, NL, v. 52, n. April, p. 403–414, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.05.016.

BEHRENS, A. M.; CASEY, B. J.; SIKORSKI, M. J.; WU, Kyle L.; TUTAK, W.; SANDLER, A. D.; KOFINAS, P. In situ deposition of PLGA nanofibers via solution blow spinning. **ACS Macro Letters**, Washington, DC, v. 3, n. 3, p. 249–254, 2014. DOI: 10.1021/mz500049x.

BELTRÁN, F. R.; LORENZO, V.; ACOSTA, J.; DE LA ORDEN, M. U.; MARTÍNEZ URREAGA, J. Effect of simulated mechanical recycling processes on the structure and properties of poly(lactic acid). **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, NL, v. 216, p. 25–31, 2018. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.05.020.

BIAO, L.; TAN, S.; WANG, Y.; GUO, X.; FU, Y.; XU, F.; ZU, Y.; LIU, Z. Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, NL, v. 76, p. 73–80, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.154.

BLANCO, I.; BOTTINO, F. A. Kinetics of degradation and thermal behaviour of branched hepta phenyl POSS/PS nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, London, GB, v. 129, p. 374–379, 2016. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.005.

CACCIOTTI, I.; FORTUNATI, E.; PUGLIA, D.; KENNY, J. M.; NANNI, F. Effect of silver nanoparticles and cellulose nanocrystals on electrospun poly(lactic) acid mats: morphology, thermal properties and mechanical behavior. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 103, n. 1, p. 22–31, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.11.052.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, São Paulo, BR, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000300026.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros**, Sao Carlos SP, BR, v. 11, n. 4, p. 169–173, 2001. DOI: 10.1590/s0104-14282001000400006.

CASASOLA, R.; THOMAS, N. L.; TRYBALA, A.; GEORGIADOU, S. Electrospun poly

lactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. **Polymer**, London, GB, v. 55, n. 18, p. 4728–4737, 2014. DOI: 10.1016/j.polymer.2014.06.032.

CASTRO-AGUIRRE, E.; IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SAMSUDIN, H.; FANG, X.; AURAS, R. Poly(lactic acid)—mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, NL, v. 107, p. 333–366, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.010.

CHAGAS, P. A. M.; SCHNEIDER, R.; DOS SANTOS, D. M.; OTUKA, A. J. G.; MENDONÇA, C. R.; CORREA, D. S. Bilayered electrospun membranes composed of poly(lactic-acid)/natural rubber: a strategy against curcumin photodegradation for wound dressing application. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, NL, v. 163, p. 104889, 2021. DOI: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2021.104889.

CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 5, n. 2, p. 559–564, 2004. DOI: 10.1021/bm034401t.

CHITRATTHA, S.; PHAECHAMUD, T. Porous poly(dl-lactic acid) matrix film with antimicrobial activities for wound dressing application. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, NL, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.083.

CHONG, E. J.; PHAN, T. T.; LIM, I. J.; ZHANG, Y. Z.; BAY, B. H.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, NL, v. 3, n. 3 SPEC. ISS., p. 321–330, 2007. DOI: 10.1016/j.actbio.2007.01.002.

CREMAR, L.; GUTIERREZ, J.; MARTINEZ, J.; MATERON, L. A.; GILKERSON, R.; XU, F.; LOZANO, K. Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. **Nanomedicine Journal**, Mashhad, IR, v. 5, n. 1, p. 6–14, 2018. DOI: 10.22038/nmj.2018.05.002.

DARISTOTLE, J. L.; BEHRENS, A. M.; SANDLER, A. D.; KOFINAS, P. A review of the fundamental principles and applications of solution blow spinning. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v.8, n. 51, p. 34951-34963, 2016. DOI: 10.1021/acsami.6b12994.

DEBABOV, V. G.; BOGUSH, V. G. Recombinant spidroins as the basis for new materials. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, Washington, DC, v. 6, n. 7, p. 3745–3761, 2020. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c00109.

DELEZUK, J. A. D. M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: Influence of processing parameters. **Polymer International**, Oxford, GB, v. 60, n. 6, p. 903–909, 2011. DOI: 10.1002/pi.3037.

DERVISEVIC, M.; ALBA, M.; PRIETO-SIMON, B.; VOELCKER, N. H. Skin in the diagnostics game: wearable biosensor nano- and microsystems for medical diagnostics. **Nano Today**, London, GB, v. 30, p. 100828, 2020. DOI: 10.1016/J.NANTOD.2019.100828.

DINIZ, F. R.; MAIA, R. C. A. P.; RANIER, L.; ANDRADE, L. N.; CHAUD, M. V.; SILVA, C. F.; CORREA, C. B.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; COSTA, L. P.; SHIN, S. R.,

HASSAN, S.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; SOUTO, E. B.; SEVERINO, P. Silver nanoparticles-composing alginate/gelatine hydrogel improves wound healing in vivo. **Nanomaterials**, Basel, CH, v. 10, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/nano10020390.

DOS SANTOS, D. M.; CHAGAS, P. A. M.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; DE ANNUNZIO, S. R.; FONTANA, C. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CORREA, D. S. Core-sheath nanostructured chitosan-based nonwovens as a potential drug delivery system for periodontitis treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 142, p. 521–534, 2020. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.124.

DOS SANTOS, D. M.; CORREA, D. S.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Advances in Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, DC, v. 12, p. 45701, 2020. b. DOI: 10.1021/acscami.0c12410.

DOS SANTOS, D. M.; LEITE, I. S.; BUKZEM, A. L.; DE OLIVEIRA SANTOS, R. P.; FROLLINI, E.; INADA, N. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 186, p. 110–121, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.045.

DU, L.; XU, H.; LI, T.; ZHANG, Y.; ZOU, F. Fabrication of silver nanoparticle/polyvinyl alcohol/polycaprolactone hybrid nanofibers nonwovens by two-nozzle electrospinning for wound dressing. **Fibers and Polymers**, Dordrecht, NL, v. 17, n. 12, 2016. DOI: 10.1007/s12221-016-6813-0.

ECHEVERRÍA, C.; MUÑOZ-BONILLA, A.; CUERVO-RODRÍGUEZ, R.; LÓPEZ, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Antibacterial PLA fibers containing thiazolium groups as wound dressing materials. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, DC, v. 2, p. 4714–4719, 2019. DOI: 10.1021/acscabm.9b00923.

EL-AASSAR, M. R.; IBRAHIM, O. M.; FOUUDA, M. M. G.; EL-BEHERI, N. G.; AGWA, M. M. Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: in-vitro and in-vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 238, p. 116175, 2020. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2020.116175.

ESKANDARINIA, A.; KEFAYAT, A.; RAFIENIA, M.; AGHEB, M.; NAVID, S.; EBRAHIMPOUR, K. Cornstarch-based wound dressing incorporated with hyaluronic acid and propolis: in vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 216, p. 25–35, 2019. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2019.03.091.

FACCHINATTO, W. M.; DOS SANTOS, D. M.; DE LACERDA BUKZEM, A.; MORAES, T. B.; HABITZREUTER, F.; DE AZEVEDO, E. R.; COLNAGO, L. A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Insight into morphological, physicochemical and spectroscopic properties of β -chitin nanocrystalline structures. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 273, p. 118563, 2021. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2021.118563.

FLORES, I.; ETXEBERRIA, A.; IRUSTA, L.; CALAFEL, I.; VEGA, J. F.; MARTÍNEZ-SALAZAR, J.; SARDON, H.; MÜ, A. J. PET-ran-PLA partially degradable random copolymers prepared by organocatalysis: effect of Poly(L-lactic acid) incorporation on

crystallization and morphology. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, DC, v. 7, n. 9, p. 8647–8659, 2019. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00443.

FORTUNATI, E.; PELTZER, M.; ARMENTANO, I.; JIMÉNEZ, A.; KENNY, J. M. Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. **Journal of Food Engineering**, London, GB, v. 118, n. 1, p. 117–124, 2013. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.03.025.

GE, B.; WANG, H.; LI, J.; LIU, H.; YIN, Y.; ZHANG, N.; QIN, S. Comprehensive assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) collagen hydrogels for wound dressings. **Marine Drugs**, Basel, CH, v. 18, n. 4, p. 178, 2020. DOI: 10.3390/MD18040178.

GHOSAL, K.; AGATEMOR, C.; ŠPITÁLSKY, Z.; THOMAS, S.; KNY, E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, NL, v. 358, p. 1262–1278, 2019. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.117.

GOPALAN NAIR, K.; DUFRESNE, A. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 4, n. 3, p. 657–665, 2003. DOI: 10.1021/bm020127b.

GORUP, L. F.; LONGO, E.; LEITE, E. R.; CAMARGO, E. R. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. **Journal of Colloid and Interface Science**, Philadelphia, US, v. 360, n. 2, p. 355–358, 2011. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.04.099.

GUO, L.; DUAN, B.; ZHANG, L. Construction of controllable size silver nanoparticles immobilized on nanofibers of chitin microspheres via green pathway. **Nano Research**, Beijing, CN, v. 9, n. 7, p. 2149–2161, 2016. DOI: 10.1007/s12274-016-1104-z.

GURUNATHAN, S. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Amsterdam, NL, v. 29, p. 217–226, 2015. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.04.005.

HARTMANN, M. H. High Molecular weight polylactic acid polymers. **Biopolymers from Renewable Resources**, London, GB, p. 367–411, 1998. DOI: 10.1007/978-3-662-03680-8_15.

HASAN, A.; WAIBHAW, G.; TIWARI, S.; DHARMALINGAM, K.; SHUKLA, I.; PANDEY, L. M. Fabrication and characterization of chitosan, polyvinylpyrrolidone, and cellulose nanowhiskers nanocomposite films for wound healing drug delivery application. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, US, v. 105, n. 9, p. 2391–2404, 2017. DOI: 10.1002/JBM.A.36097.

HASMANN, A.; WEHRSCHUETZ-SIGL, E.; KANZLER, G.; GEWESSLER, U.; HULLA, E.; SCHNEIDER, K. P.; BINDER, B.; SCHINTLER, M.; GUEBITZ, G. M. Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, Philadelphia, US, v. 71, n. 1, p. 12–23, 2011. DOI: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2010.09.009.

HE, J.; LIANG, Y.; SHI, M.; GUO, B. Anti-oxidant electroactive and antibacterial nanofibrous wound dressings based on poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, NL, v. 385, p. 123464, 2020. DOI: 10.1016/j.cej.2019.123464.

HOMAEIGO HAR, S.; BOCCACCINI, A. R. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, NL, v. 107, n. 2020, p. 25–49, 2020. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.02.022.

HU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, NL, v. 185, n. 1, p. 12–21, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018.

JEONG, Su-Hun; CHOI, Hyosung; KIM, Jin Young; LEE, Tae-Woo. Silver-Based Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance in Organic Optoelectronics. **Particle & Particle Systems Characterization**, Weinheim, DE, v. 32, n. 2, p. 164–175, 2015. DOI: 10.1002/ppsc.201400117.

JUSUF, S.; HUI, J.; DONG, P.-T.; CHENG, J.-X. Staphyloxanthin photolysis potentiates low concentration silver nanoparticles in eradication of methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, DC, v. 124, p. 5330, 2020. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10209.

KALANTARI, K.; MOSTAFAVI, E.; AFIFI, A. M.; IZADIYAN, Z.; JAHANGIRIAN, H.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; WEBSTER, T. J. Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: promises and pitfalls. **Nanoscale**, Cambridge, GB, v. 12, n. 4, p. 2268–2291, 2020. DOI: 10.1039/c9nr08234d.

KAMAL, T.; AHMAD, I.; KHAN, S. B.; ASIRI, A. M. Synthesis and catalytic properties of silver nanoparticles supported on porous cellulose acetate sheets and wet-spun fibers. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 157, p. 294–302, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.078.

KANG, M. J.; KIM, B. S.; HWANG, S.; YOO, H. H. Experimentally derived viscoelastic properties of human skin and muscle in vitro. **Medical Engineering and Physics**, London, GB, v. 61, p. 25–31, 2018. DOI: 10.1016/j.medengphy.2018.08.001.

KENRY; LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. **Progress in Polymer Science**, London, GB, v. 70, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002.

KUMAR, S.; GANDHI, K. S.; KUMAR, R. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, DC, v. 46, n. 10, p. 3128–3136, 2007. DOI: 10.1021/ie060672j.

LAI, S.-M.; HSIEH, Y.-T. Preparation and properties of polylactic acid (PLA)/Silica Nanocomposites. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, New York, US, v. 55, n. 3, p. 211–228, 2016. DOI: 10.1080/00222348.2016.1138179.

LAMBERS, H.; PIESENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, H.; FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International Journal of Cosmetic Science**, Chichester, GB, v. 28, n. 5, p. 359–370, 2006. DOI: 10.1111/J.1467-2494.2006.00344.X.

LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: extraction and characterization. **Bioresource Technology**, Amsterdam, NL, v. 98, n. 13, p. 2465–2472, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.002.

LI, M.; CHEN, J.; SHI, M.; ZHANG, H.; MA, P. X.; GUO, B. Electroactive anti-oxidant polyurethane elastomers with shape memory property as non-adherent wound dressing to enhance wound healing. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, NL, v. 375, p. 121999, 2019. a. DOI: 10.1016/j.cej.2019.121999.

LI, W.; LIU, W.; WEN, W.; LIU, H.; LIU, M.; ZHOU, C.; LUO, B. The liquid crystalline order, rheology and their correlation in chitin whiskers suspensions. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 209, p. 92–100, 2019. b. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.006.

LI, Z.; KNETSCH, M. Antibacterial strategies for wound dressing: preventing infection and stimulating healing. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, AE, v. 24, n. 8, p. 936–951, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666180213141109.

LIANG, D.; LU, Z.; YANG, H.; GAO, J.; CHEN, R. Novel asymmetric wettable AgNPs/Chitosan wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v. 8, n. 6, p. 3958–3968, 2016. DOI: 10.1021/acsami.5b11160.

LIU, C.; SHEN, J.; YEUNG, K. W. K.; TJONG, S. C. Development and antibacterial performance of novel polylactic acid-graphene oxide-silver nanoparticle hybrid nanocomposite mats prepared by electrospinning. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, Washington, DC, v. 3, n. 3, p. 471–486, 2017. a. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00766.

LIU, H.; LIU, W.; LUO, B.; WEN, W.; LIU, M.; WANG, X.; ZHOU, C. Electrospun composite nanofiber membrane of poly(l-lactide) and surface grafted chitin whiskers: Fabrication, mechanical properties and cytocompatibility. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 147, p. 216–225, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.096.

LIU, J.; ZHUO, Y.; DU, S.; LI, Q. Preparation and characterization of PLA/NCC nanofibers. **Integrated Ferroelectrics**, New York, US, v. 179, n. 1, p. 31–37, 2017. b. DOI: 10.1080/10584587.2017.1330088.

LIU, X.; NIELSEN, L. H.; KŁODZIŃSKA, S. N.; NIELSEN, H. M.; QU, H.; CHRISTENSEN, L. P.; RANTANEN, J.; YANG, M. Ciprofloxacin-loaded sodium alginate/poly (lactic-co-glycolic acid) electrospun fibrous mats for wound healing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, NL, v. 123, p. 42–49, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.11.004.

LIU, Y.; LIANG, X.; ZHANG, R.; LAN, W.; QIN, W. Fabrication of electrospun polylactic acid/Cinnamaldehyde/ β -cyclodextrin fibers as an antimicrobial wound dressing. **Polymers**, Basel, CH, 2017. c. DOI: 10.3390/polym9100464.

LOCILENTO, D. A.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; LUNA, G. L. F.; BRASSOLATTI, P.; ANIBAL, F. F.; CORREA, D. S. Biocompatible and biodegradable electrospun nanofibrous membranes loaded with grape seed extract for wound dressing application. **Journal of Nanomaterials**, London, GB, 2019. DOI: 10.1155/2019/2472964.

LUXBACHER, T.; BUKŠEK, H.; PETRINIĆ, I.; PUŠIĆ, T. Zeta potential determination of flat solid surfaces using a SurPASS electrokinetic analyzer. **Tekstil**, Zagreb, HR, v. 58, n. 8, p. 393–400, 2009.

LV, S.; ZHANG, Y.; TAN, H. Thermal and thermo-oxidative degradation kinetics and characteristics of poly (lactic acid) and its composites. **Waste Management**, Oxford, GB, v. 87, p. 335–344, 2019. DOI: 10.1016/j.wasman.2019.02.027.

MA, B.; QIN, A.; LI, X.; ZHAO, X.; HE, C. Structure and properties of chitin whisker reinforced chitosan membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 64, p. 341–346, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.015.

MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. **Materials Today**, Oxford, GB, v. 11, n. 5, p. 26–35, 2008. DOI: 10.1016/S1369-7021(08)70087-7.

MAGIERA, A.; MARKOWSKI, J.; MENASZEK, E.; PILCH, J.; BLAZEWICZ, S. PLA-based hybrid and composite electrospun fibrous scaffolds as potential materials for tissue engineering. **Journal of Nanomaterials**, London, GB, 2017. DOI: 10.1155/2017/9246802.

MARTINI, F.; NATH, J. L.; BARTHOLOMEW, E. F.; OBER, W. C.; OBER, C. E.; WELCH, K.; HUTCHINGS, R. T. **Fundamentals of anatomy & physiology**. Harlow, GB: Harlow : Pearson, 2018.

MASOOD, N.; AHMED, R.; TARIQ, M.; AHMED, Zahoor; MASOUD, Muhammad Shareef; ALI, Imran; ASGHAR, Rehana; ANDLEEB, Anisa; HASAN, Anwarul. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, NL, v. 559, p. 23–36, 2019. DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2019.01.019.

MAZIYA, K.; DLAMINI, B. C.; MALINGA, S P. Hyperbranched polymer nanofibrous membrane grafted with silver nanoparticles for dual antifouling and antibacterial properties against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, NL, v. 148, p. 104494, 2020. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104494.

MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C. Solution blow spinning: a new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, US, v. 113, n. 4, p. 2322–2330, 2009. DOI: 10.1002/app.30275.

MELE, E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, GB, v. 4, n. 28, p. 4801–4812, 2016. DOI: 10.1039/c6tb00804f.

MIGUEL, S. P.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. Chitosan based-asymmetric membranes

for wound healing: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 127, p. 460–475, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072.

MIGUEL, S. P.; RIBEIRO, M. P.; BRANCAL, H.; COUTINHO, P.a; CORREIA, I. J. Thermo-responsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 111, p. 366–373, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.093.

MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; ALIAHMADI, A.; ESMAEILI, M. A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 162, n. 5, p. 542–549, 2011. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.04.009.

MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M.; GOMEZ D'AYALA, G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: a review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 233, n. November 2019, p. 115839, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115839.

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**, Amsterdam, NL, v. 490, p. 139–151, 2015. DOI: 10.1016/j.memsci.2015.04.064.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, GB, 2005. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059.

NARAYANAN, G.; VERNEKAR, V. N.; KUYINU, E. L.; LAURENCIN, C. T. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, NL, v. 107, p. 247–276, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.015.

NCCLS. **M2-A8**: padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. Wayne, US, 2003.

NCCLS. **M7-A6**: metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada. Wayne, US, 2003.

NEGM, N. A.; TAWFIK, S. M.; ABD-ELAAL, A. A. Synthesis, characterization and biological activity of colloidal silver nanoparticles stabilized by gemini anionic surfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Amsterdam, NL, v. 21, p. 1051–1057, 2015. DOI: 10.1016/j.jiec.2014.05.015.

NGO, V. K. T.; NGUYEN, D. G.; HUYNH, T. P.; LAM, Q. V. A low cost technique for synthesis of gold nanoparticles using microwave heating and its application in signal amplification for detecting *Escherichia coli* O157:H7 bacteria. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, Bristol, GB, v. 7, n. 3, 2016. DOI: 10.1088/2043-6262/7/3/035016.

OGUERI, K. S.; LAURENCIN, C. T. Nanofiber technology for regenerative engineering. **ACS Nano**, Washington, DC, v. 14, n. 8, p. 9347–9363, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c03981.

OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; ORTS, W. J.; MEDEIROS, E. S. Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: a comparative study. **Advances in Materials Science and Engineering**, London, GB, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/409572.

OLIVEIRA, S. M.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. Cell interactions with superhydrophilic and superhydrophobic surfaces. **Journal of Adhesion Science and Technology**, Abingdon, GB, v. 28, n. 8–9, p. 843–863, 2014. DOI: 10.1080/01694243.2012.697776.

OU, X.; YANG, X.; ZHENG, J.; LIU, M. Free-standing graphene oxide-chitin nanocrystal composite membrane for dye adsorption and oil/water separation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, DC, v. 7, n. 15, p. 13379–13390, 2019. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b02619.

OU, X.; ZHENG, J.; ZHAO, X.; LIU, M. Chemically cross-linked chitin nanocrystal scaffolds for drug delivery. **ACS Applied Nano Materials**, Washington, DC, v. 1, n. 12, p. 6790–6799, 2018. DOI: 10.1021/acsnm.8b01585.

OUN, A. A.; RHIM, J. W. Preparation of multifunctional chitin nanowhiskers/ZnO-Ag NPs and their effect on the properties of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite film. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 169, p. 467–479, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.042.

PAN, Q.; SHIM, E.; POURDEYHIMI, B.; GAO, W. Nylon-graphene composite nonwovens as monolithic conductive or capacitive fabrics. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v. 9, n. 9, p. 8308–8316, 2017. DOI: 10.1021/acsami.7b00471.

PAPADOPOULOU, E. L.; PAUL, U. C.; TRAN, T. N.; SUARATO, G.; CESERACCIU, L.; MARRAS, S.; D'ARCY, R.; ATHANASSIOU, A. Sustainable active food packaging from poly(lactic acid) and Cocoa Bean Shells. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v. 11, n. 34, p. 31317–31327, 2019. DOI: 10.1021/acsami.9b09755.

PATNAIK, A.; RENGASAMY, R. S.; KOTHARI, V. K.; GHOSH, A. Wetting and wicking in fibrous materials. **Textile Progress**, Abingdon, GB, v. 38:1, p. 1–105, 2010. DOI: 10.1533/jotp.2006.38.1.1.

PETRINIĆ, I.; BUKŠEK, H.; LUXBACHER, T.; PUŠIĆ, T.; BISCHOF, S. Influence of the structure of polymer fiber composites on the analysis of the zeta potential. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, US, v. 135, n. 21, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1002/app.46227.

PETTY, A. J.; KEATE, R. L.; JIANG, B.; AMEER, G. A.; RIVNAY, J. Conducting polymers for tissue regeneration in vivo. **Chemistry of Materials**, Washington, DC, v. 32, n. 10, p. 4095–4115, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemmater.0c00767.

POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **CrystrEngComm**, Cambridge, GB, v. 17, p. 6809–6830, 2015. DOI: 10.1039/c5ce01014d.

QI, Y.; MA, H. L.; DU, Z. H.; YANG, B.; WU, J.; WANG, R.; ZHANG, X. Q. Hydrophilic and antibacterial modification of poly(lactic acid) films by γ -ray irradiation. **ACS Omega**, Washington, DC, v. 4, n. 25, p. 21439–21445, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.9b03132.

QU, J.; ZHAO, X.; LIANG, Y.; ZHANG, T.; MA, P. X.; GUO, B. Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. **Biomaterials**, Amsterdam, NL, v. 183, p. 185–199, 2018. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.044.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, New York, US, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.

RAMALINGAM, R.; DHAND, C.; LEUNG, C. M.; ONG, S. T.; ANNAMALAI, S. K.; KAMRUDDIN, M.; VERMA, N. K.; RAMAKRISHNA, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; ARUNACHALAM, K. D. Antimicrobial properties and biocompatibility of electrospun poly- ϵ -caprolactone fibrous mats containing *Gymnema sylvestre* leaf extract. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, NL, v. 98, p. 503–514, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2018.12.135.

RAMOS, M.; FORTUNATI, E.; PELTZER, M.; JIMENEZ, A.; KENNY, J. M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and disintegrability under composting conditions of PLA-based nanocomposite films with thymol and silver nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, London, GB, v. 132, p. 2–10, 2016. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.015.

REPANAS, A.; ANDRIOPOULOU, S.; GLASMACHER, B. The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Amsterdam, NL, v. 31, p. 137–146, 2016. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.12.007.

REZAEI, B.; ASKARI, M.; SHOUSHARI, A. M.; MALEK, R. A. M. The effect of diameter on the thermal properties of the modeled shape-stabilized phase change nanofibers (PCNs). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, HU, v. 118, n. 3, p. 1619–1629, 2014. DOI: 10.1007/s10973-014-4025-7.

RODRÍGUEZ-TOBÍAS, H.; MORALES, G.; GRANDE, D. Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, NL, v. 101, n. March, p. 306–322, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.03.099.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, NL, v. 107, p. 47–59, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.014.

SANTORO, M.; SHAH, S. R.; WALKER, J. L.; MIKOS, A. G. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, NL, v. 107, p. 206–212, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.019.

SATHIYASEELAN, A.; SHAJAHAN, A.; KALAICHELVAN, P. T.; KAVIYARASAN, V. Fungal chitosan based nanocomposites sponges—an alternative medicine for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 104, p. 1905–1915, 2017. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.03.188.

SATOH, M.; KATO, H.; TAKAYAMA-ITO, M.; OGAWA, M.; ANDO, S.; SAIJO, M. In vitro evaluation of minimum inhibitory concentration of several antibacterial agents against *Rickettsia japonica* using a plaque reduction assay system. **Journal of Infection and**

Chemotherapy, Tokyo, JP, v. 25, n. 11, p. 917–919, 2019. DOI: 10.1016/j.jiac.2019.05.019.

SCHNEIDER, L. A.; KORBER, A.; GRABBE, S.; DISSEMOND, J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? **Archives of Dermatological Research**, Heidelberg, DE, v. 298, n. 9, p. 413–420, 2006. DOI: 10.1007/S00403-006-0713-X.

SCHNEIDER, R.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; BRANDÃO, H. M.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: antibacterial activity and effect of pH on the release profile. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, NL, v. 132, p. 26–35, 2018. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.09.001.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; KARRER, S.; HEINLIN, J.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Chichester, GB, v. 24, n. 4, p. 373–378, 2010. DOI: 10.1111/J.1468-3083.2009.03413.X.

SHAMSHINA, J. L.; ZAVGORODNYA, O.; BERTON, P.; CHHOTARAY, P. K.; CHOUDHARY, H.; ROGERS, R. D. Ionic liquid platform for spinning composite chitin-poly(lactic acid) fibers. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Washington, DC, v. 6, n. 8, p. 10241–10251, 2018. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b01554.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, NL, v. 145, p. 83–96, 2009. DOI: 10.1016/j.cis.2008.09.002.

SIMÕES, D.; MIGUEL, S. P.; RIBEIRO, M. P.; COUTINHO, P.; MENDONÇA, A. G.; CORREIA, I. J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, NL, v. 127, 2017, p. 130–141, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022.

SMIECHOWICZ, E.; KULPINSKI, P.; NIEKRASZEWICZ, B.; BACCIARELLI, A. Cellulose fibers modified with silver nanoparticles. **Cellulose**, Dordrecht, NL, v. 18, n. 4, p. 975–985, 2011. DOI: 10.1007/s10570-011-9544-9.

SOARES DE AZERÊDO, M.; MARCONCINI, J. M. Effect of solution concentration in microfiltration properties of PLA mats produced by solution blow spinning. **Polymer Engineering and Science**, Hoboken, US, v. 61, n. 3, p. 856–863, 2021. DOI: 10.1002/pen.25634.

SOLOMON, S.; BAHADORI, M.; JEYARAJASINGAM, A. V; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C.; MULFINGER, L. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, Washington, DC, 2007.

SONG, S.; ZHAO, Y.; YUAN, X.; ZHANG, J. β -Chitin nanofiber hydrogel as a scaffold to in situ fabricate monodispersed ultra-small silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, NL, v. 574, n. February, p. 36–43, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.04.047.

SOUTO, E. B.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, M. I.; TEIXEIRA, M. C.; SHIMOJO A. A. M.; SORIANO, J. L.; NAVEROS, B. C.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, S. B.; SANTINI, A. New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, CH, v. 21, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020393.

SOUZA, M. A.; SAKAMOTO, K. Y.; MATTOSO, L. H. C. Release of the diclofenac sodium by nanofibers of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) obtained from electrospinning and solution blow spinning. **Journal of Nanomaterials**, London, GB, 2014. DOI: 10.1155/2014/129035.

SRIUPAYO, J.; SUPAPHOL, P.; BLACKWELL, J.; RUJIRAVANIT, R. Preparation and characterization of α -chitin whisker-reinforced poly(vinyl alcohol) nanocomposite films with or without heat treatment. **Polymer**, London, GB, v. 46, n. 15, p. 5637–5644, 2005. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.04.069.

SUENAGA, S.; NIKAIDO, N.; TOTANI, K.; KAWASAKI, K.; ITO, Y.; YAMASHITA, K.; OSADA, M. Effect of purification method of β -chitin from squid pen on the properties of β -chitin nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, NL, v. 91, p. 987–993, 2016. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.06.060.

TALLIAN, C.; TEGE, G.; QUADLBAUER, L.; VIENASCHER, R.; WEINBERGER, S.; CREMERS, R.; PELLIS, A.; SALARI, J. W. O.; GUEBITZ, G. M. Lysozyme-responsive spray-dried chitosan particles for early detection of wound infection. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, DC, v. 2, n. 3, p. 1331–1339, 2019. DOI: 10.1021/ACSABM.9B00023.

TAMPAU, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Polyvinyl alcohol-based materials encapsulating carvacrol obtained by solvent casting and electrospinning. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, NL, v. 153, p. 104603, 2020. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104603.

TRA THANH, N.; HO HIEU, M.; TRAN MINH PHUONG, N.; DO BUI THUAN, T.; NGUYEN THI THU, H.; THAI, V. P.; DO MINH, T.; NGUYEN DAI, H.; VO, V. T.; NGUYEN THI, H. Optimization and characterization of electrospun polycaprolactone coated with gelatin-silver nanoparticles for wound healing application. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, NL, v. 91, p. 318–329, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.05.039.

ULLAH, A.; ULLAH, S.; KHAN, M. Q.; HASHMI, M.; NAM, P. D.; KATO, Y.; TAMADA, Y.; KIM, I. S. Manuka honey incorporated cellulose acetate nanofibrous mats: fabrication and in vitro evaluation as a potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 155, p. 479–489, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.237.

VAN DONG, P.; HA, C. H.; BINH, L. T.; KASBOHM, J. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**, Basel, CH, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1186/2228-5326-2-9.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, Oxford, GB, v. 35, n. 9, p. 489–494, 2017. DOI: 10.1016/j.mpsur.2017.06.005.

WANG, H.; REHMAN, K.; FENG, W.; YANG, D.; REHMAN, R.; CAI, M.; ZHANG, J.; YU, Z.; ZHENG, L. Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, NL, v. 149, p. 901–907, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.293.

WANG, Y.; CHANG, Y.; YU, L.; ZHANG, C.; XU, X.; XUE, Y.; LI, Z.; XUE, C. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 92, n. 1, p. 90–97, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.084.

WENZEL, R. N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. **Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, DC, v. 28, n. 8, 1936.

WOJASIŃSKI, M.; PILAREK, M.; CIACH, T. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-Lactic Acid) materials for biomedical engineering. **Polish Journal of Chemical Technology**, Warsaw, PL, v. 16, n. 2, p. 43–50, 2014. DOI: 10.2478/pjct-2014-0028.

WU, C.; CHEN, T.; XIN, Y.; ZHANG, Z.; REN, Z.; LEI, J.; CHU, B.; WANG, Y.; TANG, S. Nanofibrous asymmetric membranes self-organized from chemically heterogeneous electrospun mats for skin tissue engineering. **Biomedical Materials**, Bristol, GB, v. 11, n. 3, p. 035019, 2016. DOI: 10.1088/1748-6041/11/3/035019.

WU, C.; ZHANG, Z.; ZHOU, K.; CHEN, W.; TAO, J.; LI, C.; XIN, H.; SONG, Y.; AI, F. Preparation and characterization of borosilicate-bioglass-incorporated sodium alginate composite wound dressing for accelerated full-thickness skin wound healing. **Biomedical Materials**, Bristol, GB, v. 15, n. 5, p. 055009, 2020. DOI: 10.1088/1748-605X/AB9421.

XU, C.; AKAKURU, O. U.; MA, X.; ZHENG, J.; ZHENG, J.; WU, A. Nanoparticle-based wound dressing: recent progress in the detection and therapy of bacterial infections. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 7, p. 1708–1723, 2020. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00297.

YAO, Q.; COSME, J. G. L.; XU, T.; MISZUK, J. M.; PICCIANI, P. H. S.; FONG, H.; SUN, H. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. **Biomaterials**, Amsterdam, NL, v. 115, p. 115–127, 2017. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.018.

YU, P.; HE, H.; LUO, Y.; JIA, D.; DUFRESNE, A. Elastomer reinforced with regenerated chitin from alkaline/urea aqueous system. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v. 9, n. 31, p. 26460–26467, 2017. DOI: 10.1021/acsami.7b08294.

ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: an overview. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012. DOI: 10.1021/bm201564a.

ZHANG, C.; ZHUANG, X.; LI, X.; WANG, W.; CHENG, B.; KANG, W.; CAI, Z.; LI, M. Chitin nanowhisiker-supported sulfonated poly(ether sulfone) proton exchange for fuel cell applications. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, GB, v. 140, p. 195–201, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.12.029.

ZHANG, X.; SUN, H.; TAN, S.; GAO, J.; FU, Y.; LIU, Z. Hydrothermal synthesis of Ag nanoparticles on the nanocellulose and their antibacterial study. **Inorganic Chemistry Communications**, Amsterdam, NL, v. 100, p. 44–50, 2019. DOI: 10.1016/j.inoche.2018.12.012.

ZHENG, K.; SETYAWATI, M. I.; LEONG, D. T.; XIE, J. Antimicrobial silver nanomaterials. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, NL, 2018. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.11.019.

ZHOU, Z.; LIN, W.; WU, X. F. Electrospinning ultrathin continuous cellulose acetate fibers for high-flux water filtration. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, NL, v. 494, p. 21–29, 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.11.074.

ZOU, F.; SUN, X.; WANG, X. Elastic, hydrophilic and biodegradable poly (1, 8-octanediol-co-citric acid)/polylactic acid nanofibrous membranes for potential wound dressing applications. **Polymer Degradation and Stability**, London, GB, v. 166, p. 163–173, 2019. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.05.024.