UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DAYANE DOTTO DE MORAES

Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Gelatina/Quitosana com Nanopartículas de Prata

São Carlos
2019

DAYANE DOTTO DE MORAES

Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Gelatina/Quitosana com Nanopartículas de Prata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof.ª Dr.ª Eliana Cristina da Silva Rigo

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2019

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP

M827d

Moraes, Dayane Dotto de
Desenvolvimento e caracterização de membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata / Dayane Dotto de Moraes ; orientadora Eliana Cristina da Silva Rigo. -- São Carlos, 2019.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Membrana. 2. Gelatina. 3. Quitosana. 4. Nanopartículas de prata. I. Titulo.

Elaborado por Elena Luzia Palloni – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Dayane Dotto de Moraes

Título: " Desenvolvimento e caracterização de membrana de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata"

Data da defesa: 29/04/2019

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Eliana Cristina da Silva Rigo EESC/USP	EC Rigo	Não Votante
Prof(a). Dr(a). Ana Maria de Guzzi Plepis IQSC/USP	Ana Maria G Plepis	aprovada
Prof(a). Dr(a). Rodrigo Fernando Costa Marques UNESP		Aprovado
Prof(a). Dr(a). Rafael Salomão EESC/USP		APROVADA

DEDICATÓRIA

A minha família e amigos pelo carinho, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o apoio e amor. Em especial, agradeço a minha mãe pela devoção à nossa família, pela amizade valiosa, pelo companheirismo, por sempre me apoiar e tentar me mostrar o lado positivo ou a solução para cada dificuldade no meu caminho e, me ensinar a fazer tudo com amor e dedicação.

Agradeço aos meus irmãos, pela amizade, os conselhos e toda ajuda!

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Eliana Rigo pela oportunidade e confiança em mim depositada, me acolhendo em um momento importante do início da minha carreira.

Agradeço também aos membros do laboratório pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Especialmente a Luci, Andrés, Marcio, Mariza e Silvana, pelo auxilio profissional e tempo disponibilizados, os quais foram de suma importância no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos, pela amizade e companheirismo.

A CAPES e ao CNPq a bolsa concedida, a Universidade de São Paulo, a Escola de Engenharia de São Carlos, ao Instituto de Química de São Carlos e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

"As grandes conquistas da humanidade foram obtidas conversando, e as grandes falhas pela falta de diálogo"

Stephen Hawking

RESUMO

MORAES, D.D. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de gelatina/ quitosana com nanopartículas de prata**. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, 2019, da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O uso de compostos naturais em produtos que visam o tratamento de feridas, tem sido utilizado ao longo dos séculos. O processo de cicatrização apesar de ser complexo, muitas vezes falha devido alguma enfermidade ou a ineficácia dos fármacos, gerando complicações no organismo, como por exemplo, as infecções causadas pela proliferação de bactérias. Utilizando biomateriais, é possível desenvolver um produto com potencial cicatrizante e antibacteriano, focando na biocompatibilidade da quitosana e da gelatina, como também da ação antimicrobiana das nanopartículas de prata. O presente projeto consiste no desenvolvimento, análise e caracterização de uma membrana de gelatina e quitosana com nanopartículas de prata, para ser aplicada como coberturas para feridas de difícil cicatrização. Para avaliar as características das membranas, foram realizados ensaios físico-químicos e morfológicos, tais como, difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho (IV-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e ensaios *in vitro* de citotoxicidade e bacteriano. Os resultados indicaram a presença das nanopartículas de prata no interior da matriz polimérica. Como também, foi verificado, uma alta taxa de intumescimento das membranas com altas concentração de nanopartículas, fazendo com que estas, absorvessem mais solução no ambiente em que estavam. Nos ensaios *in vitro,* foi possível verificar a biocompatibilidade das membranas de baixa concentração de nanopartículas (10 mM, 5 mM e com 2 mM). Apenas as amostras que continham altas concentrações molares de nanopartículas de prata (30 mM, 20 mM e 10 mM), apresentaram efeitos antibacterianos.

Palavras chaves: Membrana. Gelatina. Quitosana. Nanopartículas de prata.

ABSTRACT

MORAES, D.D. **Development and characterization of a gelatin/chitosan membrane with silver nanoparticles.** 2019. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, 2019, da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The application of natural compounds in products aimed at the treatment of wounds have been used over the centuries. The healing process, despite being complex, often fails due to some disease or drug ineffectiveness, causing complications in the body, such as infections caused by bacterial proliferation. Using biomaterials, it is possible to develop a product with healing and antibacterial potential, in this context, studies have proved the biocompatibility of chitosan and gelatin, as well as the antimicrobial action of silver nanoparticles. The present project consisted of the development, analysis and characterization of gelatin and chitosan membranes with silver nanoparticles, in order to be applied as dressing in wounds that are difficult to heal. To evaluate the characteristics of the membranes, physical-chemical and morphological tests, such as X-ray diffraction, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, *in vitro* cytotoxicity and bacterial assays. The results indicated the presence of silver nanoparticles inside the polymer matrix. The hydration ability of the membranes presented a high swelling rate of membranes with high concentration of nanoparticles, causing them to absorb more solution in the environment in which they were. In the *in vitro* assays, it was possible to verify the biocompatibility of membranes of low concentration of nanoparticles (10 mM, 5 mM and with 2 mM). Only samples containing high molar concentrations of silver nanoparticles (30 mM, 20 mM and 10 mM) presented antibacterial effects.

Keywords: Membrane. Gelatine. Chitosan. Silver nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração tridimensional da pele e do tecido subcutâneo (hipoderme).....19

Figura 2 – Imagem ilustrativa do processo de cicatrização.....22

Figura 3 – Imagem ilustrativa da conversão do colágeno para gelatina.....27

Figura 4 – Imagem da estrutura molecular da quitina e da quitosana.....29

Figura 5 – Fluxograma da metodologia.....35

Figura 6 – Ilustração do procedimento adotado para o ensaio bacteriológico.....44

Figura 7 – Imagem fotográficas da solução precursora das NPsAg (a) em a solução após a síntese (b). Nessa imagem é observado a mudança de coloração após a síntese de NPsAg.....47

Figura 8 – A absorbância em função do comprimento de onda, para as 3 sínteses. Na 8b, absorbância nos diferentes tempos.....48

Figura 9–Imagens da análise realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão..50

Figura 10 – Imagens fotográficas das membranas dispostas na seguinte ordem: 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM e GQ.....51

Figura 11– As fotomicrografias das membranas GQ de 30 mM. Aumento de 1000x.....54

Figura 12 – Micrografia por MEV com EDS das membranas com NPsAg de 30 mM, de 10 mM de NPsAg, de5 mM de NPsAg, e com 2 mM de NPsAg.....56

Figura 13 – Resultados obtidos por meio Difração de Raios X das membranas com 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM e 2 mM de NPsAg e da membrana GQ.....58

Figura 14 – Espectros obtidos por Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR) da gelatina e da quitosana.....60

Figura 15 – Espectros obtidos por Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada das membranas com NPsAg e somente GQ.....61

Figura 16 – Ensaio de intumescimento das membranas GQ 30 mM de NPsAg (30 mM), GQ com 10 mM de NPsAg (10 mM), GQ com 5 mM de NPsAg (5 mM) e GQ com 2 mM de NPsAg (2 mM).....63

Figura 17 – Ensaio de citotoxidade das membranas com NPsAg, a membranas controle GQ, os controles positivos (CP) (fenol 0,2%) e o controle negativo (CN) (alumina).....67

Figura 18 – Ensaio antibacteriano das membranas sobre as bactérias *S. aureus*.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Espessura das membranas, medidas por micrometro. Considerando que cada valor das espessuras são as médias de suas triplicatas.....52

Tabela 2 – Análise quantitativa das membranas em relação a distribuição de prata, por meio da análise dos espectros de MEV-EDS demonstrados no anexo.....55

Tabela 3 – Valores do ensaio de Permeabilidade ao vapor de água das membranas.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

u.a. – Unidade arbitrária

ASTM – American Society for Testing and Materials

ATCC – American Type Culture Collection

CHO – Célula de Ovário de Hamster Chinês

CN – Controle Negativo

CP – Controle Positivo

DRX – Difração de Raios X

EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva

GQ – Gelatina/quitosana

GQAg – Gelatina/quitosana com nanopartículas de prata

I – Intumescimento

IC50 – Índice de Citotoxicidade

ISO – Organização Internacional de Padronização

IV-ATR – Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada

MET – Microscopia eletrônica de Transmissão

MEV– Microscopia eletrônica de Varredura

mM – Milimolar (10^{-3})

Ms – Massa seca

Mu – Massa úmida

NPsAg– Nanopartículas de prata

PBS – Tampão Fosfato Salino

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

MM – Massa molar

PVA – Álcool Polivinilíco

PVA– Permeação ao vapor de água

PVP – Polivinilpirrolidona

ROS – Substância Reativa ao Oxigênio

SFB – Soro Fetal Bovino

TNF-α – Fator de Necrose alfa

TSB – Tryptic Soy Broth

UV-vis – Espectrometria de luz Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**

2.1 Pele 18

2.2 Feridas 20

2.3 Cicatrização 21

2.4 Biomateriais e tratamento de feridas cutâneas 24

2.5 Gelatina 27

2.6 Quitosana 28

2.7 Nanopartículas de prata 31

3 OBJETIVOS **34**

3.1 Objetivo geral 34

3.2 Objetivos específicos 34

4 MATERIAIS E MÉTODO **35**

4.1 Materiais 35

4.2 Fluxograma da metodologia 35

4.3 Síntese das nanopartículas de prata 35

4.4 Caracterização das nanopartículas de prata 36

4.4.1. Caracterização por espectroscopia no UV-vis 36

4.4.2 Tempo de prateleira das NPsAg 36

4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 37

4.5 Membranas de gelatina/quitosana (GQ) 37

4.6 Membranas de gelatina/quitosana com NPsAg (GQAg) 37

4.7 Caracterizações físico-químicas das membranas 38

4.7.1 Difração de raios X (DRX) 38

4.7.2 Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR) 39

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 39

4.7.4 Ensaio de intumescimento 40

4.7.5 Medida de permeação ao vapor de água (PVA) 41

4.8 Caracterizações in vitro 42

4.8.1 Ensaio de citotoxicidade (IC50) 42

4.8.2 Ensaio microbiológico 43

4.9 Análise Estatística 44

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

5.1 Síntese das nanopartículas de prata (NPsAg) 45

5.2 Membranas de gelatina/quitosana com NPsAg 51

5.3 Caracterização das membranas 53

5.3.1 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia por energia dispersiva (EDS) 53

5.3.2 Caracterização por difração de raios X (DRX) e espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR) 57

5.3.2.1 Caracterização por difração de raios X (DRX) 57

5.3.2.2 Caracterização por espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV – ATR) 59

5.4 Ensaios de intumescimento e permeação ao vapor de água 62

5.4.1 Ensaio de intumescimento 62

5.4.2 Permeação a vapor de água (PVA) 64

5.5 Ensaios in vitro: citotoxicidade (IC50) e microbiológico 66

5.5.1 Ensaio de citotoxicidade (IC50) 66

5.5.2 Ensaio microbiológico 69

6 CONCLUSÕES 74

REFERÊNCIAS 75

Apêndice 1 87

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do nosso corpo e tem como principais funções, recobrir e garantir a proteção entre o ambiente interno e o externo, atuando na defesa e colaborando com outros órgãos para o bom funcionamento do organismo, mediante o controle da temperatura, da homeostasia de fluidos e da capacidade sensorial (MARIEB; HOEHN, 2009).

Contudo, essas funções podem ser interrompidas quando ocorrer dano ou perda da sua integridade em decorrência de algum tipo de ferimento. A ferida é quando ocorre a descontinuidade do tecido corpóreo causada por algum tipo de trauma físico, químico, mecânico ou decorrente de uma doença. A classificação das feridas em agudas e crônicas é de acordo com o tempo de reparação tecidual. As feridas agudas são decorrentes de traumas ou de processos cirúrgicos e a reparação em período apropriado, sem intercorrências. Feridas crônicas, normalmente estão associadas a doenças pré-existentes, como diabetes e insuficiência venosa, prolongando o tempo de reparação, o qual não ocorre no período adequado, levando a ocorrência de complicações (FERREIRA et al., 2006; TSURUTA et al., 2002). Para o tratamento das feridas, além da limpeza, muitas vezes é necessário a oclusão com coberturas. O tipo de cobertura que pode ser utilizado dependerá da função solicitada, sendo: proteção, absorção de umidade, exsudato e odores, prevenção de contaminação exógena, compressão para minimizar acúmulo de fluidos, além de imobilização contra traumas mecânicos (RAJITHA et al., 2016; SMANIOTTO; GALLI, 2012).

A necessidade de coberturas visando auxiliar o processo de reparação tecidual, principalmente para pessoas com enfermidades metabólicas, vasculares, arteriais e imunodepressoras é uma busca constante no desenvolvimento de biomateriais. Um biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em humanos ou medicina veterinária (WILLIAMS, 1987).

Os Biomateriais poliméricos de origem natural como a gelatina e quitosana são candidatos poderosos para o desenvolvimento dessas coberturas, pois são materiais amplamente utilizados em diversas formas como: géis, filmes, membranas, esponjas, esferas e hidrogéis (CANDIDO, 2001; DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016). A gelatina é uma proteína animal, derivada da hidrólise parcial do colágeno, é uma proteína solúvel, apresenta excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, plasticidade, boa aderência e estimula

crescimento celular (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; LAGUNAS et al., 2012). Enquanto a quitosana, é obtida da desacetilação da quitina e apresenta propriedades de grande potencial farmacológico, como ação bactericida, auxiliar na cicatrização de feridas e queimaduras, é biodegradável e biocompatível. Porém, os filmes ou membranas de quitosana, geralmente apresentam fragilidade, dessa forma, a mistura da quitosana com gelatina pode apresentar propriedades interessantes para aplicação como coberturas (NAGAHAMA et al., 2009).

O processo de cicatrização das feridas, pode ser prejudicado quando ocorre contaminação exógena por bactérias patogênicas como a *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomona aeruginosa*, assim sendo, uma cobertura que possa conter ou eliminar a proliferação desses microrganismos é importante. As nanopartículas de prata (NPsAg) têm sido empregadas com grande eficácia em várias áreas das ciências biológicas, biomédicas e farmacêuticas, devido a sua eficácia como agente bactericida (ZIVIC et al., 2018). Para sintetizar as nanopartículas, existem duas rotas possíveis, a rota química e rota biológica/verde. A diferença entre elas está no agente redutor, que converte os íons metálicos em nanopartículas, onde na rota química é utilizado comumente o boro hidreto de sódio, enquanto a rota verde, utiliza compostos naturais, tais como bactérias, fungos, plantas, algas, carboidratos, polímeros entre outros (PARK, 2014), além disso a rota verde possui algumas vantagens como: metodologia simples, eficiente, não gera poluentes e resulta em nanopartículas biocompatíveis (SINGH et al., 2016).

Dessa forma o presente trabalho visou a obtenção e a caracterização de membranas de gelatina com quitosana incorporadas com nanopartículas de prata (GQAg), obtidas por uma rota verde, para possível aplicação como cobertura em feridas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

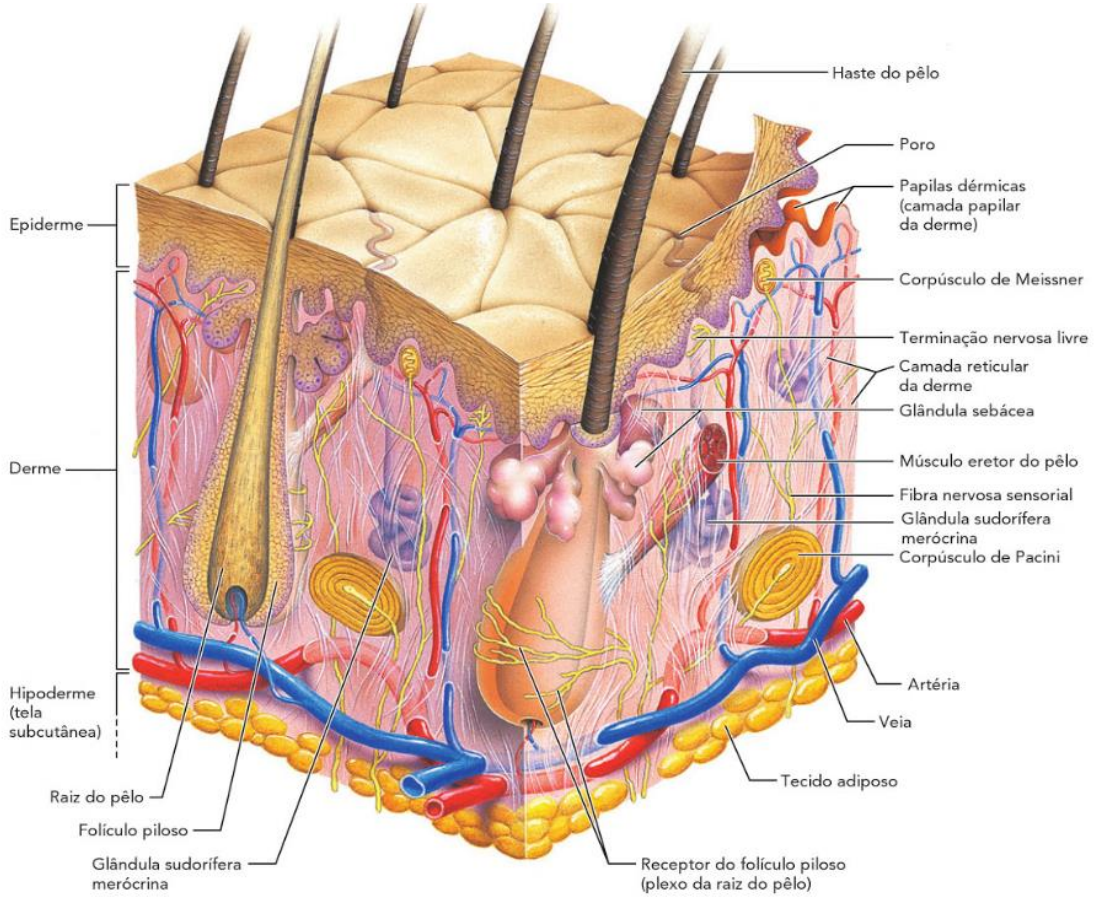
2.1 Pele

O maior órgão do corpo é a pele, a qual possui diversas funções, como barreira contra agentes externos, físicos e químicos, contra microrganismos patogênicos, além de ser responsável pelo controle da temperatura do corpo e pela eliminação de impurezas (BOROJEVIC; SERRICELLA, 1999).

A pele é formada por duas porções: a epiderme e a derme. A epiderme é constituída por células epiteliais, sendo a primeira uma barreira do meio externo do corpo, em seguida pela derme, a qual consiste em uma camada resistente, formada por tecido conjuntivo fibroso, além de apresentar vascularização. Dessa forma, a epiderme e a derme são unidas por vasos sanguíneos que partem da derme, distribuindo os nutrientes por difusão para a camada mais externa. A última camada estrutural da pele, o tecido subcutâneo (hipoderme), representado pela Figura 1, compõe-se predominantemente de tecido adiposo. Dessa maneira, ela armazena gordura, além de conectar a pele com as estruturas próximas, como os músculos (MARIEB; HOEHN, 2009).

A primeira camada estrutural da pele é a epiderme, a qual é renovada a cada 25 a 45 dias, devido à descamação resultante das mortes celulares. A epiderme é composta de quatro tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Merkel e as células de Langerhnas. Os queratinócitos são sintetizados do estrato basal, nas camadas mais profundas da epiderme e são responsáveis pela produção de queratina, cuja função é de proteção da pele. Estão localizadas nessa mesma região os melanócitos, os quais produzem o pigmento melanina que, quando acumulada, forma pequenos grânulos chamados de melanossomos. Esses grânulos são concentrados na superfície nuclear dos queratinócitos, que irá proteger o núcleo das células da radiação ultravioleta (MARIEB; HOEHN, 2009).

Figura 1 –Ilustração tridimensional da pele e do tecido subcutâneo (hipoderme)



Fonte: Marieb e Hoehn (2009)

Logo após algum agente estranho penetrar na pele, será fagocitado pelas células de Langerhnas, as quais são dendríticas localizadas na camada basal da epiderme. Essas células representam a barreira hematopoiética do corpo em relação ao mundo externo, dessa forma, fagocitam substâncias estranhas, migram para as áreas inflamadas e ativam o sistema imunológico (MARIEB; HOEHN, 2009). Entre a epiderme e a derme estão localizadas as células de Merkel, as únicas células desse conjunto que estão ligadas a uma terminação nervosa e, portanto, são responsáveis pela resposta sensorial do tato (MARIEB; HOEHN, 2009).

A segunda camada estrutural da pele, a derme, localizada abaixo da epiderme, a qual é composta por anexos como as fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríferas. A derme é formada por células típicas do tecido conjuntivo, como os macrófagos, os mastócitos, os leucócitos e os fibroblastos, sendo este importante na recuperação tecidual durante uma lesão cutânea, que migra para o local levando à renovação

celular (HOWLING et al., 2001; MARIEB; HOEHN, 2009). Assim como, a derme apresenta uma matriz semifluida e carregada de fibras, além de ser dividida em duas camadas: derme papilar e derme reticular (MARIEB; HOEHN, 2009).

Em relação à derme papilar, ela encontra-se no limite da derme com a epiderme e apresenta várias projeções que alcançam a epiderme, chamadas de papilas. Assim, essas papilas contêm projeções de terminações nervosas dos vasos sanguíneos e receptores sensoriais, que são direcionadas para que fiquem mais próximas da epiderme e da superfície cutânea. Essa camada da derme proporciona a fricção para segurar objetos através dos cristais e padrões formados nas palmas das mãos, pontas dos dedos (impressões digitais) e as plantas dos pés (APPLEGATE, 1994).

A segunda divisão, localizada no limite com a hipoderme, a derme reticular, consiste em uma matriz extracelular com feixes de fibras colágenas entrelaçadas, disposta paralelamente à superfície da pele. Essas fibras são responsáveis pela força e resistência da pele, evitando que pequenas lesões, como arranhões, atinjam camadas mais profundas. O colágeno auxilia a hidratação da pele, pela atração que possui com a água, e as fibras de elastina proporcionam a retração elástica da pele (MARIEB; HOEHN, 2009).

Portanto, a pele, em conjunto com seus anexos, é responsável por diversas funções que auxiliam o metabolismo corporal, evitando alterações da homeostase. Entretanto, por ficar exposta à superfície, ela é o tecido do corpo mais vulnerável, justamente por estar exposta aos estímulos ambientais, como aos microrganismos, às temperaturas extremas, às substâncias químicas e à abrasão, dessa forma, ocasionalmente poderá ser lesionada, levando a grandes danos.

2.2 Feridas

A pele, por estar exposta ao ambiente externo, poderá sofrer ataques que causam um rompimento tecidual, no qual ocorrem danos em sua estrutura, resultando em feridas cutâneas. Embora os ferimentos sejam apenas relacionados, de maneira generalizada, à uma lesão na superfície da pele, a perda de tecido cutâneo, muitas vezes, não está somente relacionada com a lesão cutânea, mas também pode atingir o tecido subcutâneo como os músculos e ossos, tornando-a mais grave (FERREIRA et al., 2006; TSURUTA et al., 2002).

De acordo com Tsuruta et al., (2002), um ferimento do tecido tegumentar é conceituado como uma ruptura anatômica da estrutura da pele, devido a danos térmicos,

intervenções médicas ou físicas. Essas feridas são divididas conforme seu processo cicatricial em feridas agudas e crônicas.

As feridas agudas aparecem de maneira inesperada e por um pequeno período, sem ocasionar maiores problemas de saúde, como por exemplo as feridas que surgem de pequenos traumas, escoriações, ferimento com objetos perfurocortantes ou procedimentos cirúrgicos (PATRULEA et al., 2015; PERCIVAL, 2002). Dessa maneira, essas feridas podem ser consideradas simples, devido ao fato de que o processo cicatricial ocorre sem dificuldades, contudo, as feridas crônicas necessitam de mais tempo para cicatrizar, além de apresentarem algumas complicações que dificultam a sua cura.

As feridas crônicas são consideradas mais "complexas" que as agudas por apresentarem algumas características que as identificam, tais como: uma grande perda de tecido tegumentar; muitas vezes apresentam infecções, que podem acentuar a perda de tecido local; a perda de circulação sanguínea também é uma característica da ferida crônica, sendo responsável pela necrose, aumentando o risco do paciente perder o membro afetado. Além disso, podem surgir como consequência de alguma doença patológica que impede o processo de cura, requisitando tratamentos especiais (FERREIRA et al., 2006).

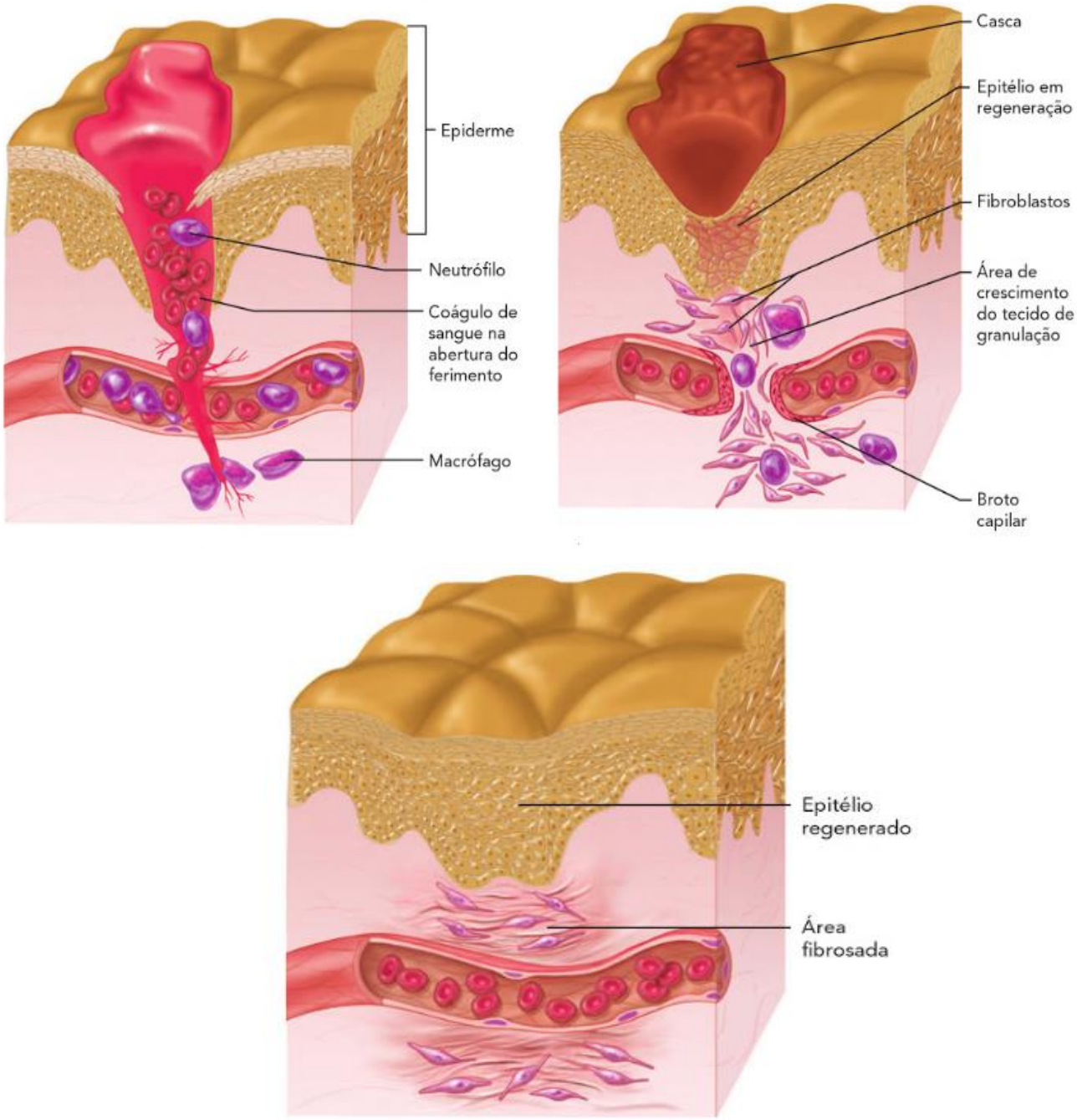
Em vista disso, as feridas crônicas precisam de cuidados especiais, utilizando curativos e medicamentos apropriados que auxiliem o processo cicatricial e que controlem as infecções (FERREIRA et al., 2006; SMANIOTTO et al., 2012). Essas feridas são uma preocupação para o sistema de saúde, devido a existirem pacientes que convivem com essas feridas durante anos de sua vida. Nesse âmbito de feridas crônicas, as mais incidentes em um hospital são as úlceras de pressão, as quais atingem cerca de 60% dos doentes que apresentam feridas, ressaltando as úlceras diabéticas que possuem um alto custo para seu tratamento, além disso, podem gerar complicações neuropáticas e vasculares e ressecamento severo da pele, fatores que afetam diretamente o período de cicatrização (CRUZ, 2012).

2.3 Cicatrização

Com o objetivo de se proteger contra agentes estranhos, o organismo possui diversas barreiras como a da pele e mucosas, dos cílios das células epiteliais que revestem os tratos respiratórios e do estômago. Entretanto, ao ocorrer uma lesão no tecido, o organismo fica exposto a esses agentes, diante disso, gera respostas inflamatórias e imunológicas (MARIEB;

HOEHN, 2009). Ao ocorrer uma lesão na pele, produz um estímulo que ativa o processo cicatricial, ilustrado na Figura 2, mediante a sinalização dos fatores de crescimento liberados pelas células lesionadas (MARIEB; HOEHN, 2009). Desse modo, esse processo de cicatrização, em síntese, é divido em três fases: inflamatória, de proliferação e de maturação (CAMPOS et al., 2007).

Figura 2 – Imagem ilustrativa do processo de cicatrização



Fonte: Marieb; Hoehn (2009)

Diante disso, a primeira fase é a inflamatória, definida pela hemostasia e inflamação. Por exemplo, em uma ferida, as membranas das células injuriadas liberam substâncias vasoconstritoras como a tromboxano A2 e a prostaglandina 2α. Em consequência, formará um coágulo de plaquetas, colágeno, trombina e fibronectina, os quais liberam citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento beta (TGF-β), os fatores de crescimento originado dos fibroblastos (FGF), os fatores de crescimento provindo das plaquetas (PDGF) e os fatores de crescimento epidérmico (EGE), além das moléculas prostaglandinas e tromboxanos, as quais atraem os neutrófilos à ferida (FRANCO, 2001; WITTE; BARBUL, 1997). Assim, essa fase é caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, levando à migração de neutrófilos ao local lesionado, onde sintetizam radicais livres que facilitam a eliminação bacteriana (BROUGHTON et al., 2006). Em razão disso, em seguida, os macrófagos migram para a ferida, aumentando a secreção de citocinas e de fatores de crescimento, que potencializará a síntese da matriz celular, a angiogênese e a fibroplasia (BROUGHTON et al., 2006).

Em decorrência disso, logo após a reação de hemostasia e inflamação ocorrerem, é desencadeada a segunda fase, a proliferativa, momento em que as células que constituem o tecido tegumentar começaram a se multiplicar. Essa fase ocorre em quatro estágios: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e retenção de colágeno (CAMPOS et al., 2007).

O primeiro estágio, da epitelização, poderá seguir por dois caminhos. No caso de feridas em que a membrana basal (camada que separa a epiderme da derme) estiver inteira, as células epiteliais migram para a região superior da membrana, de modo que são restauradas as camadas da epiderme. Todavia, o segundo caminho ocorre quando a camada basal não estiver intacta, assim, as células epiteliais que estão nas bordas da ferida irão se proliferar, formando uma camada protetora (GROTENDORST et al., 1989; LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994)

Concomitantemente, inicia-se o estágio de angiogênese, sendo o responsável pela síntese dos capilares e pela migração das células endoteliais, provindo dos estímulos provocados pelo fator de necrose alfa (TNF-α). Em vista disso, é um estágio importante, devido ao fato de que as fases seguintes, de granulação e de deposição tecidual, necessitam de nutrientes que chegam pelos capilares, caso contrário, será desenvolvida uma ferida crônica incurável (BROUGHTON et al., 2006).

Mediante o exposto, posteriormente é construído o tecido de granulação, sendo formado principalmente pelos fibroblastos e células endoteliais, visto que os fibroblastos

migram a partir do tecido ao redor da ferida, por estímulos do fator de crescimento PDGF. Diante disso, o tecido de granulação apresenta capilares provindos das extremidades da ferida, além dos fibroblastos que proliferam dos tecidos de granulação que sintetizam fatores de crescimento e novas fibras de colágeno. Assim como alguns fibroblastos apresentam característica contrátil que movem as extremidades da ferida, até fechá-la, salienta-se ainda que esse tecido é resistente contra infecções bacterianas (MARIEB; HOEHN, 2009).

Finalizando o processo cicatricial, ocorre a fase de remodelação, certamente uma fase importante para o resultado final da cicatriz, devido ao fato de que, se, eventualmente, a deposição de colágeno na ferida for insuficiente, prejudicará a força tensil da cicatriz, por outro lado, se o colágeno for sintetizado em excesso, levará a uma cicatriz hipertrofiada ou a um queloide (BROUGHTON et al., 2006). Nessa fase, o colágeno (tipo III) presente na ferida apresenta orientação paralela à pele, sendo posteriormente reabsorvido e depositado em seu lugar um colágeno (tipo I) mais espesso, organizando-se ao longo das linhas de tensão. Desse modo, o tecido fibroso ao arredor da ferida amadurece e contrai, espessando o epitélio regenerado com o objetivo de equiparar-se à estrutura da pele intacta adjacente à ferida (BROUGHTON et al., 2006; MARIEB; HOEHN, 2009).

Além disso, o colágeno do tecido de granulação é bioquimicamente diferente do colágeno de uma pele intacta. Esse colágeno apresenta uma maior quantidade de hidroxilação e glicoxilação dos resíduos de lisina, visto que esse aumento está relacionado com a espessura da fibra do tecido. Portanto, o colágeno de uma cicatriz jamais terá o mesmo arranjo que o de uma pele intacta (BROUGHTON et al., 2006).

Embora o processo cicatricial seja um fenômeno fisiológico, existem fatores que podem afetá-lo, como assepsia inadequada, uso de tratamentos incorretos, doenças metabólicas (diabetes melito, doenças hereditárias, hipotiroidismo), idade, hábitos alimentares, vícios (tabagismo), entre outros (CAMPOS et al., 2007). Desse modo, levando em consideração esses fatores, ao cuidar de uma ferida deve-se escolher o melhor tratamento possível, uma vez que este irá interferir no processo cicatricial.

2.4 Biomateriais e tratamento de feridas cutâneas

Nos últimos anos, houve aumento da expectativa de vida, assim como da população mundial, devido ao desenvolvimento das ciências da saúde (Organização das Nações Unidas - ONU). Frente a essas mudanças, surgiu uma necessidade pelo bem-estar das pessoas, ou seja,

através do aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas e biomateriais, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida (CHEN; LIU, 2016).

Os biomateriais são utilizados pela humanidade há muitos anos, sendo primeiramente aplicados como implantes dentários, utilizando ouro e madeira, além das próteses oculares de vidro, mas somente a partir dos anos 60 houve foco no desenvolvimento de novos biomateriais (SOUZA, BRAGA, SOSNIK, 2018). Diante disso, um biomaterial é definido como toda substância de origem natural ou sintética que será aplicada de forma transitória ou permanente nos tecidos dos seres vivos que possa ser usada para fins terapêuticos (CHEN; LIU, 2016; HASTINGS, 1989).

Diante disso, destaca-se os biomateriais de origem natural como, por exemplo, o colágeno (GUIDOIN et al., 1989), a quitosana (FRANCIS SUH; MATTHEW, 2000) e a gelatina (BODINI, 2013). Salienta-se ainda que os biomateriais possuem diversas aplicações, no tratamento de feridas (MURUGADOSS; CHATTOPADHYAY, 2008), entregador de fármacos (FRIESS, 1998) e no tratamento para queimaduras graves (DANG et al., 2018), visto que os biomateriais possuem algumas características interessantes como, serem biocompatíveis e possuírem bioatividade (CHEN; LUI, 2016).

A biocompatibilidade é o fator crucial para a seleção de um material, para que posteriormente seja desenvolvida uma tecnologia biomédica. A princípio, a biocompatibilidade pode ser conceituada como uma propriedade de um material não desencadear uma resposta indesejável no organismo, ou seja, não poderá causar rejeição do material pelos tecidos ao redor do local em que o biomaterial esteja em contato. Em suma, os materiais biocompatíveis não provocam respostas inflamatórias prejudiciais ao organismo, reações alérgicas e imunológicas, além de não serem cancerígenos (CATAURO et al., 2014; GARG et al., 2012). Além disso, outra propriedade importante dos biomateriais é sua bioatividade, a qual se refere ao efeito que determinado material ou substância apresentará sobre o organismo, levando a condições que favorecem algum processo biológico como, por exemplo, a adesão celular, a proliferação e a diferenciação celular (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999).

Diante disso, tanto a biocompatibilidade quanto a bioatividade são características relevantes para um tratamento de feridas crônicas, uma vez que, para ocorrer a cura de um ferimento, é necessário que o produto utilizado para esse fim atue prevenindo ou erradicando infecções e auxiliando o processo cicatricial, reduzindo o tempo de cura (DALLAN, 2005). Dessa forma, as coberturas constituídas de biomateriais podem ser incluídas no tratamento de feridas.

A escolha de uma cobertura ideal depende de alguns fatores, como o tipo de ferida destinada, assim como as substâncias que essa cobertura irá carregar, como antibióticos, antiinflamatórios, células-tronco, nanopartículas, compostos químicos e biomoleculares (enzimas), além dos tipos de cobertura, como os filmes, hidrogéis, hidrocolóides e as antioodor (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016; SMANIOTTO; GALLI1, 2012). Logo, essa escolha deve relacionar sempre o objetivo da cobertura (acelerar a cicatrização, erradicar infecções, proteger do meio externo) com qual biomaterial poderá alcançá-lo assim, por exemplo, para uma cobertura que foque no controle de infecções e auxilie na cicatrização, poderá ser escolhida a quitosana, que contém características antibacteriana e estimuladora do crescimento celular (RAJITHA et al., 2016).

Mediante o exposto, a seguir são discorridas as características dos tipos de coberturas. Apresentando, inicialmente, as coberturas em forma de filmes, as quais apresentam algumas características próximas da epiderme, ou seja, possuem uma boa permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, são elásticas e resistentes às grandes forças tensionais, e sobretudo, são impermeáveis aos microrganismos. A priori são indicados em casos de ferimento com pouca secreção e para queimaduras superficiais (CANDIDO, 2001).

Todavia, os filmes não retêm líquido de mesma forma que os hidrogéis. Por serem constituídos de polímeros hidrofílicos, como a gelatina, são capazes de reter grande quantidade de água dentro da sua estrutura. Em vista disso, são recomendados para feridas muito secas, pois são aplicados úmidos, o que acarreta a redução da sua viscosidade, liberando água na lesão, o que resulta em uma sensação de alívio nas feridas secas (CANDIDO, 2001; FRANCO; GONÇALVES, 2008). Em relação às coberturas hidrocolóides, elas são compostas de uma camada de espuma de poliuretano, de gelatina, pectina e carboximetilcelulose sódica. Essas coberturas têm como objetivo acelerar o estágio de granulação tecidual, discutido anteriormente, através do estímulo da angiogênese. Contudo, essa cobertura poderá ocasionar maceração do tecido se não houver a troca e cuidados diários, devido ao acúmulo de exsudação local. Portanto, sua indicação é para feridas não infectadas, com pouco exsudatos, sendo muito usadas no tratamento das úlceras de pressão (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Muitas vezes as feridas, sobretudo as crônicas, apresentam odor desagradável em decorrência do excesso de secreção, presença de infecções e má assepsia, em vista disso, o carvão ativado é muito utilizado. O carvão é armazenado em duas camadas: a interna, contendo o próprio carvão, com adição ou não de algum agente bacteriano, e uma camada externa semipermeável. O modo de ação do carvão ativado é através da absorção das

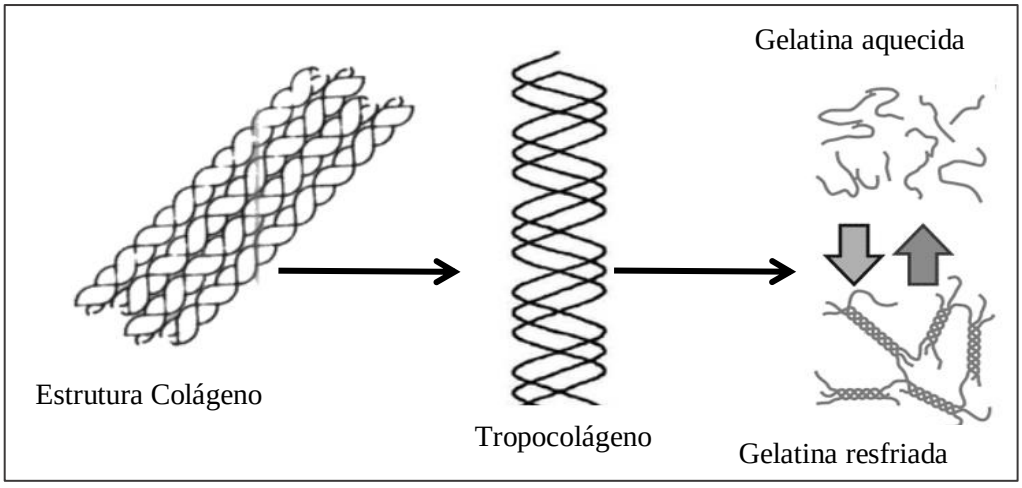
secreções, dos gases e das bactérias, e no momento em que ela estiver totalmente úmida, deverá ser descartada (CANDIDO, 2001).

Portanto, os biomateriais utilizados como cobertura de feridas devem possuir algumas características, como proteger a área contra perda de fluídos e de componentes moleculares, como as proteínas, assim como devem evitar a invasão de microrganismos, provocar a menor resposta inflamatória possível, manter o local da lesão úmido, além de auxiliar a proliferação e migração celular e a angiogênese, dessa forma, poderão promover a epitelização e a completa cicatrização (FIELD; KERSTEIN, 1994; FRANCO, 2014).

2.5 Gelatina

Um dos biomateriais muito estudado para recuperação do tecido cutâneo é a gelatina. Ela é derivada da proteína de animal, resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno, esquematizado na Figura 3. É uma proteína fibrosa e pode ser encontrada nos resíduos do abate e processamento de animais, especificamente nos ossos, tendões e pele (BERTAN, 2003). A gelatina é dissolvida quando suas partículas ficam em repouso formando uma massa homogênea, seguida pelo seu aquecimento até sua dissolução. Assim, a sua principal característica é a capacidade de formar gel através do resfriamento das soluções anteriormente aquecidas, sendo capaz de reter água no interior da sua estrutura em decorrência das ligações iônicas entre grupos amino e carboxílicos dos aminoácidos com o auxílio de ligações de hidrogênio (BERTAN, 2003; DJAGNY; WANG; XU, 2001).

Figura 3 - Imagem ilustrativa da conversão do colágeno para gelatina



Fonte – Autoria própria

A gelatina é constituída de 18 aminoácidos diferentes, os quais são organizados em blocos flexíveis e blocos rígidos. O primeiro é distribuído em tríade caracterizada pela glicina sempre como o terceiro aminoácido, o segundo bloco, que é formado pela sequência hidroxiprolina, prolina e glicina (DJAGNY et al., 2001; PEREDA et al., 2011). Isto posto, existe uma sequência de aminoácidos que influencia a migração e a adesão celular, o "motivo RGD" (arginina-aspartamo-glicina). Esse peptídeo é o mais eficaz em estimular a atividade celular em decorrência da sua capacidade de mimetizar proteínas de adesão celular através da ligação nos receptores celulares, logo, afetará o comportamento das células (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; LAGUNAS et al., 2012).

Além disso, o "motivo RGD" é capaz de se ligar às cadeias poliméricas através de ligações covalentes entre os grupos funcionais hidroxila, amino e carboxila, localizados na superfície dos polímeros. A ligação entre esses peptídeos e os polímeros também pode ocorrer por meio de reações de copolimerização, química ou até por tratamentos físicos (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; LAGUNAS et al., 2012; MAURI et al., 2018). Essa interação dos "motivos RGD" com os polímeros é muito estudada para entrega de fármaco, por meio de encapsulamento, filmes e hidrogéis (ETXABIDE et al., 2017; MAURI et al., 2018).

A princípio, a gelatina é muito utilizada na indústria alimentícia, por exemplo na clarificação e estabilização de bebidas, além de produção de alimentos (bolos, tortas, geleias, entre outros). Entretanto, esse hidrocolóide apresenta propriedades favoráveis para a produção de filmes, devido a sua biocompatibilidade e por ser biodegradável, sobretudo, pela sua bioatividade, que contribui para a migração, proliferação, diferenciação e adesão celular (DJAGNY et al., 2001).

2.6 Quitosana

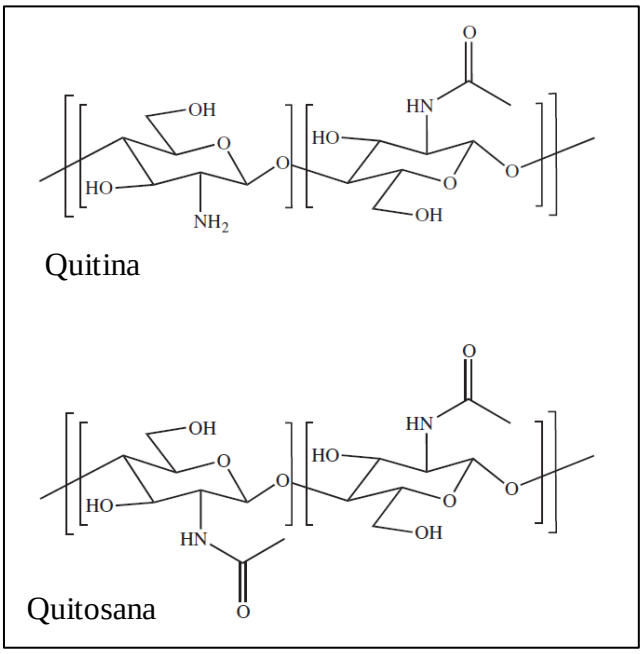
A quitina e a quitosana são compostas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose, unidas por ligações glicosídicas beta (1→4). A diferença entre os dois polímeros, representada na Figura 4, é a proporção relativa dessas estruturas e a sua solubilidade; na quitina há predomínio da unidade 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose e apresenta insolubilidade na maioria dos solventes, enquanto na quitosana a unidade que prevalece é a 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose, sendo esta solúvel em ácidos orgânico e inorgânico (AZEVEDO et al., 2007; WANG et al., 2014).

A quitosana é derivada da quitina, que é extraída dos exoesqueletos de algumas espécies, tais como insetos e crustáceos, inclusive de paredes celulares de fungos e moluscos.

Dessa forma, a quitina, por ser um polímero retirado da natureza, está relacionada com a sua fonte e local de coleta, consequentemente, a quitosana também é influenciada por esses fatores (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

Mediante o exposto, a transformação da quitina em quitosana, em suma, ocorre por meio da desacetilação dos grupos acetil ($NHCOCH_3$) presentes na quitina, a qual é feita através de uma solução concentrada de hidróxido de sódio (AZEVEDO et al., 2007). Assim, a quitosana é um biopolímero, solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com protonação no grupo NH3 (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

Figura 4 – Imagem da estrutura molecular da quitina e da quitosana



Fonte - Imagem adaptada de Croiser e Jérôme (2013)

Na pesquisa, a quitosana é muito estudada em várias áreas, tais como: cosmética e farmacêutica, sendo aplicada em hidratantes e auxiliadora de emagrecimento (CHALONGSUK; SRIBUNDIT, 2013); na indústria alimentícia, principalmente, nas embalagens dos alimentos (TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2009), como também na área ambiental, no tratamento de água, focado na remoção dos metais pesados, matéria orgânica e inorgânica (GÉRENTE et al., 2010). A quitosana é, sobretudo, mais estudada e aplicada na área biomédica e farmacêutica, como no tratamento para queimaduras e feridas (CAMPANI et al., 2018; ORYAN et al., 2018) e na confecção de coberturas e cápsulas para entrega de fármacos (HUANG et al., 2018; RAWAL; PATEL; BUTANI, 2018).

Os estudos sobre a quitosana como biomaterial são baseados em suas diversas propriedades, especialmente em sua biocompatibilidade e bioatividade (BERGER et al., 2004), além da ação antibacteriana e da habilidade de estimular a proliferação e migração celular (MUZZARELLI, 2009).

Dessa maneira, as coberturas constituídas de quitosana aproveitam, sobretudo, da sua característica de auxiliar na vascularização, no fechamento e na regeneração da pele lesionada, assim como a sua propriedade de prevenir infecções na ferida através da sua ação antibacteriana (BANO et al., 2017).

Além disso, a quitosana consegue formar ligações com outras moléculas, possibilitando a formação de uma blenda, podendo adicionar em uma membrana de quitosana outro composto para melhorar ou completar as propriedades do biomaterial como, por exemplo, a gelatina. Essa união é possível devido à interação eletrostática dos grupos amino protonado da quitosana e dos grupos carboxílicos da gelatina, resultando em um complexo polieletrolítico (RODRÍGUEZ, 2018). Com isso, a eficácia dessa blenda foi estudada por diversos pesquisadores, como Covarrubias et al., (2018), que desenvolveram um *scaffold* com quitosana e gelatina contendo nanopartículas de biovidro, o que resultou em um biomaterial com capacidade de acelerar a recuperação óssea. Assim como Risser et al., (2017), que analisaram o efeito biológico de uma espuma de amido e quitosana com gelatina, em células osteoblásticas, e observaram um crescimento e proliferação celular proporcional à concentração de gelatina na amostra.

Dessa forma, a blenda de quitosana e gelatina apresenta algumas vantagens, como aumento na permeação ao vapor, potencializa as propriedades que influenciam a atividade biológica, como melhora da biocompatibilidade, presença de aminoácidos que promovem adesão e migração celular, pois tanto a quitosana como a gelatina influenciam o meio celular (FAKHREDDIN et al., 2013; THEIN-HAN et al., 2009), além de colaborar com a estrutura da membrana por meio do ganho de resistência mecânica e elasticidade comparando com filmes de quitosana ou gelatina isolados (NAGAHAMA et al., 2009).

Contudo, algumas pesquisas demonstram que a eficácia contra as bactérias depende dos seguintes fatores: espécie do microrganismo, idade celular, concentração de quitosana, massa molar e do grau de desacetilação (BANO et al., 2014; KEAN; THANOU, 2010). Assim, como dito anteriormente, as coberturas de feridas precisam apresentar alguns requisitos, entre eles a ação antibacteriana, portanto, para suprir essa necessidade, pode-se agregar nanopartículas de prata às membranas.

2.7 Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata estão sendo muito exploradas nos últimos tempos, em diversas áreas, como na alimentícia, na saúde e na industrial, devido às suas características físicas e químicas, tais como óptica, alta condutividade elétrica e biológica (ZHANG et al., 2016). Além disso, podem ser aplicadas como agentes antibacterianos, em medicamento, como revestimentos de dispositivos médicos, sensores ópticos, em plataformas de diagnósticos, ortopedia, carreamento de drogas e como agentes anticancerígenos (ZHANG et al., 2016).

Contudo, as propriedades das nanopartículas são dependentes do tamanho e de sua forma, de maneira que o mesmo material poderá apresentar propriedades físicas e químicas distintas apenas alterando características como o tamanho, estrutura cristalina e forma. Desse modo, o comportamento das nanopartículas é complexo e pouco conhecido, principalmente em tecidos vivos e nos efeitos a longo prazo, como genotoxicidade e sistema imune (ZIVIC et al., 2018).

Dessa forma, as NPsAg possuem ação nos organismos, que podem interagir com os grupos químicos expostos em sua superfície; seu tamanho, que pode atravessar as membranas plasmáticas de células de bactérias; a concentração molar das NPsAg; a morfologia (redondas, triangulares); se há liberação de íons no meio, entre outros (CARLSON, et al., 2009). Logo, essas propriedades podem influenciar, por exemplo, na biocompatibilidade das nanopartículas. Assim, a síntese de NPsAg com estrutura e funcionalidade bem caraterizadas são importantes para a sua aplicação biomédica (ZHANG et al., 2016).

Para uma partícula ser considerada nano, deve apresentar um tamanho entre 1 a 100 nm. A sua síntese é através de suspensões coloidais estáveis e estabilizantes que evitam que se aglomerem, que as recobrem formando uma camada que impede sua coalescência. Os estabilizadores mais usados são o polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinilíco (PVA) e outros polímeros, que possuem cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico (MELO et al., 2012).

Em vista disso, a síntese coloidal de nanopartícula depende de alguns componentes, como o meio, precursor, agente redutor e estabilizante; sendo que o meio é o líquido onde a reação ocorrerá, o precursor refere-se ao composto químico que irá se transformar em partícula. Dessa forma, a síntese das nanopartículas pode ser explicada pelo mecanismo de nucleação e crescimento (ZANCHET, 1999), em que a concentração de monômeros em solução ou complexos moleculares ultrapassa a concentração crítica de nucleação,

ocasionando a síntese de aglomerados de átomos (núcleo ou sementes), diante disso, ocorre o crescimento dos núcleos já formados pelos monômeros (ROCHA, 2008).

Para sintetizar nanopartículas pode seguir a rota química e a rota biológica/verde. A diferença entre elas está no agente redutor, que converte os íons metálicos em nanopartículas, onde na rota química é utilizado o boro hidreto de sódio, enquanto a rota verde utiliza compostos naturais, tais como bactérias, fungos, plantas, algas, carboidratos, polímeros entre outros (PARK, 2014).

Dessa forma, a síntese verde das nanopartículas apresenta algumas vantagens como, por exemplo, fornece partículas uniformes, ou seja, de tamanhos e formas homogêneas (ZHANG et al., 2016), assim como diminui o custo e o uso de reagentes químicos, reduzindo o potencial de citotoxicidade das nanopartículas, abrangendo sua aplicabilidade (PARK, 2014; SINGH et al., 2016).

A utilização da prata como agente antibacteriano é muito conhecida, pois era utilizada nos tratamentos de queimaduras e feridas, contudo quando a penicilina foi descoberta, o seu uso foi suspenso. Entretanto, com a seleção de cepas resistentes aos antibióticos, a prata voltou a ser estudada pela comunidade científica (ANTUNES et al., 2013). Consequentemente, as nanopartículas de prata possuem uma ação bactericida muito ampla e eficaz, sendo possível eliminar tanto as bactérias aeróbicas quanto as anaeróbicas, gram-negativas e gram-positivas (CHOI; HU, 2008). O mecanismo proposto de como as NPsAg podem combater as bactérias é através da liberação de íons Ag^+ seguida pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a danos estruturais, morfológicos e fisiológicos (HWANG et al., 2008).

Dessa forma, foram feitos estudos que comprovaram essa ação antibacteriana das NPsAg, tais como Ghilini et al. (2018) em que demonstraram por meio de imobilização das NPsAg em uma superfície de titânio os efeitos bactericidas contra as *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que eram dependentes com a concentração das nanopartículas. Assim como Moreira et al. (2015), que desenvolveram um cimento ortodonlógico com NPsAg, no qual foi possível observar a ação contra a *Streptococcus mutans* e a *Lactobacillus acidophilus*; entre outras pesquisas, as quais também reforçaram essa propriedade antibacteriana das NPsAg (AHMED et al., 2016; DHAND et al., 2016; WONGPREECHA et al., 2018). Portanto, a adição das NPsAg em uma cobertura de feridas será de grande auxílio contra possíveis infecções bacterianas.

Logo, o desenvolvimento de uma membrana de quitosana e gelatina conjugada com nanopartículas de prata, utilizando compostos totalmente naturais, pode se tornar uma

ferramenta poderosa capaz de reduzir significativamente as taxas de infecções nas lesões e acelerar a vascularização local e a cicatrização, além de apresentar características que impedem o dano na área lesionada quando implantado ou retirado, devido ao seu fácil manuseio (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata, obtidas por uma rota verde, para possível aplicação como cobertura de feridas.

3.2 Objetivos específicos

1. Obter e caracterizar as nanopartículas de Ag (NPsAg)

2. Obter membranas de gelatina/quitosana (GQ) com diferentes concentrações de NPsAg (GQAg).

3. Caracterizar físico quimicamente as membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata.

4. Avaliar a citotoxicidade das membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata.

5. Avaliar a característica antimicrobiana das membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata.

4 MATERIAIS E MÉTODO

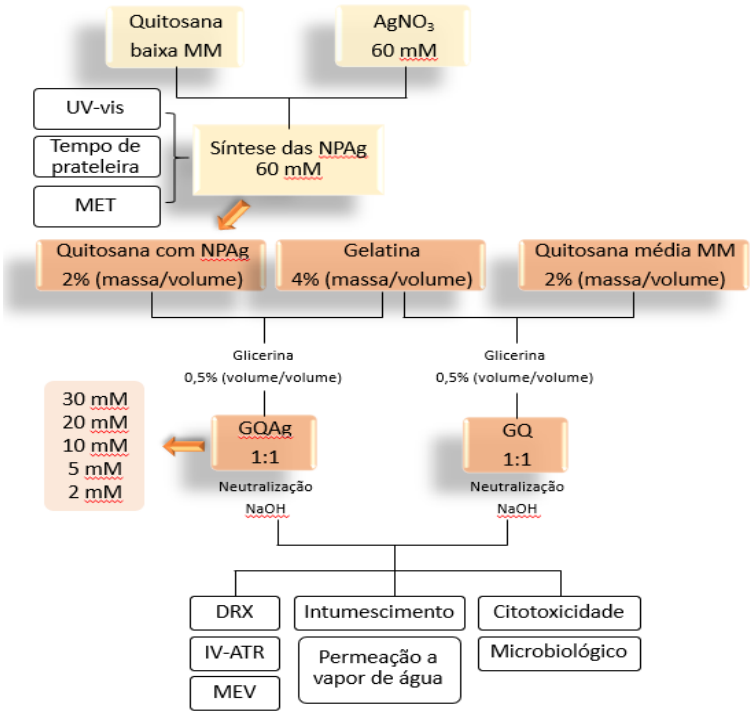
4.1 Materiais

Para produzir as membranas, foram utilizados os seguintes compostos: quitosana de baixa e média massa molar da Sigma-Aldrich, gelatina suína de 260 bloom, fornecida pela Gelita do Brasil, ácido acético glacial (CH_3COOH), nitrato de prata ($AgNO_3$), glicerina, hidróxido de sódio (NaOH). Além disso, foi usado agitador mecânico de bancada, assim como para molda-las, placas de petri de poliestireno 9 cm x 1,5 cm e estufa de secagem com renovação/circulação de ar.

4.2 Fluxograma da metodologia

A Figura 5 representa o fluxograma da metodologia utilizada no desenvolvimento desse trabalho.

Figura 5 – Fluxograma da metodologia



Fonte – Autoria própria

4.3 Síntese das nanopartículas de prata

A síntese das NPsAg foi realizada de acordo com metodologia modificada adotada no Laboratório de Biomateriais e Biossensores (BioLab) da Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga -SP (VERCIK, VERCIK, RIGO, 2017). As NPsAg apresentam um papel importante no desenvolvimento das membranas, de modo que a sua presença nas amostras poderá auxiliar no controle bacteriano esperado neste projeto.

A metodologia consistiu em utilizar uma solução de quitosana de baixa massa molar, como agente redutor e estabilizante, com concentração de 6,92 mg/mL solubilizada em ácido acético 1% (volume/volume), seguida pela adição de solução de $AgNO_3$ 60 mM. Após a mistura a solução foi transferida em tubos de vidros e colocadas em um banho-maria, com agitação constante, por 21 horas a 90ºC. Durante essa etapa, os íons metálicos da prata são reduzidos pelos polissacarídeos presentes na quitosana. Logo após, a solução foi transferida para uma garrafa de vidro âmbar, resfriada e armazenada em temperatura ambiente afastada da iluminação.

4.4 Caracterização das nanopartículas de prata

4.4.1. Caracterização por espectroscopia no UV-vis

Para confirmar a formação das NPsAg utilizou-se da técnica por espectroscopia UV-vis. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro na faixa de onda de 800 a 190 nm (BEL modelo M51) localizado no Laboratório de Nanotecnologia, Biossensores e Dispositivos (NanoBioDev), Departamento de Ciências Básicas da FZEA – USP.

4.4.2 Tempo de prateleira das NPsAg

A estabilidade das NPsAg foi analisada utilizando uma solução estoque e foram realizadas medidas no UV-vis na faixa de onda de 800 a 190 nm em triplicata a cada 15 dias por um período de 6 meses, determinando assim o tempo de prateleira ou “shelf time”. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro BEL modelo M51 do Laboratório de Nanotecnologia, Biossensores e Dispositivos (NanoBioDev), Departamento de Ciências Básicas da FZEA – USP.

4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão é importante para a análise de materiais, devido que permite a visualização da morfologia, de defeitos, da estrutura cristalina, entre outros. O princípio do MET consiste em um feixe de elétrons, o qual atravessa uma amostra, com distribuição de intensidade e direção controladas pelas leis de difração, imposta pelo arranjo cristalino dos átomos da amostra (WANG, 2002). Dessa forma, pode-se determinar o formato e a estrutura das nanopartículas, de modo que se possa revelar a distribuição atômica na superfície das nanopartículas. Para isso, 100 µL da solução de NPsAg foram gotejados na face de carbono de um grid para MET, mantido em estufa á 37ºC por 48 h, afim de eliminar as moléculas de água. Essa caracterização foi feita na Universidade de São Paulo no Laboratório de Microscopia no Instituto de Química de São Carlos- SP.

4.5 Membranas de gelatina/quitosana (GQ)

As membranas de GQ na proporção de 1:1 foram obtidas mediante a mistura das duas soluções precursoras, solução de quitosana 2% (massa/volume) de média massa molar em ácido acético 1% (volume/volume) e uma solução aquosa de gelatina 4% (massa/volume). Essa mistura foi mantida sob agitação constante por 1h, após esse período adicionou-se 0,5% (volume/volume) de glicerina; a mistura foi vertida em placas de Petri estéreis de 9,0 cm x 1,5 cm, secas em estufa de circulação de ar por 48 horas a ±35ºC.

Após a secagem as membranas, foram imersas em solução de NaOH 0,25 M, por 2 horas, seguida por lavagens seriadas, aproximadamente 5 vezes, com água destilada, até atingirem pH neutro e secas em temperatura ambiente por 24 horas.

4.6 Membranas de gelatina/quitosana com NPsAg (GQAg)

As membranas de GQ com NPsAg na proporção de 1:1 foram obtidas mediante a mistura de duas soluções precursoras, uma solução de quitosana 2% (massa/volume) de média massa molar em ácido acético 1% (volume/volume) e uma solução aquosa de gelatina 4% (massa/volume). Para o preparo da solução de quitosana 2% (massa/volume) utilizou-se da solução de NPsAg de 60mM, a qual foi adicionada uma massa de quitosana até a

concentração de 2% (massa/volume) e após sua homogeneização adicionou-se a solução de gelatina 4% (massa/volume). As membranas com concentrações de nanopartículas de 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM e 2 mM foram obtidos mediantes ajustes das misturas das soluções de quitosana com NPsAg. Todas as misturas precursoras das membranas foram mantidas sob agitação constante por 1 hora, após esse período adicionou-se 0,5% (volume/volume) de glicerina utilizada como agente plastificante; as misturas foram vertidas em placas de petri estéreis de 9,0 cm x 1,5 cm, secas em estufa de circulação de ar por 48 horas a ±35ºC.

Após a secagem as membranas, foram imersas em solução de NaOH 0,25 M, por 2 horas, seguida por lavagens seriadas, aproximadamente 5 vezes, com água destilada, até atingirem pH neutro e secas em temperatura ambiente por 24 horas.

4.7 Caracterizações físico-químicas das membranas

As membranas de GQ e GQAg foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaio de intumescimento e medida de permeação a vapor de água (PVA).

4.7.1 Difração de raios X (DRX)

A difratometria de raios X (DRX) consiste na interação de dois feixes de raios X procedentes de uma fonte, que irá incidir sobre a amostra. Em decorrência da proximidade do comprimento de onda de raios X e as distâncias interplanares de um cristal, este atua como uma grade de difração. Diferentes planos refletem os raios iniciais que já tem uma diferença de fase, dependendo do ângulo de incidência do feixe, permitindo caracterizar a distância interplanar e, portanto, a estrutura cristalina do composto. Com os resultados obtidos é possível estabelecer os parâmetros da rede cristalina e identificar o composto através de uma base de dados (ANTOMNIASSI, 2010).

As análises de difração de raios X, Miniflex 600 (Rigaku), utilizou-se uma fonte de radiação de α = 0,24°/min na varredura, 40 kV e 40 mA. As bandas de absorção da fase cristalina são identificadas pelos índices de Miller e correspondem à estrutura cristalina, essa análise foi feita no Laboratório de Construções e Ambiência da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) em Pirassununga-SP.

4.7.2 Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR)

O IV-ATR é um equipamento de reflexão atenuada capaz de medir as mudanças que acontecem em um feixe de infravermelho quando sofre reflexão interna total, ao entrar em contato com a amostra. A espectroscopia no infravermelho consiste no fenômeno de que as ligações químicas possuem uma frequência específicas de vibrações, que estão relacionados aos níveis de energia molecular (*níveis vibracionais*). Sendo que, esses níveis de vibração dependem de alguns fatores, tais como a geometria molecular, o acoplamento de vibrações e da massa dos átomos.

De modo que, quando a molécula recebe a radiação eletromagnética com energia semelhante à uma dessas vibrações, o seu momento dipolo poderá variar e a luz será absorvida. A radiação de penetração é denominada de onda evanescente, assim se o material absorver o comprimento dessa onda, ocorrerá a atenuação do feixe a comprimentos de onda que será correspondente as bandas de absorção no infravermelho, resultando em um espectro (GOORMAGHTIGH; CABIAUX; RUYSSCHAERT, 1990).

Para as análises das membranas com diferentes concentrações de NPsAg e a membrana GQ, foi realizado espectrometria no infravermelho em um espectrômetro Spectrum One (Perkin Elmer), localizado na USP-FZEA em Pirassununga- SP, pela técnica de Reflectância Total Atenuada, utilizando um intervalo de onda de 6000 a 550 cm^{-1}, com resolução de 2 cm^{-1} e com 32 varreduras.

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície da membrana foi obtida pelo MEV, em que foi feito análise de espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) para identificação dos elementos químicos presentes nas membranas. A microscopia eletrônica é uma ferramenta muito utilizada pelos pesquisadores de diversas áreas, em vista que ela abrange técnicas que possibilitam a caracterização da morfologia do material, da sua composição química e estrutura atômica, como por exemplo de materiais como metais, polímeros, compostos biológicos e cerâmicas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Em destaque a técnica de EDS, a qual corresponde aos fótons com energia de todo espectro de raios X que será detectado, de maneira rápida, permitindo analisar os comprimentos de ondas de modo instantâneo. Assim, a interpretação dos espectros é por meio

de uma base de dados que contém todos os elementos químicos, sendo possível fazer uma lista dos elementos que possuem uma raia no domínio energético (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Portando com o MEV, além de observar a morfologia das membranas também é possível verificar os elementos químicos presentes nelas.

Para essa análise foi utilizado do MEV da marca HITACHI, modelo TM3000, disponível no Departamento de Zootecnia da USP-FZEA em Pirassununga-SP. Enquanto as fotomicrografias da superfície, as amostras foram resfriadas em nitrogênio líquido e fraturadas, disponível no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), em São Carlos-SP; todas as imagens foram feitas com feixe de elétrons de 15 kV.

4.7.4 Ensaio de intumescimento

Por meio desse ensaio, é possível verificar se as membranas possuem a habilidade de absorver líquidos. A partir do princípio que o intumescimento pode produzir um inchaço do polímero, abrindo espaços na matriz polimérica ou a dissolvendo a matriz.

No caso das membranas de gelatina/quitosana, ocorrem as duas ações, a primeira em que água entra na matriz intumescendo-a e, ao mesmo tempo há a degradação da gelatina, de qualquer modo, a molécula aprisionada será liberada pelo intumescimento e dissolução da membrana simultaneamente (SIMÓ; CIFUENTES; GALLARDO, 2003).

$$I\ (\%) = \frac{(Mu - Ms)}{Ms} x\ 100 \qquad \textbf{Equação 1}$$

Dados: I (%) = grau de intumescimento da amostra

Mu = massa úmida

Ms = massa seca

As membranas foram cortadas em triplicata, pesadas e imersas em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,01 ml/L com pH 7,4 e mantidas em incubadora (QUIMIS®) a 37ºC. Foram retiradas do PBS, para a pesagem nos tempos: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h.

4.7.5 Medida de permeação ao vapor de água (PVA)

O ensaio de permeação ao vapor da água, foi adaptado do método ASTM (American Society for Testing and Materials) E96, o qual o define como sendo a taxa de tempo da passagem do vapor d´água entre uma área e uma espessura específica, induzida pelas diferenças de pressão de vapor entre duas superfícies, sob condições controladas de temperatura e umidade.

Foram utilizados para esse ensaio, micrômetro digital (Mitutoyo, Absolute™), cápsula de alumínio, água destilada, balança de alta precisão, sílica (umidade relativa 50%), incubadora B.O.D MA415 da Marconi® e dessecador de vidro.

As membranas foram pesadas e as medidas de espessura foram obtidas de três áreas distintas em triplicata. Foram fixadas sobre as cápsulas contendo 60 g de sílica com área de 15,2 cm^2, esse conjunto foi pesado e colocado no dessecador que continha água destilada. Os dessecadores foram condicionados nas incubadoras B.O.D. Os parâmetros determinados para esse ensaio foram: temperatura a 35ºC e umidade relativa de 50%.

A taxa de permeabilidade da membrana ao vapor da água (PVA) foi determinada pelo aumento da massa do sistema, em decorrência da absorção da umidade pela sílica. De modo que é considerado que a transição de vapor de um ambiente ao outro, ocorre por causa da permeação do vapor da água, que atravessa a membrana, a qual está separando a região contendo sílica do meio externo do sistema.

Para analisar os dados, foi determinado coleta das massas das cápsulas, duas vezes ao dia, durante 5 dias. Dessa forma, utilizando os dados de ganho de massa e com o tempo de ensaio, foram construídas curvas, nas quais a região linear correspondente ao equilíbrio, com isso foi ajustada para uma reta. Sendo que, o coeficiente angular desta reta foi utilizado para o cálculo de PVA, assim como a área de permeação e espessura da amostra, associado à taxa de permeabilidade das membranas ao vapor d'água, na temperatura e umidade relativa do ensaio. Por meio das equações 2 e 3, foi calculado os valores de PVA com unidade de medidas diferentes.

$$PVA_{(g\ x\ mm/m^2\ x\ dia\ x\ kPa)} = \frac{inclinação\ da\ reta\ x\ espessura\ da\ amostra}{área\ de\ permeação\ x\ pressão\ de\ vapor d'água\ x\ UR}$$ **Equação 2**

$$PVA_{(g/m^2\ x\ dia)} = \frac{inclinação\ da\ reta}{área\ de\ permeação\ x\ dia}$$ **Equação 3**

4.8 Caracterizações in vitro

Para as análises in vitro foram realizados ensaios de citotoxicidade (IC50) seguindo a norma ISO 10993-5:2009 para verificar a biocompatibilidade das membranas e o ensaio microbiológico para verificar a capacidade antibacteriana das amostras.

4.8.1 Ensaio de citotoxicidade (IC50)

Para verificar se as membranas apresentam toxicidade para as células, foi seguido o teste indireto de citotoxicidade (IC50), com Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) como previsto na norma ISO 10993-5:2009. Na qual se baseia na concentração da amostra em que apresenta toxicidade para 50% das células, ou seja, a concentração da amostra que leva a apoptose metade das células que manteve contato. Esse ensaio foi feito em triplicata amostral e em duplicata técnica, no laboratório de Biomateriais e Biossensores, do Departamento de Ciências Básicas da USP-FZEA em Pirassununga-SP.

Dessa maneira, em uma placa de 96 poços (Kasvi®), foi adicionado $1x10^5$ células/mL por poço, em seguida essa placa foi incubada (ESCO® CelCulture CO_2 incubator) por 24 horas, a 37ºC em 5% de CO_2, em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI - GIBCO) suplementado com soro fetal bovino 5%. Assim como, as membranas foram cortadas com 1 cm^2 de diâmetro, esterilizadas por 2 horas em luz ultravioleta e, mantidas submersas em meio RPMI com soro fetal bovino 5%, assim como o controle positivo (fenol 0,2%) e o controle negativo (pastilha de alumina de 100 mg/mL). Em seguida, como as células, as membranas e os controles foram incubadas na mesma estufa por 24 horas.

Após as 24h as membranas e os controles, passaram por uma diluição seriada: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, além disso o meio da placa de ensaio foi descartado. Dessa forma, as diluições foram transferidas para os poços da placa, a qual foi novamente incubada na estufa por 24 horas.

Por fim, após incubação, para destacar as células vivas das mortas, foi utilizado método colorimétrico com Vermelho Neutro (VN) (Sigma-Aldrich). Dessa forma, a placa foi novamente incubada por 3 horas. Logo após os poços foram lavados com PBS e adicionado solução de extração do VN das células. O resultado foi analisado por absorbância em um leitor de microplaca (Thermo Scientific – Multisckan FC), obtendo dados para verificar se houve ou não efeito citotóxico.

4.8.2 Ensaio microbiológico

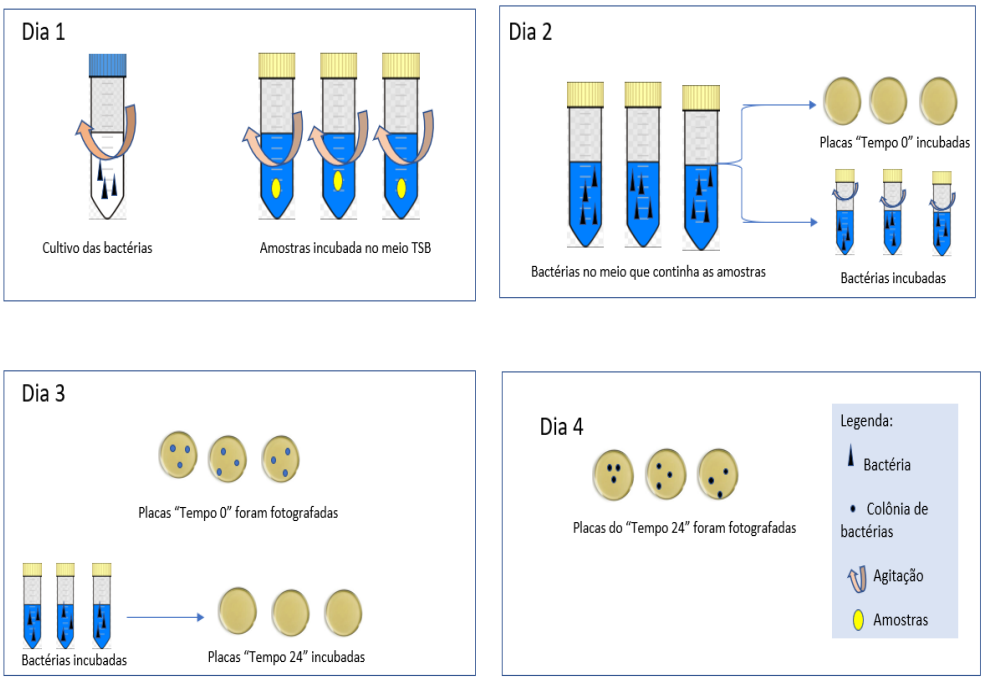
O ensaio microbiológico tem como objetivo testar os meios em que as membranas estiveram em contato, para verificar se elas quando intumescidas irão liberar as NPsAg, o qual acarretará nas morte das bactérias.

Dessa maneira, todas as membranas foram testadas na bactéria encontrada em feridas a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Para isso, os materiais utilizados foram: os meios Tryptic Soy Broth (TSB – Oxoid®) e Agar Mueller Hinton (Oxoid®), como controle positivo, o antibiótico gentamicina (Sensifar®), incubadora bacteriológica (Qualxtro®), incubadora de agitação (Tecnal® – TE-420) placas de petri de 150 mm (Kasvi®) e o espectrofotômetro (Beckman Coulter – Du®800 Spectrophotometer). Na Figura 6, está resumida em forma de esquema os passos deste ensaio. Esse ensaio foi realizado em triplicata amostral e em duplicata técnica, no Laboratório de Química Biológica, do Departamento de Ciências Básicas da Universidade de São Paulo, Pirassununga -SP.

Primeiramente, as bactérias foram cultivadas em meio TSB, sob agitação constante a 37ºC por 24 h, concomitantemente, as membranas e a gentamicina foram esterilizadas em luz ultravioleta por 2 h e, incubadas sob agitação em meio TSB, com mesma concentração que os ensaios celulares, 100 mg/ mL, assim também sob as mesmas condições que as bactérias, por 24 h a 37ºC.

Após esse período, retirou-se as membranas e a gentamicina dos meios e em seguida adicionou-se 1 x 10^5 bactérias por mL e novamente foram incubados por 24 h a 37ºC. Foram retiradas alíquotas de 100 µL e plaqueadas em meio ágar sólido em duas condições: uma imediatamente após a adição das bactérias nos meios (tempo 0) e outra após as 24 h de incubação dos meios com as bactérias (tempo 24). Nas duas condições as placas foram novamente incubadas por 24 h a 37ºC. Por fim, todas as placas, após a finalização dos seus respectivos períodos de incubação, foram fotografadas, para comparação de crescimento de colônias de bactérias com as placas “tempo 0” e “tempo 24”.

Figura 6 – Ilustração do procedimento adotado para o ensaio bacteriológico.



Fonte – Autoria própria.

4.9 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Origin Pro 8, para confirmar a distribuição normal dos valores avaliados, através da análise variância (ANOVA) e o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

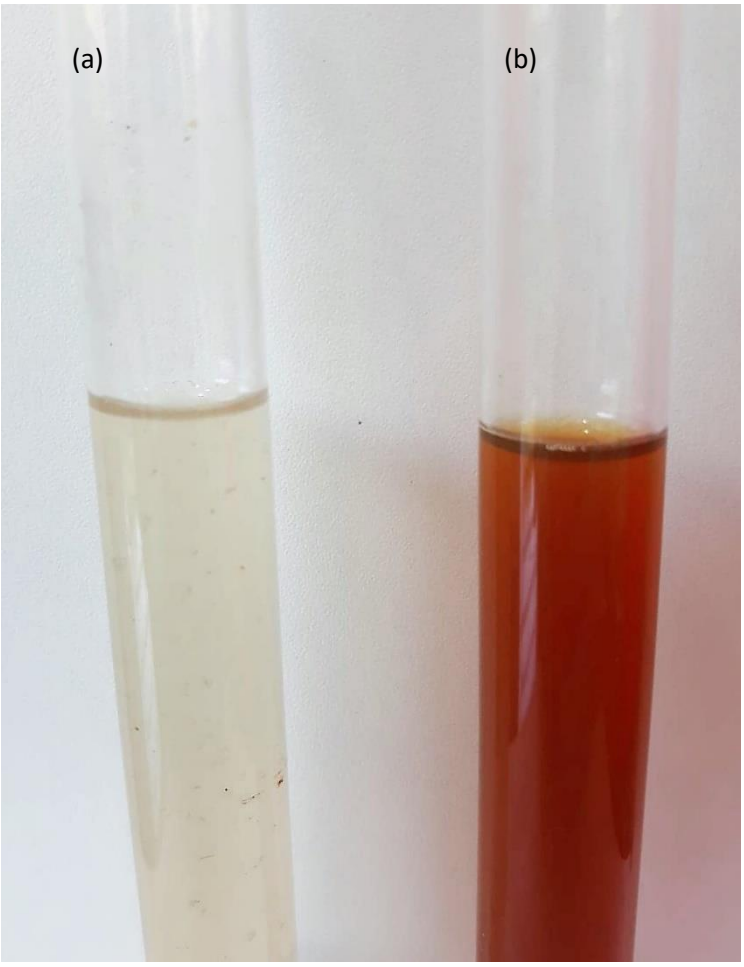
5.1 Síntese das nanopartículas de prata (NPsAg)

Dentre os métodos empregados para obtenção de nanopartículas, destacam-se os métodos químicos por serem rápidos e permitirem produção em larga escala. Nestes métodos os sais metálicos presentes em meios sólidos ou líquidos são reduzidos utilizando um agente redutor com a possibilidade de controle do tamanho e da polidispersidade das nanopartículas, porém, os agentes redutores mais utilizados são o borohidreto de sódio e o citratos. Como solução ao uso desses agentes redutores surgiram métodos denominados de síntese verde, onde os agentes redutores são de origem biológica, como: fungos, extratos de plantas, células, amido, açúcares, látex, quitosana e etc. (VIGNESHWARAN et al., 2006; WEI; QIAN, 2008).

A síntese das NPsAg é fundamental para o desenvolvimento das membranas, sobretudo, devido as suas propriedades antibacterianas. Durante o processo de síntese das nanopartículas com a quitosana, ocorreu uma mudança de coloração da solução, inicialmente ela apresentou cor cinza e no final da síntese sua cor mudou para marrom, como demonstrado na Figura 7. Essa transição de cor, assim como o pigmento da coloração, está relacionada com a concentração molar do AgNO3 e da quitosana presente no sistema coloidal (WEI; QIAN, 2008).

Nos espectros de UV-vis apresentados na Figura 8(a) é possível observar que as três sínteses de nanopartículas obtidas em períodos diferentes apresentaram áreas semelhantes, no intervalo de 425 nm a 450 nm, verifica-se um pico de absorbância correspondente para a formação de NPsAg (WEI; QIAN, 2008), enquanto o pico observado em 310 nm, indica a presença da quitosana na solução.

Figura 7 – Imagem fotográfica da solução precursora das NPsAg (a) e a solução após a síntese (b). Nessa imagem é observado a mudança de coloração após a síntese de NPsAg



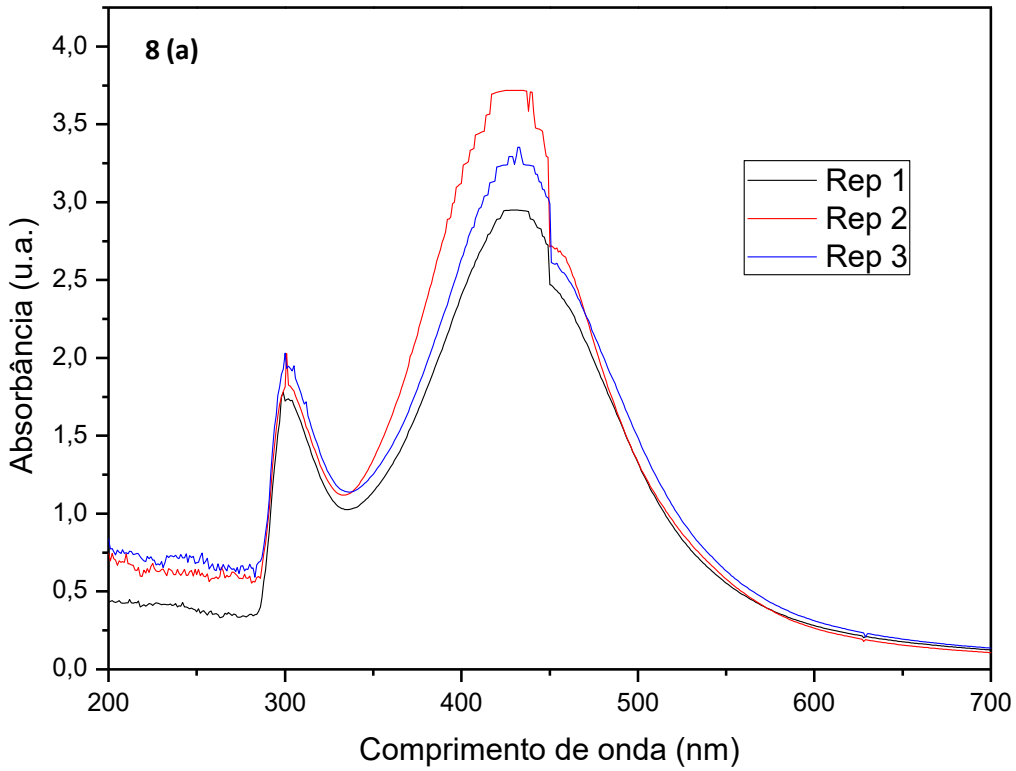
Fonte – Autoria própria

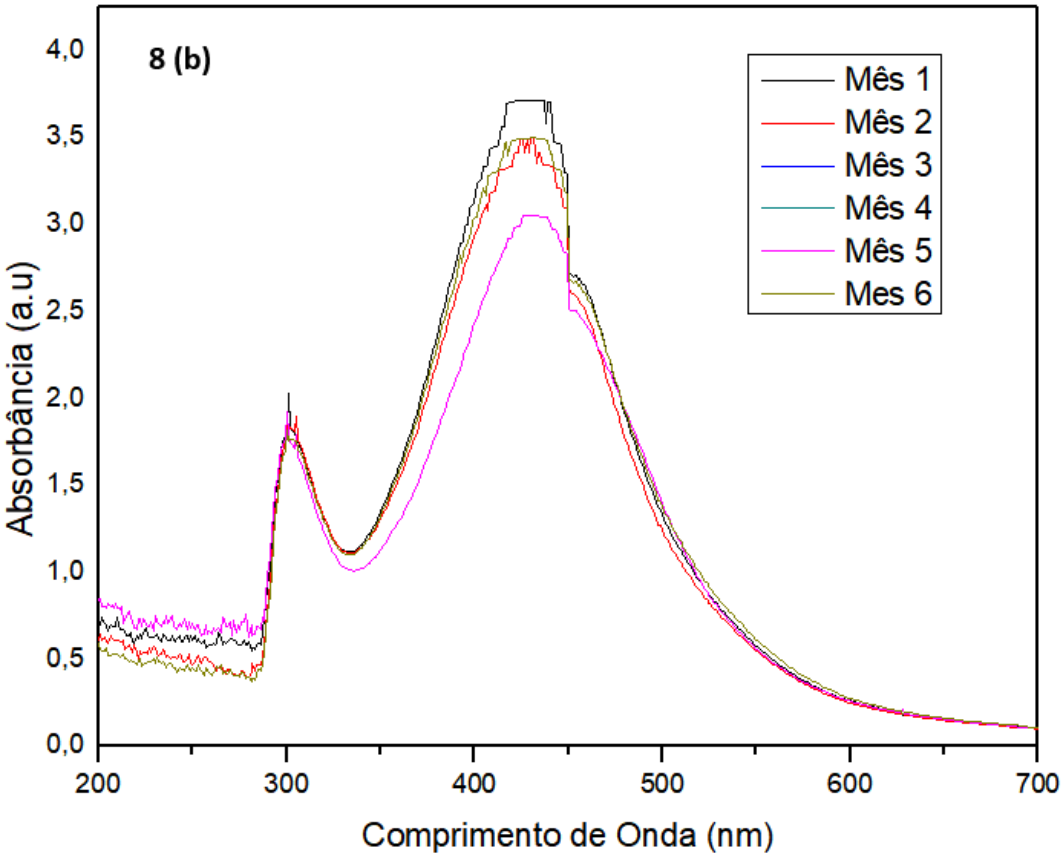
Esses dados estão em acordo com dados encontrados na literatura, como em Mahapatra et al., (2007), Murugadoss e Chattopadhyay (2008), onde o mesmo perfil de espectros de UV-vis das nanopartículas de prata foi observado, de modo que foram observados nesses estudos bandas de absorção em 442 nm e entre 410-471 nm, respectivamente. Dessa forma, esse resultado é indicativo de que o experimento realizado em dias diferentes apresenta resultados iguais, demonstrando que o método adotado para obtenção das NPsAg é reprodutível.

As nanopartículas de prata, obtidas via rota verde, podem apresentar um período de validade curto, que de acordo com alguns trabalhos, a sua degradação é iniciada após dois meses da síntese (LANGENBACH; LANGENBACH, 2013; MURUGADOSS; CHATTOPADHYAY, 2008; VAN HYNING; KLEMPERER; ZUKOSKI, 2001). Dessa

forma, para verificar o período de degradação das nanopartículas realizou-se um ensaio de "tempo de prateleira" (*Shelf time*), o qual consiste em observar o período em que as NPsAg permaneceram íntegras, realizando análise por meio de UV-vis. Dessa maneira, verifica-se os espectros resultantes das análises feitas pelo UV-vis, de modo que na Figura 8 (a) as três sínteses das NPsAg, sendo que em Rep 1, Rep 2 e Rep 3, são respectivamente, a primeira, segunda e terceira reprodução desse método. Enquanto da Figura 8 (b) é observado o tempo de degradação das NPsAg durante 6 meses, nota-se que as nanopartículas apresentaram os mesmos espectros, indicando que não houve degradação das mesmas.

Figura 8 – A absorbância em função do comprimento de onda, para as 3 sínteses. Na 8b, absorbância nos diferentes tempos





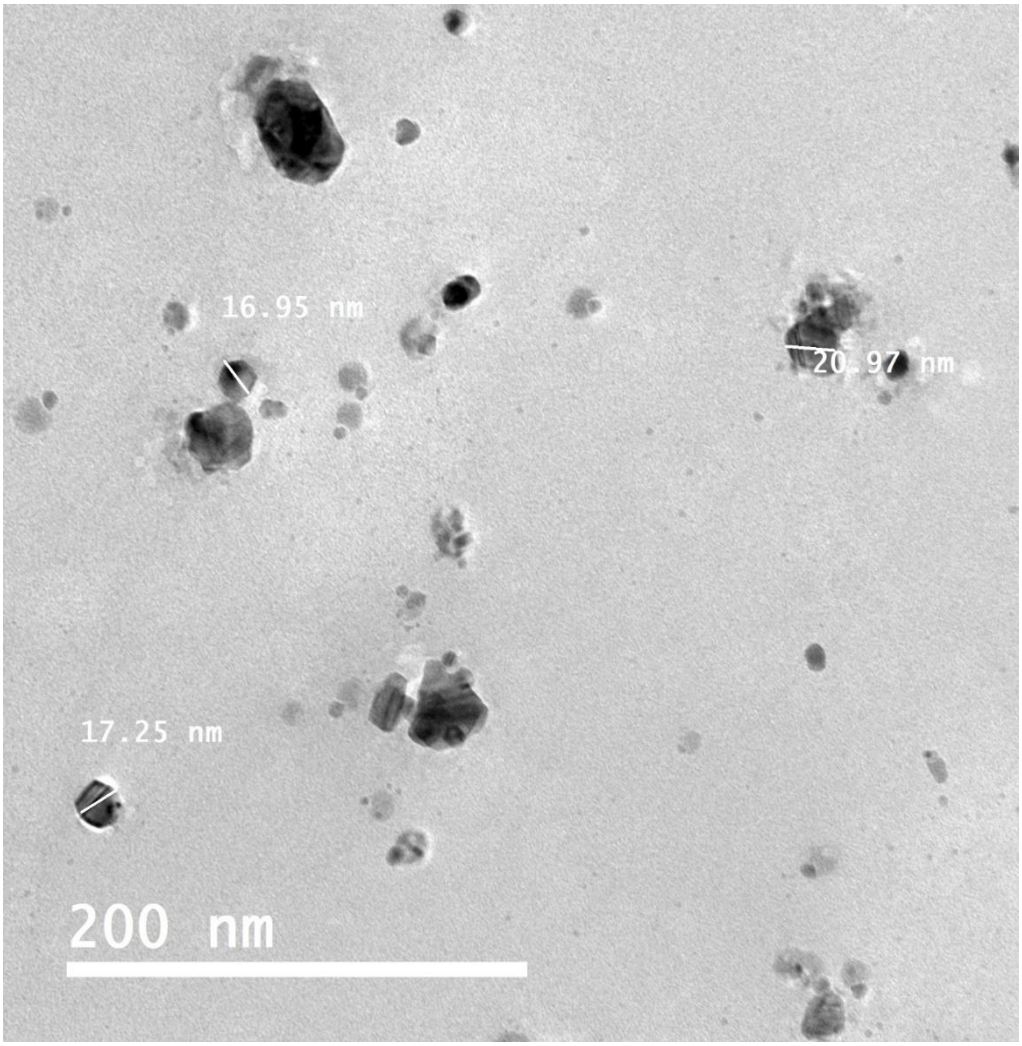
Fonte – Autoria própria

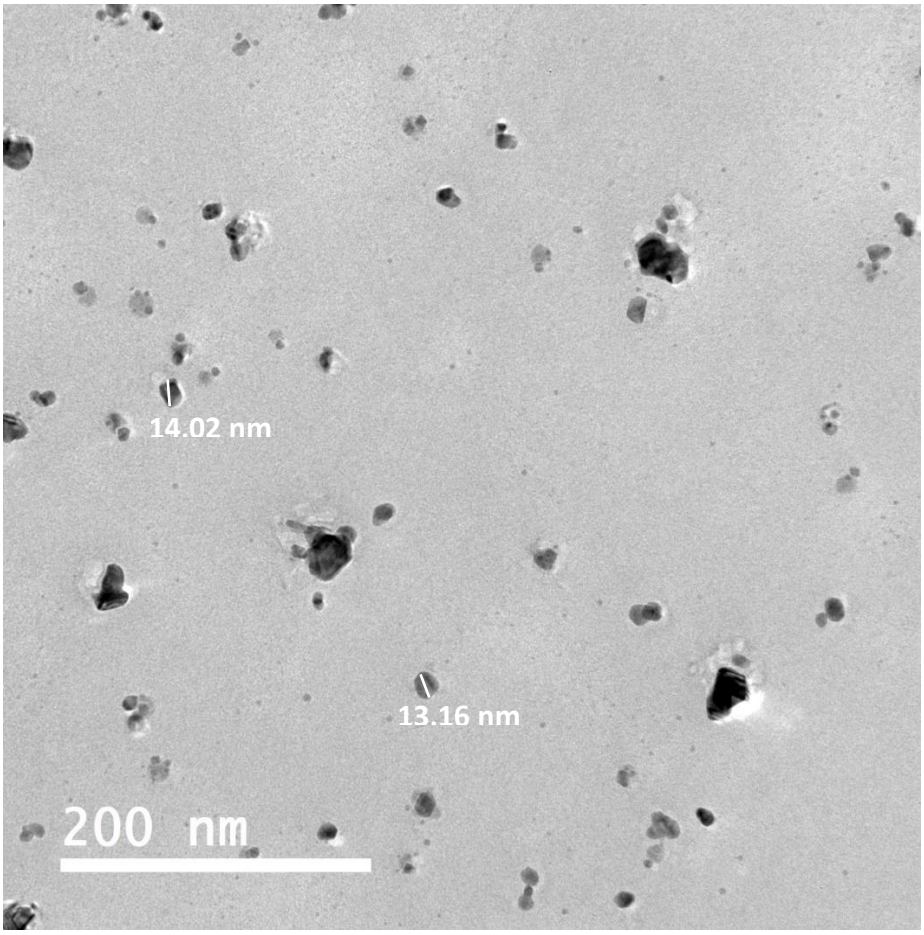
Além dessas características, é observado na Figura 9, as micrografias das NPsAg, obtidas mediante microscopia eletrônica de transmissão. Dessa maneira verificou-se a morfologia, com formação de nanopartículas com diferentes tamanhos, de formas arredondadas, além da formação de agregados. Na figura 9 é possível observar que as nanopartículas apresentam tamanhos diferentes, tais como 13,16 nm; 14,02 nm; 16,9 nm; 20,97 nm e 17,25 nm.

A quitosana desempenha as funções de agente redutor e estabilizante, por sua alta capacidade de adsorção de íons metálicos como Ag+ (WEI et al., 2009). Esse comportamento é explicado em decorrência da presença dos grupos amino e hidroxila presentes em sua cadeia polimérica, tornando-a um agente quelante para íons de prata, de maneira que os elétrons de nitrogênio, dos grupos amino da quitosana, atuam como ligantes ou sítios de ligação para íons metálicos (THOMAS; YALLAPU; SREEDHAR, 2012). Salienta- se que a síntese das nanopartículas foi realizada à ± 90°C, pois a quitosana é considerada um agente redutor brando e para que ela seja ativada como doadora de elétrons

para a redução da prata, se faz necessário o aumento de temperatura (KIM et al., 2005; WEI et al., 2008).

Figura 9 – Imagens da análise realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão





Fonte - Autoria própria

Através de absorção UV-Vis, foi observado uma forte banda em exatamente 427 nm, referente às NPsAg. Ressalva-se que foram encontrados resultados semelhantes, como por exemplo, no trabalho de Murugadoss e Chattopadhyay (2008), verificaram por meio de UV-Vis, bandas de absorção na faixa de 410-417 nm referente das NPsAg, assim como Wei e Qian (2007) que sintetizou NPsAg por meio de quitosana, registrou um pico em 420 nm.

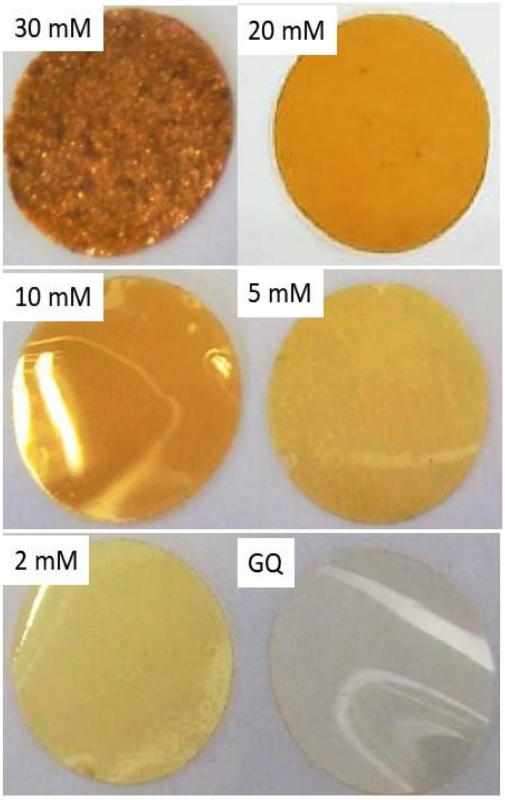
Portanto, como confirmado pelo UV-vis e pelas imagens do MET, a quitosana atuou como agente redutor da Ag, pela ação dos grupos CH_2OH (HUANG et al., 2018), assim como agente estabilizante, dificultando a agregação das nanopartículas, por meio de interações estericas, que impedem que as partículas se atraiam e formem muitos agregados (MURUGADOSS; CHATTOPADHYAY, 2008; WEI et al., 2009).

5.2 Membranas de gelatina/quitosana com NPsAg

As membranas controle (gelatina e quitosana) e as obtidas com as 5 concentrações diferentes de NPsAg (30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM e 2 mM) estão apresentadas na Figura 10. Observa-se diferença na coloração, quanto maior for a concentração de NPsAg, a membrana apresentará uma cor amarela mais intensa. Ressalva-se que a solução de NPsAg, exibe uma cor de cobre claro (Figura 7), assim, as membranas produzidas com elas, apresentam a coloração próxima da solução de nanopartículas, como observado na Figura 10.

Logo, é conferida à membrana de 30 mM uma cor amarela intensa, enquanto a membrana de 20 mM apresenta-se com amarelo mais escuro, em seguida verifica-se que as membranas de 10 e 5 mM, apresentam cor amarela claro. Por fim, a membrana de menor concentração de NPsAg contém um tom de amarelo muito claro, e a membrana GQ não é constatado esse padrão, por não possuir NPsAg em sua composição.

Figura 10 – Imagens fotográficas das membranas dispostas na seguinte ordem: 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM e GQ



Fonte - Autoria própria

Além da diferença de coloração, foi observada uma diferença no manuseio das membranas, sendo que a de 30 mM é menos maleável que as demais, de modo que ao dobra-la com as mãos, a mesma se parte, assim como, a mesma membrana também apresenta o maior valor médio de espessura, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Espessura das membranas, medidas por meio de um micrometro. Considerando que cada valor das espessuras são as médias de suas triplicatas

Membranas	Espessura Média (mm)	Desvio padrão
30 mM	0,111	0,0090
20 mM	0,083	0,0059
10 mM	0,076	0,0199
5 mM	0,075	0,0200
2 mM	0,078	0,0127
QG	0,063	0,0050

Fonte - Autoria própria

A união entre dois polímeros ou mais, por meio da mistura física de materiais distintos, possui uma ampla aplicabilidade na área de biomateriais, pois mediante esta abordagem podem ser adquiridos dispositivos com características físico-químicas, mecânicas e biológicas melhores ao serem comparadas com os compostos isolados (HEATH; COOPER, 2013; SIONKOWSKA, 2004). Assim, como já mencionado anteriormente, a quitosana é um biopolímero capaz de se obter membranas e filmes apropriados para tratamento de ferimentos de pele, todavia, apresenta uma resistência mecânica baixa e pouca capacidade de absorção de fluidos corpóreos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Dessa forma, a combinação desse biopolímero com outro, como a gelatina, pode melhorar as características citadas anteriormente, de modo que blendas de gelatina com quitosana apresentam uma melhor afinidade com as células, e resultam em um material mais elástico e macio, comparando a quitosana isolada, além de propiciar uma melhor absorção de água e permeabilidade ao oxigênio, (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; RAHMAN, et al., 2013; YAUN; WEI, 2004).

Além disso, constatou-se pela literatura que ao adicionar NPsAg em filmes poliméricos, pode ocasionar aumento da resistência mecânica, podendo inferir na alteração da

maleabilidade em decorrência da ocupação de espaços na matriz do polímero pelas nanopartículas, onde deveria ser preenchido pelas cadeias poliméricas (MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012).

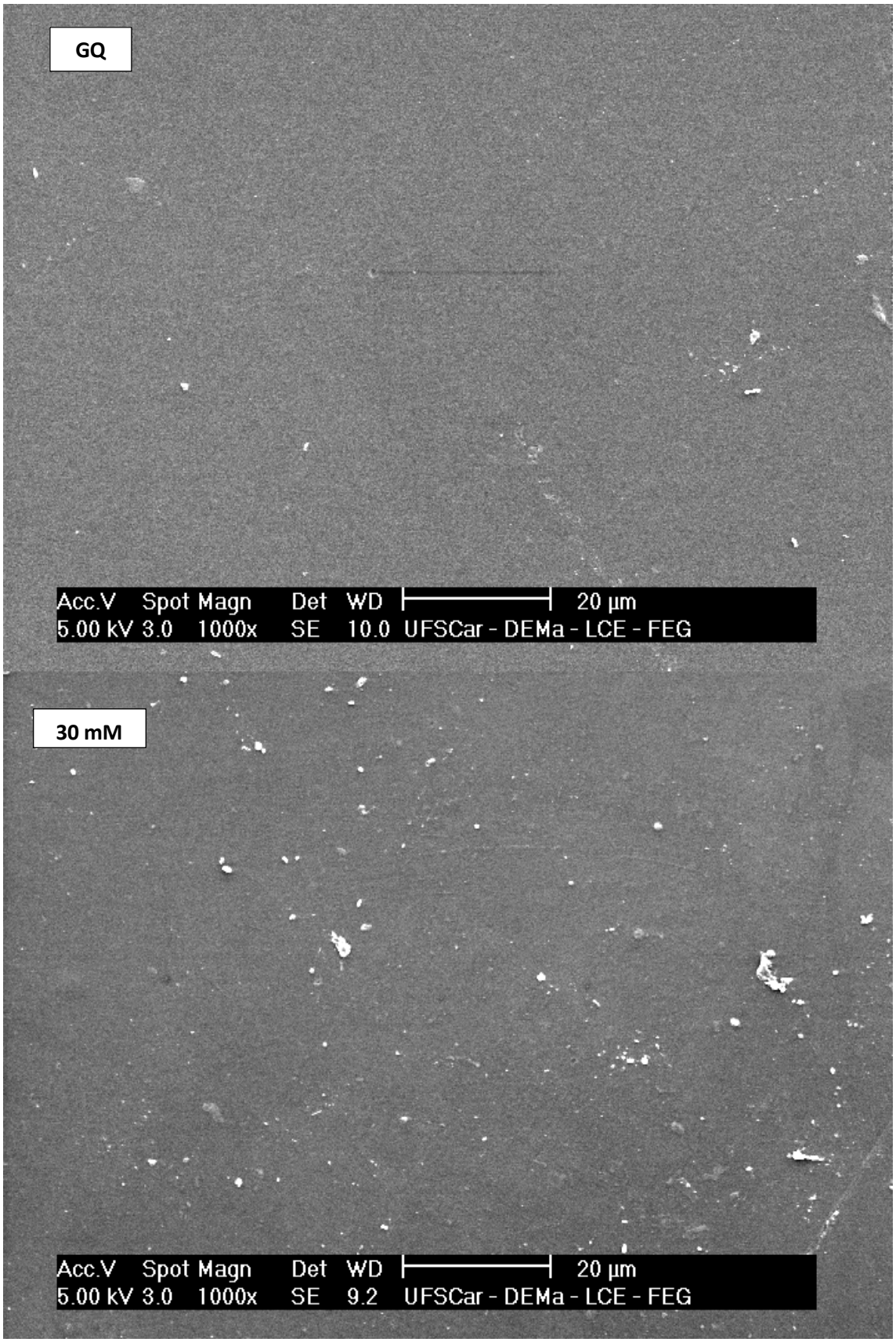
5.3 Caracterização das membranas

5.3.1 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura permite observar as membranas por meio da incidência de um feixe de elétrons que se espalha na amostra, os quais são refletidos formando uma imagem que corresponde à superfície da amostra. Dessa forma, as fotomicrografias das membranas com e sem NPsAg, apresentadas na Figura 11, referem-se as membranas controle GQ e a de maior concentração de NPsAg de 30 mM. Foi escolhida apenas a de maior concentração para mostrar a morfologia superficial, pois todas apresentaram uma superfície rugosa com ausência de poros, independente da presença e da concentração de nanopartículas.

Como observado na Figura 11, as membranas apresentam morfologia típica de membranas densas, ou seja, não há presença de poros nas amostras. A diferença das membranas densas com as porosas está relacionada como o modo de preparo das amostras, sendo que nas membranas porosas são adicionados reagentes como polímeros inertes e micropartículas de sílicas rígidas, durante a formação das membranas (GUMUSDERELIOGLU, AGI, 2004; ZEM, RUCKENSTEIN, 1996; ZEM, FANG, XU, 2004). As membranas porosas apesar de permitirem trocas gasosas com o ambiente maior que as densas, devido a sua estrutura coberta de poros, a qual também podem permitir que microrganismo á ultrapassem, assim como são capazes de se romperem com mais facilidade que as membranas densas. Contudo, esses aspectos são alterados conforme a espessura e do material que compõem a membranas, tanto das membranas porosas quanto das densas (CLASEN, WILHEELMS, KULICKE, 2006).

Figura 11– As fotomicrografias das membranas GQ de 30 mM. Aumento de 1000x.



Fonte - Autoria própria

Logo é verificado que essas membranas, apresentam uma superfície uniforme e mais próximas da gelatina, de modo que a rugosidade é atribuída a quitosana, assim como observado na Figura 11. Salienta-se ainda que, as nanopartículas foram incorporadas na matriz polimérica, conforme demonstra a Figura 12, analisada por meio de MEV com detector de energia dispersiva (EDS).

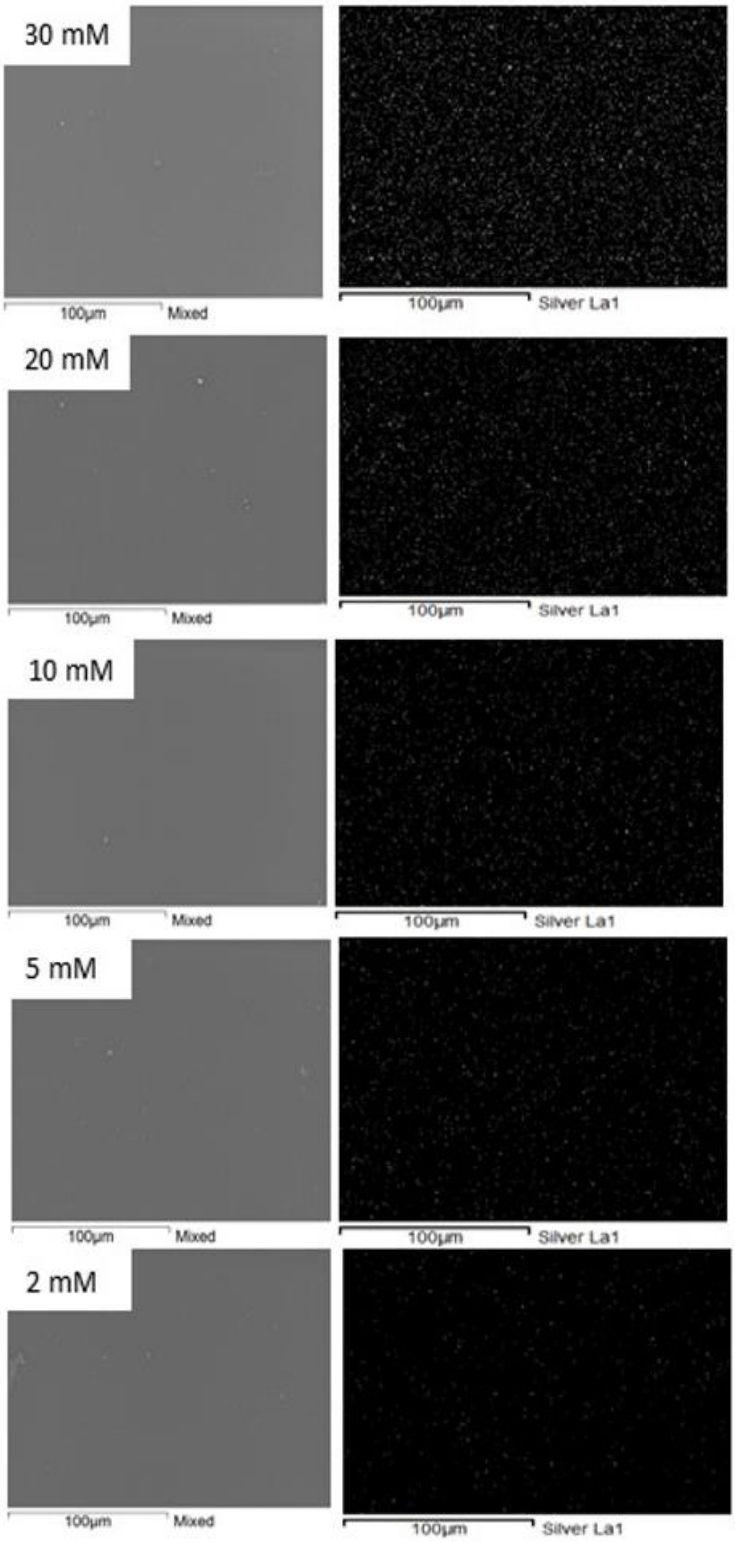
Dessa forma, conforme pode- se observar nas imagens da Figura 12, a distribuição de prata (destacada como pontos brancos) está de acordo com a sua concentração, de maneira que na membrana de 30 mM, é possível observar maior quantidade desse elemento presente na área detectada pelo MEV-EDS. Contudo, de acordo com o anexo 1, onde verifica-se os espectros do MEV-EDS, nas concentrações menores (5 mM e 2 mM), em que apesar de detectar a presença de prata, não houve a formação do seu pico, como nos demais espectros, indicando uma pequena quantidade de prata nas amostras e que não foi detectável pela técnica. Além de que, por meio dessa análise, foi possível quantificar por porcentagem relativa de prata presente nas membranas, em comparação com outros elementos químicos presentes nas amostras, como observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise quantitativa das membranas em relação a distribuição de prata, por meio da análise dos espectros de MEV-EDS demonstrados no anexo 1

Membranas	Massa (%)
30 mM	4,24
20 mM	2,27
10 mM	1,93
5 mM	0,48
2 mM	0,28

Fonte - Autoria própria

Figura 12 – Micrografia por MEV com EDS das membranas com NPsAg de 30 mM, de 10 mM de NPsAg, de 5 mM de NPsAg, e com 2 mM de NPsAg



Fonte - Autoria própria

Ressalva-se que a porcentagem de átomos de carbono é predominante em todas as membranas, especificamente mais de 60% em sua composição, devido por ser um dispositivo feito de biopolímeros, o qual apresenta muito átomos de carbono em sua composição, assim como as NPsAg, as quais estão sintetizadas pelo mesmo biopolímero. Diante desse fato, a porcentagem de prata será baixa comparada com os átomos predominantes que constituem as membranas. Dessa forma, foi possível constatar que as nanopartículas de fato estão presentes nas membranas, além de estar uniformemente distribuídas nas áreas detectadas pelo EDS.

Portanto, através dos resultados obtidos pelo MEV, verifica-se que as blendas de gelatina/quitosana apresentam uniformidade em sua morfologia, assim como nas membranas com NPsAg, é confirmado constatar a presença de prata em sua estrutura.

5.3.2 Caracterização por difração de raios X (DRX) e espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR)

5.3.2.1 Caracterização por difração de raios X (DRX)

A difração de raios X é um evento de espalhamento da radiação eletromagnética, criada pela relação entre o feixe de raios X incidente com os elétrons dos átomos que compõem o material analisado. Assim, essa técnica é utilizada a fim de se colher dados estruturais sobre a cristalinidade de uma amostra. A aplicação primordial do DRX, está na detecção de compostos cristalinos, tanto orgânicos quanto inorgânicos (LEMPESIS; VELD; RUTLEDGE, 2016).

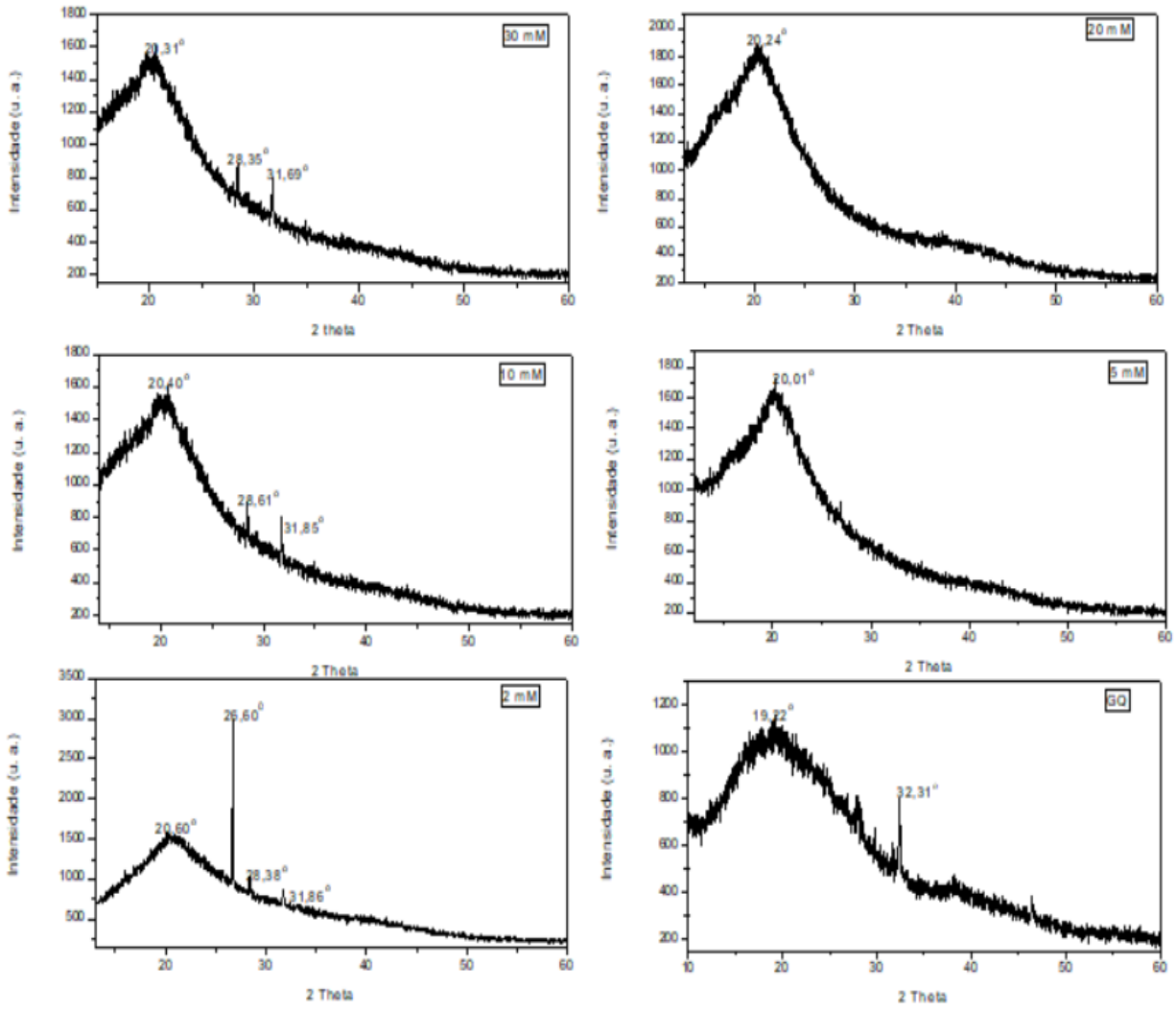
Os espectros de DRX das membranas GQ e GQAg são apresentados na Figura 13, onde é possível notar a característica amorfa predominante nas membranas, típicos de compostos poliméricos.

Mediante essas análises, verifica-se uma mudança nos espectros das membranas incorporadas com as nanopartículas, observa-se que para a maior concentração ocorre um aumento da intensidade das bandas de absorção em torno de $2\theta = 20^{o}$, $2\theta = 26^{o}$ $2\theta=28$, que são característicos de blendas de gelatina/quitosana (BREDA et al., 2017). Além de que, a adição de NPsAg nas membranas ocasionaram aumento da cristalinidade, devido ao aumento de formação de bandas de absorção e de sua intensidade, ao comparar com a membrana GQ (ARAUJO et al., 2017; LAVORGNA, 2010). Com relação as bandas de absorção em torno de $2\theta=30^{o}$ observados, pode-se inferir que não está envolvido com as NPsAg, devido que a

membrana GQ também apresenta este pico. Dessa forma, podem ser relacionados ao plano de difração dos cristais hidratados da quitosana, devido ao procedimento de preparo das membranas, isto é, com a dissolução da quitosana na solução de ácido acético (PEREDA et al., 2011).

Todavia, o pico referente à prata em torno de 2θ = 38 º não foi detectado, devido a sua baixa concentração relativa, ao comparar com a quantidade de cadeias poliméricas que as cercam, como confirmado nos resultados do MEV-EDS, visto no ANEXO 1 e na Tabela 2, (DAIRI et al., 2019; GHORBANI; LASHKENARI; EISAZADEH, 2011), sugerindo que as nanopartículas foram aderidas a estrutura das membranas (NAGAHAMA et al., 2009).

Figura 13 - Resultados obtidos por meio Difração de Raios X das membranas com 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM e 2 mM de NPsAg e da membrana GQ



Fonte - Autoria própria

Os biopolímeros são compostos com perfil, principalmente, amorfo, ou seja, não há aspectos de bandas de absorção cristalinas definidas. Entretanto, há a presença de bandas de absorção, que sugere uma organização intermediária (QI et al.; 2004). Nas membranas estudadas, a inclusão das NPsAg provocou pequenas mudanças na estrutura das cadeias poliméricas.

Portanto, é possível observar o perfil polimórfico tanto na amostra GQ quanto nas amostras com NPsAg, e que o aumento do perfil cristalino para as membranas GQAg, é influenciada pela incorporação das nanopartículas na matriz polimérica.

5.3.2.2 Caracterização por espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV – ATR)

A análise de IV- ATR, foi usada para avaliar o perfil dos compostos das amostras, obtendo informações das estruturas em relação as bandas dos agrupamentos moleculares, além dos grupos atômicos que constituem as membranas. Por meio do IV-ATR, foi possível obter informações sobre as ligações químicas e os níveis vibracionais das moléculas.,

Através dos resultados do IV- ATR, observa-se na figura 14, as bandas mais intensas são: 3295 cm^{-1}, 3046 cm^{-1}, 1625 e 1540 cm^{-1} e em 1237 cm^{-1}, referentes a gelatina. Enquanto os espectros referentes da quitosana foram encontradas bandas mais intensas em: 3322 cm^{-1}, 2893 cm^{-1}, 1634-1551 cm^{-1}, 1392-1308 cm^{-1} e 1149-1024 cm^{-1}.

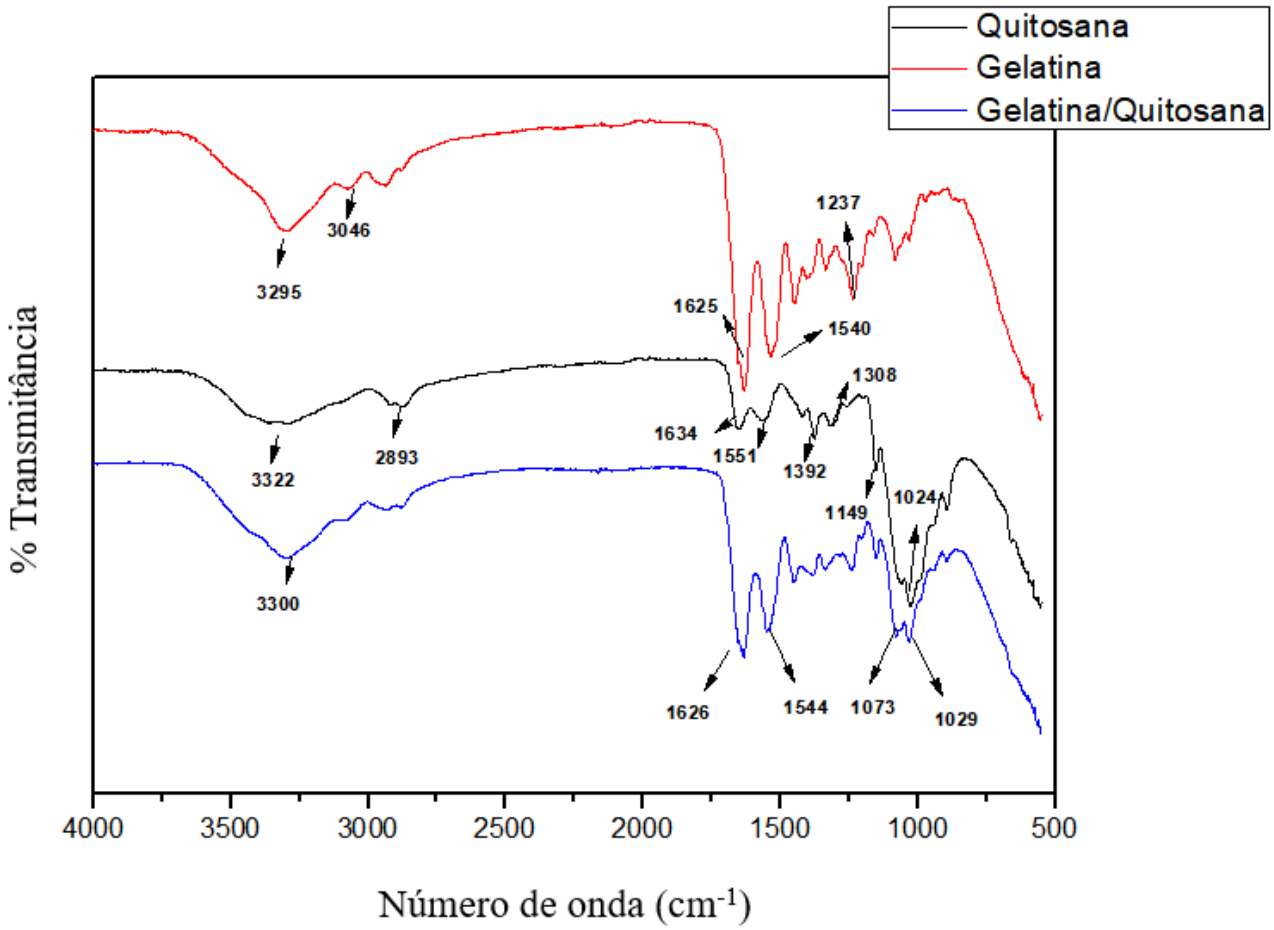
Dessa forma, em relação ao espectro da gelatina, a banda 3295 cm^{-1} é referente a vibração de estiramento dos átomos de N-H presente no grupo amida I, seguida pela banda 3046 cm^{-1} que indica as ligações de hidrogênio formada entre N-H. Na banda dupla 1625 - 1540 cm^{-1}, está associada com a vibração de estiramento em C-N e N-H, localizados nos grupos amidas II. Por fim, a banda 1237 cm^{-1}, remete a amida III pelo estiramento de C-N e a vibração de N-H (DOYLE; BENDIT; BLOUT, 1975; PRESTES et al., 2013).

Da mesma maneira, com relação as bandas da quitosana, é identificado em 3322 cm^{-1} os estiramentos axiais dos grupos -OH e -NH, e na banda menos intensa a 2893 cm^{-1} é referente as deformações axiais C-H, pertencentes aos grupos glicosaminas CH_2 e CH_3. Em seguida se encontra a banda dupla 1634-1551 cm^{-1}, sendo assimilada com a posição dos grupos aminos I e II. A segunda pequena banda dupla, 1392-1308 cm^{-1} corresponde as vibrações angulares de CH_2 e C-C, dos grupos CH_3 da cadeia polimérica da quitosana. Por fim nos espectros 1149-1024 cm^{-1}, são referentes as vibrações axiais dos átomos C-O-C

pertencentes aos grupos das glicosaminas (CHAE; SHIN; SHIN, 2018; FARHADIAN et al., 2018).

Logo, nota-se na Figura 14, que os espectros dos dois materiais são semelhantes, sendo que se distinguem pela intensidade das bandas, de modo que no espectro da gelatina, possuem uma porcentagem de transmitância maior (intensidade maior) do que as da quitosana, exceto em 1024 cm^{-1}, sendo esta mais intensa na quitosana, atribuída a sua estrutura formada pelos grupos glicosaminas (MOURA et al., 2007).

Figura 14 – Espectros obtidos por Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada (IV-ATR) da gelatina, quitosana e da blenda GQ

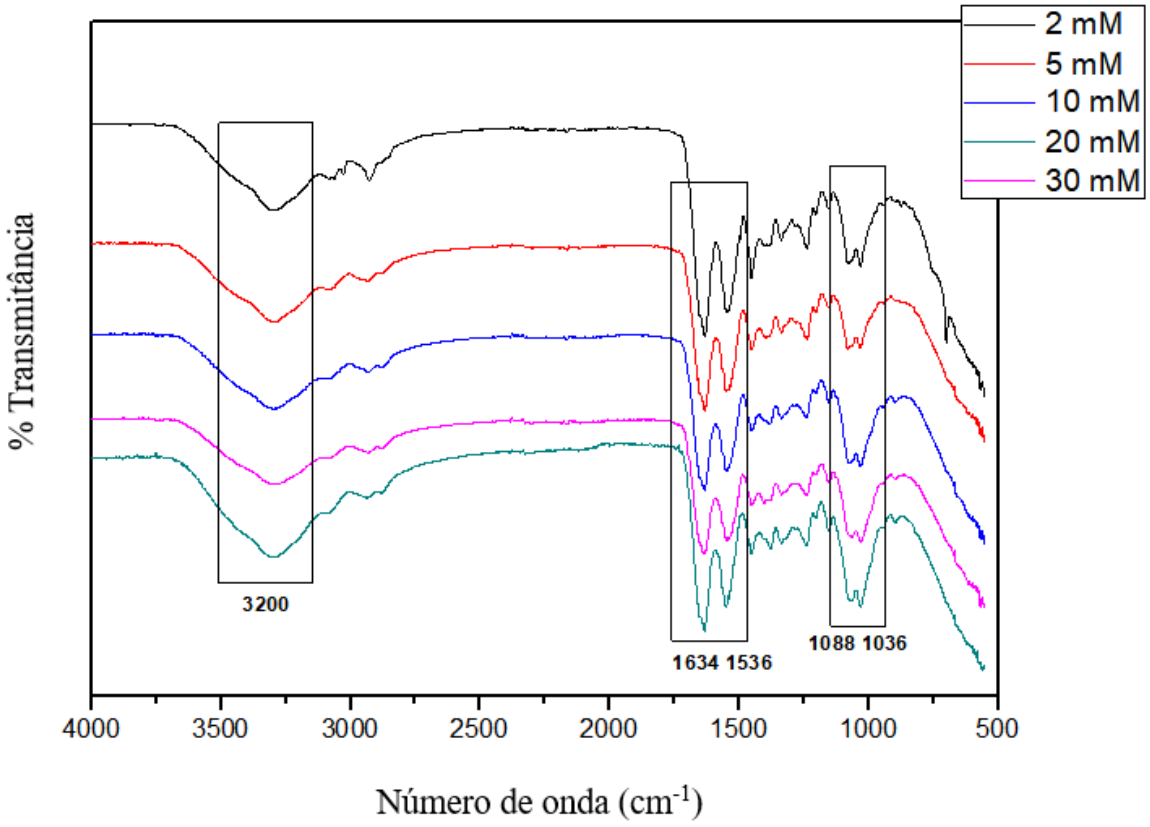


Fonte - Autoria própria

Em relação as membranas com NPsAg, foram realizadas as análises de IV-ATR que estão apresentados na Figura 15. Verifica-se nas membranas com NPsAg que apesar de ocorrer uma pequena mudança em todas as bandas, como por exemplo, no espectro da gelatina, a banda 3295 cm^{-1} foi deslocada para 3300 cm^{-1}, todas as amostras obtiveram o

mesmo perfil, independente da concentração de nanopartículas mantendo a semelhança com o espectro da gelatina.

Figura 15 - Espectros obtidos por Espectroscopia no infravermelho com reflexão atenuada das membranas com NPsAg



Fonte - Autoria própria

Diante disso, as membranas com NPsAg se assemelharam com o perfil do IV-ATR da gelatina e da quitosana isolados, pode ser afirmado que as NPsAg adicionadas nas amostras, não mudaram a estrutura das membranas. Portanto, como verificado nos resultados do MEV-EDS, onde foi detectado a presença da prata, mas sem a alteração superficial morfológica, é possível inferir que as nanopartículas estão dispersas nas membranas sem interação com os polímeros, ou que a concentração adicionada está abaixo da concentração de detecção da técnica de IV-ATR (SIONKOWSKA et al., 2004).

5.4 Ensaios de intumescimento e permeação ao vapor de água

5.4.1 Ensaio de intumescimento

A hidratação dos ferimentos é o fator mais importante durante o seu tratamento, de modo que quando a ferida está em um ambiente úmido, acelera a sua cura. Com isso, ao comparar a cicatrização de um ferimento úmido com um seco, verifica-se que com a aplicação de uma cobertura úmida no local, proverá uma proteção do ambiente externo, removerá os restos teciduais, doara fluidos para a lesão, promovendo umidade no local, acarretando na estimulação de células epiteliais. Enquanto nas feridas secas, ou sem cobertura úmida, terão excesso de proteases, as quais retardam a epitelização local, assim como estão mais susceptíveis as infecções bacterianas (OUSEY et al., 2016).

Com isso, desenvolver uma membrana com a habilidade de manter-se úmida, assim como absorver fluidos, é importante para promover uma melhor cicatrização, sobretudo, quando aplicada em feridas secas ou com pouco exsudatos.

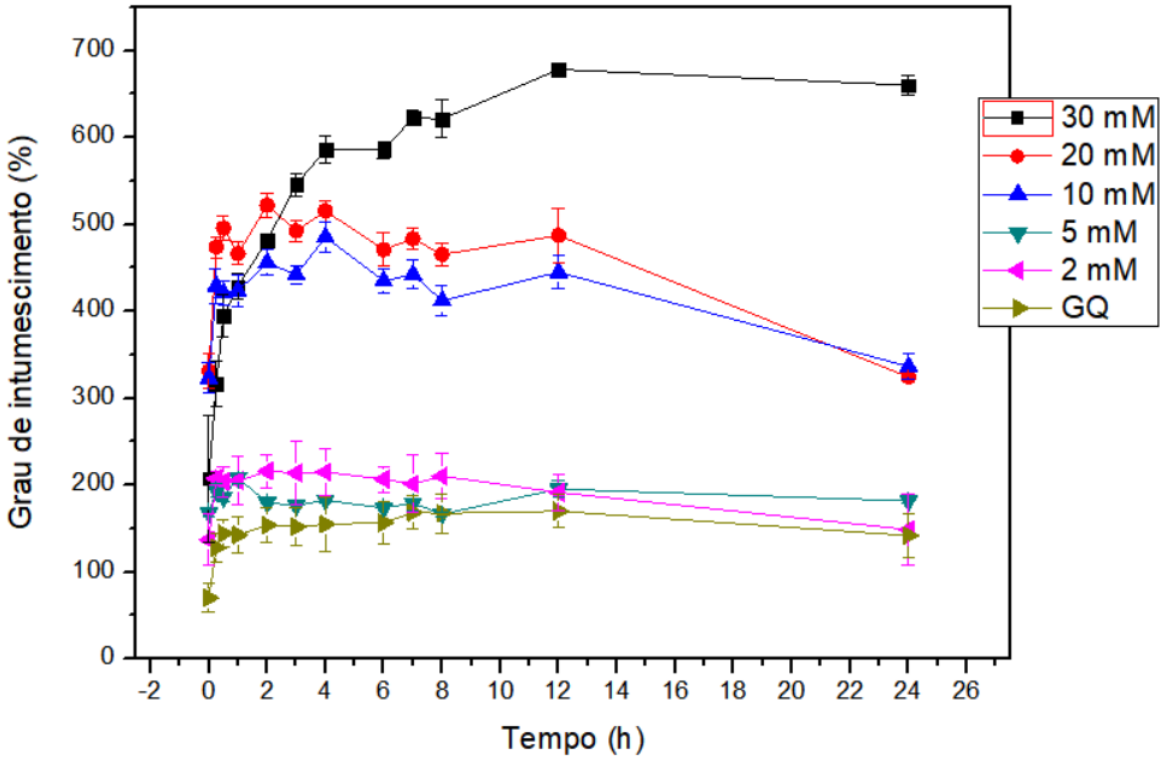
Através do ensaio de intumescimento, pode verificar a capacidade de hidratação das membranas. Assim, como observado na Figura 16, todas as membranas intumesceram, de maneira que as membranas com maiores concentrações de NPsAg (30 mM, 20 mM e de 10 mM), apresentaram maior grau de hidratação, ao serem comparadas com as membranas de menores concentrações (5 mM e de 2 mM) e com a membrana controle GQ.

Dessa forma, nota-se que o comportamento das membranas de 30 mM, 20 mM e de 10 mM mantiveram valores de intumescimento próximos por um período de até 2 horas de imersão. Ressalva-se que após esse tempo a membrana de 30 mM, continuou absorvendo a solução tampão, mantendo um nível elevado de intumescimento até 24 horas. Todavia, as membranas de 20 mM e de 10 mM, após 2 horas de imersão, mantiveram-se na faixa de intumescimento de 400-500% até 12 horas de ensaio, visto que com 24 horas houve queda da massa para 350%, essa queda esta relacionado com a perda do material para o tampão. Ressalve que as amostras permaneceram por 24 horas em estufa a 37ºC, assim esta perda de massa está envolvida principalmente a redução da massa da gelatina, a qual dissolve-se em água, com temperatura em torno de 40ºC.

Do mesmo modo, observa-se a semelhança dos graus de intumescimento das membranas de 5 mM, 2 mM e a membrana controle GQ. Essas membranas absorveram uma menor quantidade de solução tampão, comparadas com as três primeiras citadas, de maneira

que após 1 hora de imersão, é observado que a absorção da solução foi mantida na faixa de 150-200% até 24 horas de análise.

Figura 16 – Ensaio de intumescimento das membranas GQ 30 mM de NPsAg (30 mM), GQ com 10 mM de NPsAg (10 mM), GQ com 5 mM de NPsAg (5 mM) e GQ com 2 mM de NPsAg (2 mM)



Fonte - Autoria própria

Mediante a esses resultados, ao comparar essas membranas com blendas poliméricas, principalmente as que contém quitosana e gelatina, são encontrados relatos sobre a alta capacidade de hidratação desses biomateriais (FAN et al., 2016; KIM et al., 2005; NAGAHAMA et al., 2009; PETER et al., 2010). Inclusive, é verificado que todas as membranas seguem o padrão observados nas pesquisas, apresentando uma faixa de hidratação entre 100% a 600% (KIM et al., 2005). Assim como no estudo de Fan et a. (2016), obtiveram altas taxas de intumescimento com hidrogéis de blendas de gelatina/quitosana, atribuindo esse resultado as macromoléculas da quitosana, as quais facilitam a expansão das cadeias que formam a matriz do hidrogel. Além de Nagahama et al. (2009), o qual verificou alta taxa de

intumescimentos em membranas de gelatina/quitosana, devido as ligações de hidrogênio formado entre esses compostos.

No estudo de Kanmani e Rhim (2014) o qual por meio de um filme de gelatina com NPsAg, observou que a adição das nanopartículas nos filmes de gelatina, causou a redução das interações entre as cadeias poliméricas, resultando no aumento da disponibilidade de grupos hidroxilas livres, facilitando a absorção de água. Do mesmo modo, Yoksan e Chirachanchai (2010) verificou que nas matrizes de quitosana com NPsAg, a penetração da água é mais acessível, em virtude da redução das interações poliméricas que ocorrem na matriz.

Dessa forma, acredita-se que a adição de maiores concentrações de NPsAg facilitou a penetração da solução tampão fosfato nas membranas, provavelmente por estarem dispersas nas matrizes, interferiram nas ligações entre as redes poliméricas, tanto da gelatina quanto com da quitosana. Esse resultado corrobora com dados encontrados na literatura indicando que se ocorrer o rompimento das ligações de hidrogênio entre as cadeias que formam a matriz, ocorrerá um aumento dos espaços na cadeia polimérica e que isso pode possibilitar ainda mais a entrada de solução e neste caso aumentando a saída de fármacos aprisionados nela (BAJPAI et al., 2008; COLOMBO et al., 1996; KIM et al., 2005; MCDONNELL et al., 2016).

5.4.2 Permeação a vapor de água (PVA)

Como mencionado anteriormente, a presença dos exsudatos nas feridas pode melhorar os processos cicatriciais, além de que se o ferimento estiver desprotegido poderá ocasionar o ressecamento da ferida, prejudicando o processo de cicatrização (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Dessa forma, uma cobertura ideal deverá ser úmida ou manter a umidade local e, promover trocas gasosas com o ambiente para evitar que ocorra uma impermeabilização do local lesionado. Considerando que, a impermeabilização da lesão, dificulta a difusão do vapor de água, resultando em um depósito de fluidos no ferimento, que poderá ocasionar a dilaceração tecidual (XU et al., 2016). Portanto, o ensaio de permeação a vapor de água é importante para se verificar a capacidade da membrana de efetuar trocas gasosas.

O experimento foi conduzido para obter-se a taxa de permeação ao vapor de água das membranas, por meio da avaliação do ganho de massa da sílica condicionada nas “panelinhas”. A sílica estava isolada do meio externo através das membranas, deste modo, toda umidade absorvida pela sílica, chegou até ela atravessando a membrana. Para a análise

foi considerado parâmetros como o ganho de massa, espessura, área da membrana e a pressão, recolhendo os dados diariamente durante 5 dias.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos do ensaio PVA de todas as membranas. Os resultados estão apresentados em duas colunas com seus respectivos desvios padrão: na primeira coluna são apresentados os valores onde foram considerados todos os parâmetros do experimento, enquanto a segunda coluna, apresenta os resultados mediante uma análise geral, mais comumente encontrada na literatura onde apenas são relacionados a diferença de massa por dia sobre a área de permeação (ANIRUDHAN, 2018; BEHAR et al., 1986; MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012; XU et al., 2016).

Tabela 3 – Valores do ensaio de Permeabilidade ao vapor de água das membranas

Amostra (mM)	**PVA (g mm/m^2 dia kPa)**	**Desvio padrão**	**PVA (g /m^2 dia)**	**Desvio padrão**
30	41,07	0,29	1011,58	13,40
20	30,25	2,11	958,42	17,86
10	24,46	6,46	1001,05	1,12
5	23,26	5,37	983,16	27,91
2	27,14	1,40	1008,95	21,21
QS	27,99	3,39	892,63	2,23

Fonte – autoria própria

Dessa forma, verifica-se que a membranas com maior concentração de NPsAg, apresentaram uma maior taxa de permeação, especificamente com 41,07g mm/m^2 dia kPa, enquanto as demais amostras obtiveram taxas muito semelhantes, de modo que não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) pelo método estatístico Tukey.

Além disso, lembrando que a membrana de 30 mM, apresentou a maior espessura, como visto na Tabela 1, e esse parâmetro é diretamente proporcional a taxa de PVA. Pode-se inferir que, essa membrana terá mais “espaços vazios” na cadeia polimérica que as outras, em decorrência da concentração de NPsAg resultando em uma taxa de PVA maior, visto que a difusão do vapor de água ocorrera com mais facilidade, como também apresentou a maior taxa de intumescimento, devido ao rompimento das ligações de hidrogênio formada entre a

quitosana e gelatina em um ambiente úmido (ANIRUDHAN, 2018; MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012; RHIM et al., 2014).

Para definir em quais feridas as membranas poderão ser aplicadas, deve-se considerar a taxa normal de PVA da pele, a qual se encontra na faixa de 240 g/m^2 dia, contudo essa taxa de permeação muda quando a pele está lesionada, variando de 3400 a 5200 g/m^2 dia (BEHAR et al., 1986).

Logo, com os valores de taxas de permeabilidade obtidos neste trabalho, pode indicar a aplicação dessas membranas em feridas com muito exsudatos, de modo que elas permitiriam a troca de vapor de água adequada com o meio externo (WANG et al., 2002). Além das feridas com poucos exsudatos, desde que aplicadas sob o ferimento umedecidas.

Assim sendo, considerando que as membranas possuem alta capacidade de intumescer e de PVA, ocasionara controle nos exsudatos das feridas, de modo que absorveriam esses fluidos, permitindo também, as trocas de gases entre o meio externo e a lesão; por meio do intumescimento das cadeias poliméricas liberando o conteúdo de NPsAg no local, auxiliando no processo cicatricial da lesão (BEHAR et al., 1986; RHIM et al., 2014; WANG et al., 2002).

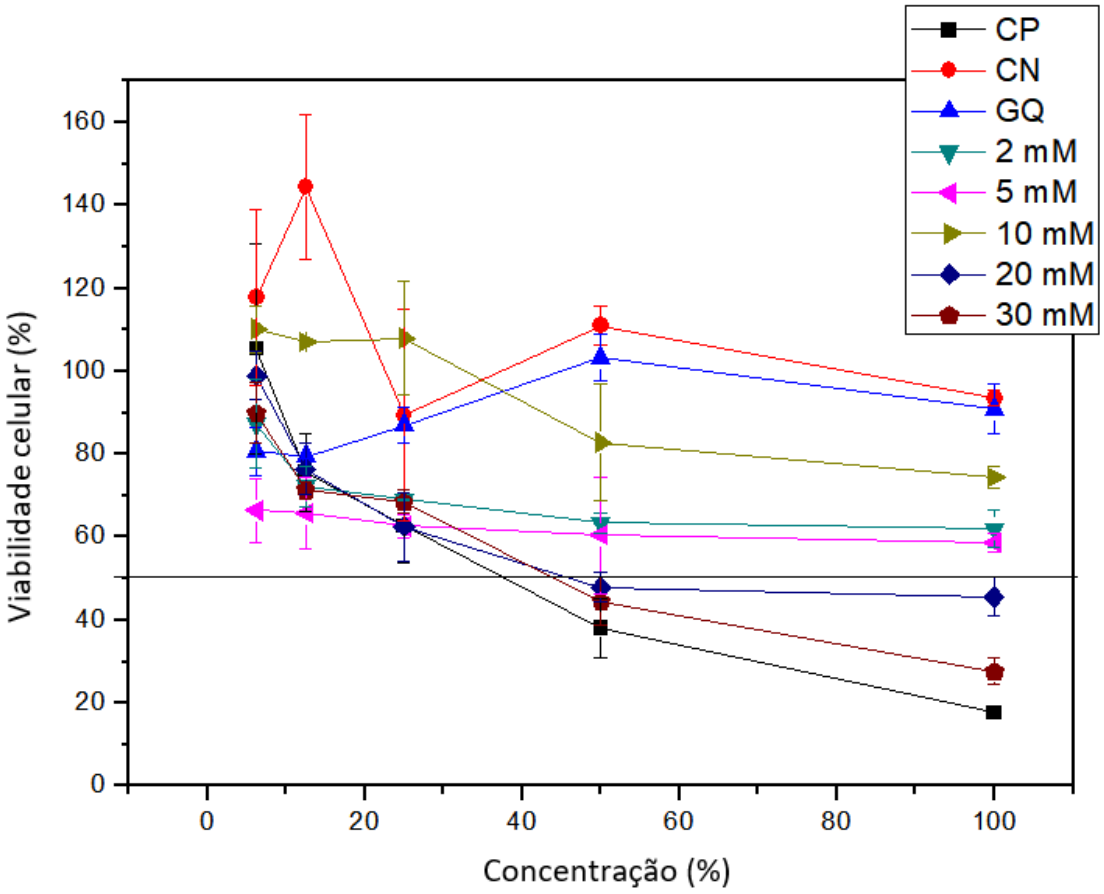
5.5 Ensaios in vitro: citotoxicidade (IC50) e microbiológico

5.5.1 Ensaio de citotoxicidade (IC50)

O ensaio celular realizado foi de citotoxicidade (IC50), representado na Figura 17, o qual demonstra a concentração, por meio de diluições seriadas, em que as amostras apresentam ação citotóxica em 50% das células, ou seja, irá demonstrar qual concentração da amostra, afeta metade das células, levando-as à apoptose. Para isso, o teste foi baseado na norma na norma ISO 10993-5:2009, a qual recomenda-se utilizar as células CHO, controles positivos (efeito tóxico) e controle negativo (não tóxico), como o fenol e alumina, respectivamente.

Como pode-se constatar na Figura 17, somente as amostras de maiores concentrações de NPsAg, as membranas com 30 mM e de 20 mM, obtiveram um efeito tóxico para as células, enquanto as demais membranas com menores concentrações de nanopartículas e a amostra de GQ não apresentaram citotoxicidade.

Figura 17 – Ensaio de citotoxidade das membranas com NPsAg, a membranas controle GQ, os controles positivos (CP) (fenol 0,2%) e o controle negativo (CN) (alumina)



Fonte - Autoria própria

Assim, a membrana GQ, não apresentou efeito citotóxico, comprovando que tanto a gelatina e a quitosana são materiais biocompatíveis (SMITH; WOOD; DORNISH, 2004; ZHOU, 2017). Dessa forma, cada composto possui suas propriedades mais interessantes para o desenvolvimento de uma cobertura, como por exemplo, a gelatina apresenta a cadeia molecular "motivo RGD" , uma cadeia de aminoácidos (arginina, aspartamo e glicina) importante nas respostas celulares como a adesão e na proliferação celular (ETXABIDE et al., 2017). Assim como a quitosana, a qual é um biopolímero que não provoca toxicidade as células, sendo utilizada em estudos que envolvem tratamentos para feridas e queimaduras (BANO et al., 2017; DANG et al., 2018; KEAN; THANOU, 2010), em vista que, a quitosana estimula a vascularização e a regeneração da derme (BANO et al., 2017).

Contudo, as membranas que possuem em sua composição as NPsAg, demonstraram que apenas as amostras com maiores concentrações de nanopartículas, 30 mM e de 20 mM, apresentaram efeito citotóxicos para diluições de 50%. Assim, como visto na Figura 17, a amostra de 30mM, com concentração de 100%, uma pequena taxa de células sobreviveram, enquanto na amostra de 20 mM, na mesma concentração, a taxa de citotoxicidade também foi menor. Como também, na concentração de 50%, as taxas de citotoxicidade foram próximas, da membrana de 30 mM com 44,4% e de 20 mM com 45,6%.

Entretanto, as amostras que continham baixa concentração de NPsAg, de 10 mM, 5 mM e de 2 mM, não foram observados efeitos citotóxicos, em vista que todas as concentrações das amostras, estão acima do índice de citotoxicidade de 50% (IC50).

Mediante o exposto, salienta-se que a atividade biológica das NPsAg depende de muitos fatores, tais como tamanho, morfologia e composição das partículas, aglomeração, liberação de íons, taxa de dissolução, reatividade de partículas em solução, tipo de células e agentes redutores utilizados para a síntese das NPsAg; sendo que todos esses fatores são relevantes para a determinação da citotoxicidade (CARLSON et al., 2009). De maneira que, as propriedades físico-químicas das nanopartículas pode afetar a distribuição biológica (proliferação), penetração nas barreiras biológicas (membrana celular) (ALBANESE; TANG; CHAN, 2012; DUAN; LI, 2013).

Portanto, o desenvolvimento de NPsAg com estruturas uniformes, em relação ao tamanho, morfologia e funcionalidade são essenciais para avaliar sua influência em sistemas biológicos. Diante disso, verificou-se que altas concentrações de NPsAg são citotóxicas, deste modo, os principais mecanismos que resultam na citotoxicidade das NPsAg são a distribuição de tamanho e estresse oxidativo (SRIRAM et al., 2012).

Considerando os resultados obtidos do MEV- EDS e do MET, as membranas além de possuírem quantidades diferentes de NPsAg, também apresentam nanopartículas de diversos tamanhos, desde muito pequenos como 5 nm à maiores de 60 nm. De acordo com Sriram et al. (2012), as nanopartículas com menores tamanhos, apresentam maior índice de citotoxicidade, quando comparadas com as maiores, em decorrência dessas possuírem uma maior área de superfície. Esse fato também é confirmado em outros estudos, em que verificaram que as nanopartículas muito pequenas (<10 nm) podem provocar efeitos citotóxicos, entretanto as partículas grandes ou as partículas aglomeradas (> 100 nm) não causam efeito significativo sobre as células (FOLDBJERG , JIANG , 2015; RIZZELLO, 2014; YANG, KIM , 2012).

Dessa forma, segundo Zhao et al. (2011), as nanopartículas, menores que 75 nm, são fagocitadas ou pinocitadas pelas células, desse modo ao entrarem no seu interior, podem levar as células a apoptose, por meio da fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Esse fenômeno foi observado no estudo de Sriram et al. (2012), em que estudaram os efeitos de NPsAg de 22 nm e 42 nm, em células endoteliais, onde constataram que aumento da citotoxidade frente as menores nanopartículas, atribuindo a esse resultado, o aumento da atividade da caspase – 3, responsável por clivar proteínas, em que a sua ativação resulta na clivagem do inibidor da enzima DNAse, levando essa enzima a fragmentar o DNA da célula, causando a morte celular.

Além disso, outra influência na citotoxicidade das NPsAg, é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é considerado uma das principais causas dos efeitos citotóxicos, de modo que está relacionado ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a incapacidade das células reagirem contra eles (ZIVIC et al., 2018). Dessa forma, o estresse oxidativo intracelular poderia ser acelerado pelos NPsAg por perturbar o equilíbrio entre os processos oxidante e antioxidante (NEL et al., 2006). Como também, ocorre a indução de geração de Espécies Reativas com Oxigênio (ROS), que leva a permeabilidade da membrana mitocondrial, causando danos na cadeia respiratória, desencadeando a apoptose (VALKO et al., 2006).

Portanto, as membranas GQ e as que continham poucas concentrações de NPsAg, não apresentaram citotoxicidade. A primeira por apenas conter compostos biocompatíveis, que auxiliam os processos celulares, enquanto o segundo grupo, das membranas com baixas quantidades da nanopartículas (10 mM, 5 mM e 2 mM), não possuem concentrações suficientes de NPsAg para desencadear uma resposta biológica negativa.

5.5.2 Ensaio microbiológico

A bactéria utilizada para os ensaios antibacterianos foi a *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, por ser a que está associada a infecções, principalmente na pele, além de serem associadas a casos fatais relatados em hospitais (CHEN et al., 2011). Para realizar os ensaios, foram utilizados os meios em que as amostras ficaram em contato por um dia, de modo que, as membranas quando intumescidas liberam NPsAg, um material com potencial antibacteriano. Logo após as amostras foram retiradas deles, para adicionar as bactérias. Dessa forma, foi possível verificar a reprodução bacteriana.

As análises dos crescimentos bacterianos se baseiam na observação e comparação da formação de colônias nas placas de ágar, onde as bactérias foram semeadas cultivadas por 24 h. Após a incubação as placas foram fotografadas na sequência (tempo 0h) e após as 24h de cultura em estufa (24h) Além disso, as placas controle positivo (antibiótico) e negativo (meio de cultura + bactéria), foram comparadas com as placas das membranas, assim como estas foram comparadas entre si.

Com o propósito de destacar os efeitos das membranas com NPsAg sobre as bactérias, foram feitas fotografias digitais das placas e dispostas em ordem decrescente de concentração de nanopartículas (Figura 18). Assim, primeiramente é verificado a ação bactericida da membrana de maior concentração, 30 mM de NPsAg, onde apenas cresceram 3 colônias bacterianas (flechas azuis), em seguida nas membranas com 20 mM e com 10 mM, houve redução das colônias, sendo que na de 20 mM houve uma maior inibição.

Entretanto, nas membranas de menores concentrações de NPsAg e nas membranas GQ, não houve inibição do crescimento bacteriano. Para validação do ensaio e também para comparação, é possível observar que o controle negativo (CN), que não continha nenhuma substância antibacteriana, houve um grande crescimento de colônias, ao contrário do controle positivo (CP), o qual contém antibiótico, inibiu totalmente o crescimento de colônias bacterianas. Além disso, em todas as placas referente ao tempo 0, houve crescimento das bactérias, de modo que tanto as membranas quanto o controle positivo, não permaneceram tempo suficiente em contado com o meio para gerar efeito nas bactérias.

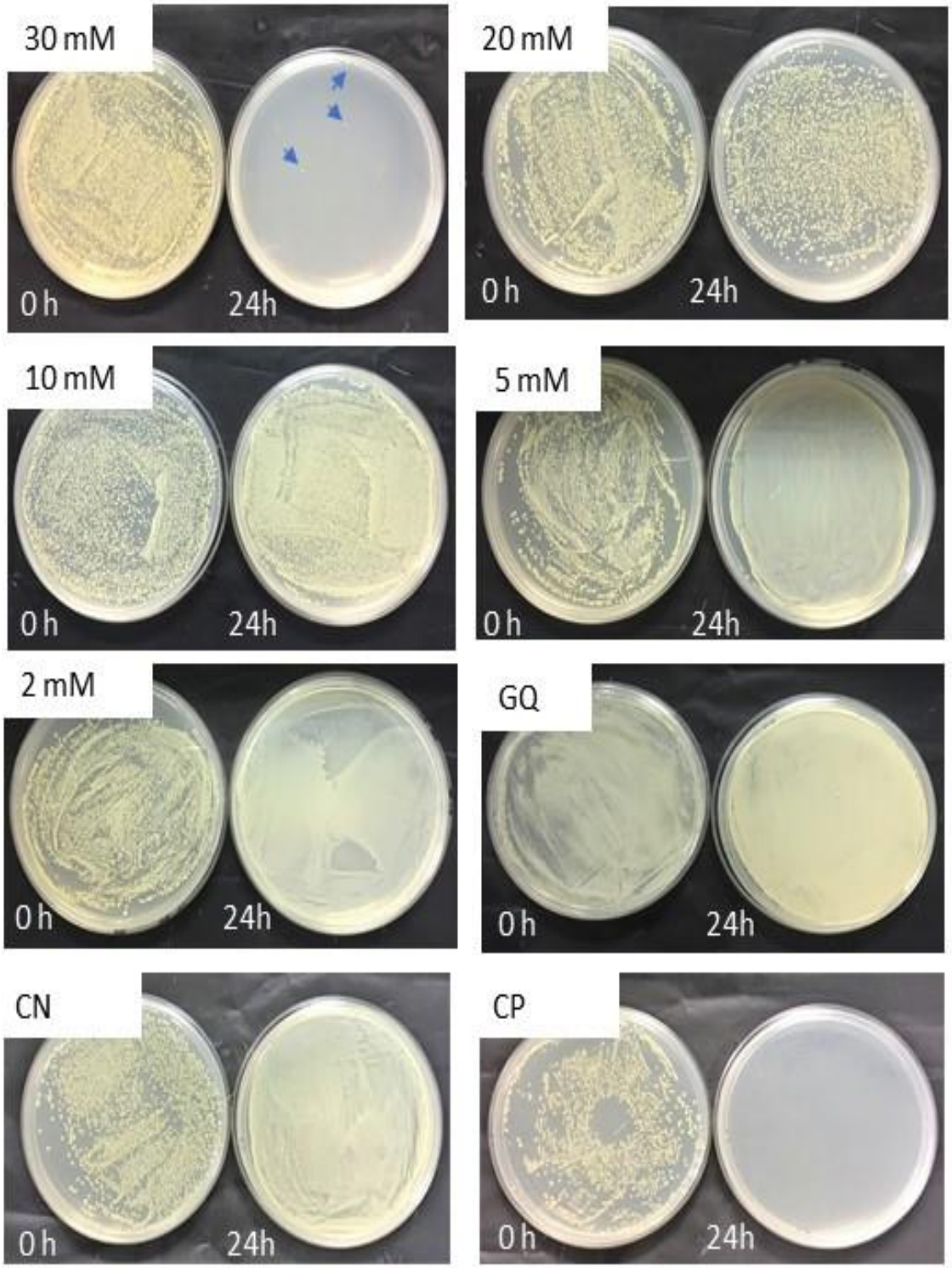
Dessa forma, a atividade antibacteriana verificada na membrana de 30 mM, assim como a redução das colônias, sobretudo na membrana de 20 mM, também é relatada em algumas pesquisas. No estudo de Cao et al. (2010) analisaram um hidrogel de quitosana com NPsAg, em que através do ensaio de halo difusão com *S. aureus*, atestaram a formação de um halo de 2 mm e 1,5 mm, confirmando o efeito antibacteriano das nanopartículas. Assim como no estudo de Haider et al. (2018), demonstrou por meio dos ensaios de halo difusão, como também com as bactérias (*S. aureus*) em meio de cultura, que na presença do *scaffold* de celulose/quitosana/NPsAg, houve uma grande inibição do crescimento bacteriano. Portanto, evidencia-se a atividade antibacteriana na presença das NPsAg, as quais são amplamente estudadas devido a sua ação sobre os microrganismos (MEKKAWY et al., 2017; SENTHIL et al., 2017; VERMA; KHARWAR; GANGE, 2010; VIMALA et al., 2010).

Dessa forma, as maneiras de como as NPsAg agem sobre as bactérias, são atribuídas ao tamanho das nanopartículas, em que as menores partículas possuem maior efeito antibacteriano (VIMALA et al., 2010), de modo que elas irão penetrar na célula bacteriana e

alterar o seu DNA, resultando na morte bacteriana. Não somente mas também, pode ocorrer simultaneamente, as interações dos íons Ag^+ e das NPsAg com o enxofre ligado na parede celular, rompendo-a, ocasionado a inibição do crescimento bacteriano, sendo que este último mecanismo, é o mais conclusivo na comunidade científica (HAIDER; KANG, 2015; HUANG et al., 2018; LI et al., 2008). Inclusive, a presença de íons Ag^+ e NPsAg, tanto em células quanto em bactérias, podem elevar a atividade das mitocôndrias, gerando ROS, resultando em danos nos complexos proteicos, lipídeos e nos aminoácidos (COMHAIR; ERZURUM, 2002; HUANG et al., 2018).

No entanto, nota-se na Figura 18, que as membranas com menores concentrações de NPsAg e a membrana GQ, não interferiram no crescimento da *S. aureus*. Considerando que há estudos que elucidam a ação antibacteriana da quitosana isolada (MA et al., 2017) quanto em blenda com a gelatina (PEREDA et al., 2011), contudo esse efeito não foi confirmado nos resultados citados. Em vista que no processo de desenvolvimento das membranas, ocorre a neutralização dos grupos ácidos através da adição de NaOH, o qual faz com que a quitosana perda a carga positiva, que contribui para a sua propriedade antibacteriana.

Figura 18 – Ensaio antibacteriano das membranas sobre as bactérias *S. aureus*



Fonte: autoria própria

Deste modo, em relação aos ensaios biológicos, o ensaio de citotoxicidade e antibacteriano, é observado que a membranas de maior concentração de NPsAg, com 30 mM, apesar de ter efeito bactericida na *S. aureus*, também é a membrana que apresentou a maior citotoxicidade. Todavia, a membranas de 20 mM de NPsAg apresentou baixo índice citotóxico e ocasionou uma inibição do crescimento bacteriano, além de apresentar altas taxas de intumescimento e de PVA.

Logo, como constatado que apenas as membranas com 30 mM, 20 mM com 10 mM, geraram uma resposta nas bactérias. Conclui-se que a adição e a quantidade de NPsAg nas membranas, atribuíram a elas a natureza apropriada para agir contra o crescimento bacteriano, assim como reduzir a sua proliferação.

6 CONCLUSÕES

A rota de obtenção das nanopartículas utilizando quitosana como agente redutor foi eficiente. Foram obtidas NPsAg com tamanhos variando entre13,16 nm e 20,97 nm as quais mantiveram-se estáveis por um período de até 6 meses.

As membranas de GQ apresentaram uma morfologia superficial lisa, isentas de poros. O comportamento morfológico não sofreu alteração em decorrência da adição das diferentes concentrações de NPsAg.

As NPsAg alteraram o comportamento de intumescimento e de permeação a vapor de água das membranas. Observou-se que quanto maior a concentração das NPsAg, maiores valores de intumescimento e PVA foram obtidos.

Com os resultados obtidos é possível inferir que a membrana de 10 mM, de acordo com o teste in vitro, é considerada biocompatível por não ser tóxica às células. Além disso, a membranas, apresentou efeito redutor de crescimento bacteriano, sendo ótima opção para avanço em testes clínicos, como uma cobertura complementar ao tratamento de feridas crônicas.

REFERÊNCIAS

ABDOU, E.; NAGY, K.; ELSABEE, M. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1359–1367, 2008.

AHMED, S. et al. A Review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 17–28, 2016.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The Effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2012.

ANIRUDHAN, T. S.; NAIR, S. S. Gold nanoparticle and hydrophobic nanodiamond based synergistic system: a way to overcome skin barrier function. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 3262-3272, Oct. 2018.

ANTONIASSI, J. L. **Difração de raios X com o método de rietveld aplicada a bauxitas de Porto Trombetas, PA**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Mineral) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ANTUNES, F. et al. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 2013.

APPLEGATE, E. **Anatomia e fisiologia**. Porto Alegre**:** Elsevier, 1994. Cap. 5, p. 70-75.

ARAUJO, P. B. et al. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de etonogestrel. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, p. 138-145, 2017.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27–34, 2007.

BAJPAI, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.

BANO, I. et al. Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 81–88, 2014.

BANO, I. et al. Chitosan: a potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.

BEHAR, D. et al. Omiderm, a new synthetic wound covering: physical properties and drug permeability studies. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, n. 6, p. 731–738, 1986.

BERGER, J. et al. Structure and interctions in covalenty and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical application. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. 149f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104–110, 2013.

BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, p. 16–18, 1999.

BREDA, C. A. et al. Processing and characterization of chitosan films with incorporation of ethanolic extract from "pequi" peels. **Macromolecular Research**, v. 25, n. 11, p. 1049–1056, 2017.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. J. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Sugery,** v. 117, n. 7, p.1eS – 32eS, 2006.

BUENO, C. Z.; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêutico.avançados**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2018. Cap 2, p. 68-82.

CAMPANI, V. et al. Chitosan gel to treat pressure ulcers: a clinical pilot study. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, 2018.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 20, p. 51-58, 2007.

CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Senac, 2001.

CAO, X. L. et al. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. **Journal of Materials Science**: materials in medicine, v. 21, n.10, p. 2861–2868, 2010.

CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p. 13608–13619, 2009.

CARVALHO, I. C. Engineered 3D-scaffolds of photocrosslinked chitosan-gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressings and regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 690–705, 2017.

CATAURO, M. et al. Synthesis of SiO(2) and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests. **Journal of Biomedical Materials Research** - part A, v. 102, n. 9, p. 3087–3092, 2014.

CHAE, K. S.; SHIN, C. S.; SHIN, W. S. Characteristics of cricket (Gryllus bimaculatus) chitosan and chitosan-based nanoparticles. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 631–639, 2018.

CHALONGSUK, R.; SRIBUNDIT, N. Usage of chitosan in thai pharmaceutical and cosmetic industries. **Silpakorn University Science and Technology Journal,** v. 7, n. 1, p. 49-53, 2013.

CHEN, C. et al. An Innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant staphylococcus aureus: a therapy concordant with evolutionary medicine. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 391–399, 2011.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p.86-168, 2016.

CHENG, M. et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 12, p. 4583–4588, 2008.

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

COLOMBO, P. et al. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2–3, p. 231–237, 1996.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology**: lung cellular and molecular physiology, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

COVARRUBIAS, C. et al. Bionanocomposite scaffolds based on chitosan–gelatin and nanodimensional bioactive glass particles: in vitro properties and in vivo bone regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 9, p. 1155-1163, 2018.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

CRUZ, B. F.; CORDOVIL, P. B. L.; BATISTA, K. N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, p. 246–250, 2012.

DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a wound dressing based on common wound characteristics. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 1, p. 32–41, 2016.

DAIRI, N. et al. Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 508–523, 2019.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 212f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DANG, L. H. et al. Injectable nanocurcumin-formulated chitosan-g-pluronic hydrogel exhibiting a great potential for burn treatment. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2018, p. 575–4890, 2018.

DARROUDI, M. et al. Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV-light. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 6346–6356, 2011.

DEDAVID; GOMES; MACHADO. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. Cap. 1, p. 10-25.

DHAND, V. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using coffee arabica seed extract and its antibacterial activity. **Materials Science and Engineering C**: materials for biological applications, v. 58, p. 36–43, 2016.

DJAGNY, V. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 481–492, 2001.

DOYLE, B. B.; BENDIT, E. G.; BLOUT, E. R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. **Biopolymers**, v. 14, n. 5, p. 937–957, 1975.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, n. 9–10, p. 1521–1532, 2013.

ETXABIDE, A. et al. Ultra thin hydro-films based on lactose-crosslinked fish gelatin for wound healing applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1–2, p. 455–467, 2017.

FAKHREDDIN, S. et al. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3/4, p. 1490–1495, 2013.

FAN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 427–434, 2016.

FARHADIAN, N. et al. Chitosan/gelatin as a new nano-carrier system for calcium hydroxide delivery in endodontic applications: development, characterization and process optimization. **Materials Science & Engineering C**: materials for biological applications, v. 92, p. 540–546, 2018.

FERREIRA, M. C. et al. Complex wounds. **Clinics**, v. 61, n. 6, p. 571-578, 2006.

FIELD, F. K.; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1A, p. 2S–6S, 1994.

FOLDBJERG, R. et al. Silver nanoparticles wolves in sheep's clothing? **Toxicological Reviews**, v. 4, p. 563–575, 2015.

FRANCIS SUH, J. K.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589–2598, 2000.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203–206, 2008.

FRANCO, P. B. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana e casca de banana verde para cicatrização de feridas cutâneas**. 2014. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

FRANCO, R. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Revista de Medicina** (Ribeirão Preto/ Online), v. 34, n. 3-4, p. 229-237, 2001.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 113–136, 1998.

GARG, T. et al. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 29, n. 1, p. 1–63, 2012.

GÉRENTE, C. et al. Removal of arsenic (V) onto chitosan: from sorption mechanism explanation to dynamic water treatment process. **Chemical Engineering Journal**, v. 158, n. 3, p. 593–598, 2010.

GHILINI, F. et al. Highly stabilized nanoparticles on poly-l-lysine-coated oxidized metals: a versatile platform with enhanced antimicrobial activity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 28, p. 23657–23666, 2018.

GHORBANI, M.; LASHKENARI, M. S.; EISAZADEH, H. Synthesis and thermal stability studies of polyaniline/silver nanocomposite based on reduction of silver ions using polyaniline. **High Performance Polymers**, v. 23, n. 7, p. 513–517, 2011.

GOORMACHTICH, E.; CABIAUX, V.; RUYSSCHAERT, J. M. Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. **European journal of Biochemistry banner**, v. 193, n. 2, p. 409-420, 1990.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A Review of the antimicrobial acitivity of chitosan. **Polímeros**: ciência e tecnologia, v. 19, p. 241–247, 2009.

GROTENDORST, G. R. et al. EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 139, n. 3, p. 617-623, June 1989.

GUIDOIN, R. et al. Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses. **Biomaterials**, v. 10, n. 3, p. 156–165, 1989.

GUMUSDERELIOGLU, M.; AGI, P. Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, p. 211-220, 2004.

HAIDER, A.; KANG, I. K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. **Advances in Materials Science and Engineering**, 2015.

HASTINGS, G. W. Definitions in biomaterials: progress in biomedical engineering. **Biomaterials**, v. 10, n. 3, p. 216, 1989.

HEATH, D. E.; COOPER, S. L. Polymers: basic principles. In: RATNER, B. D. et al. (Ed.). **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. New York: Academic Press, 2013.

HERSEL, U.; DAHMEN, C.; KESSLER, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385–4415, 2003.

HOWLING, G. I. et al. The Effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2959–2966, 2001.

HUANG, Z. et al. Differential behaviors of silver nanoparticles and silver ions towards cysteine: bioremediation and toxicity to phanerochaete chrysosporium. **Chemosphere**, v. 203, p. 199–208, 2018.

HWANG, E. T. et al. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. **Small**, v. 4, n. 6, p. 746–750, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDADIZATION. **ISO 10993- 5**: Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Genebra: ISO, 2009.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food Chemistry**, v. 148, p. 162–169, 2014.

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

KIM, S. et al. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **Journal of Biomedical Materials Research** - part B applied biomaterials, v. 75, n. 2, p. 442–450, 2005.

KOOK, M. V. L. **Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxipatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial**. 2005. 128 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

LAGUNAS, A. et al. Cell adhesion and focal contact formation on linear RGD molecular gradients: study of non-linear concentration dependence effects. **Nanomedicine**: nanotechnology, biology, and medicine, v. 8, n. 4, p. 432–439, 2012.

LANGENBACH, F.; HANDSCHEL, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 117, 2013.

LAVORGNA, M. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 291- 298, 2010.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157–169, 1994.

LEMPESIS, N.; VELD, P. J.; RUTLEDGE, G. G. Atomistic simulation of the structure and mechanics of a semicrystalline polyether. **Macromelecules**, v. 49, n. 15, p. 5715-5726, 2016.

LI, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591–4602, 2008.

MA, Y. et al. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science and Engineering C**: materials for biological applications, v. 81, p. 522–531, Dec. 2017.

MAHAPATRA, S. K. et al. Synthesis of gold and silver nanoparticles by electron irradiation at 5–15 keV energy. **Nanotechnology**, v. 18, n. 13, p. 135-602, 2007.

MARIEB, N. E.; HOEHN, K. **Anatomia e fisiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 5, p.138-154.

MAURI, E. et al. Evaluation of RGD functionalization in hybrid hydrogels as 3D neural stem cell culture systems. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 3, p. 501–510, 2018.

MCDONNELL, M. T. et al. Molecular dynamics simulations of hydration effects on solvation, diffusivity, and permeability in chitosan/chitin films. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 34, p. 8997–9010, 2016.

MEKKAWY, A. I. et al. In Vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 759–777, 2017.

MELO, M. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MOURA, C. M. et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **VETOR - revista de ciências exatas e engenharias**, v. 16, n. 1, p. 37–45, 2007.

MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; ZUCOLOTTO, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 520–524, 2012.

MOREIRA, D. M. et al. A Novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. **Angle Orthodontist**, v. 85, n. 2, p. 175-183, 2015.

MURUGADOSS, A.; CHATTOPADHYAY, A. A "Green" chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. **Nanotechnology**, v. 19, n. 1, 2008.

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

NAGAHAMA, H. et al. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 255–260, 2009.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.

ORYAN, A. et al. Topical delivery of chitosan-capped silver nanoparticles speeds up healing in burn wounds: a preclinical study. **Carbohydrate polymers**, v. 200, p. 82–92, Nov. 2018.

OUSEY, K. et al. The Importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 3, p. 122–130, 2016.

PARK, Y. A New paradigm shift for the green synthesis of antibacterial silver nanoparticles utilizing plant extracts. **Toxicological Research search**, v. 30, n. 3, p. 169–178, 2014.

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

PERCIVAL, N. J. Classification of wounds and their management. **Surgery - Oxford International Edition,** v. 20, n. 5, p. 114-117, 2002.

PEREDA, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, 2011.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polímeros**, v. 9, n. 4, p. 104–109, 1999.

PETER, M. et al. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 687–694, 2010.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRESTES, R. C. et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 375–382, 2013.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2693-2700, 2004.

RAHMAN, M. M. et al. Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering. **Polymer International**, v. 62, p. 79-86, 2013.

RAJITHA, P. et al. Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 8, p. 1177–1194, 2016.

RAWAL, T.; PATEL, S.; BUTANI, S. Chitosan nanoparticles as a promising approach for pulmonary delivery of bedaquiline. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**: official journal of the european federation for pharmaceutical sciences, v. 124, p. 273–287, 2018.

RHIM, J. W. et al. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films of agar and silver nanoparticles: Laser ablation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 456–465, 2014.

RISSER, G. E. et al. Structural properties of starch-chitosan-gelatin foams and the impact of gelatin on MC3T3 mouse osteoblast cell viability. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.

RIZZELLO, L.; POMPA, P. P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1501–1518, 2014.

ROCHA, T. C. R. **Nanopartículas metálicas anisotrópicas**: **mecanismo de formação e aplicações ópticas**. 2008. 172 f. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física, Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

RODRÍGUEZ, M. I.; BARROSO, L. G.; SÁNCHEZ, M. L. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 20–26, 2018.

SENTHIL, B. et al. Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B**: biology, v. 177, p. 1–7, 2017.

SIMÓ, C.; CIFUENTES, A.; GALLARDO, A. A Drug delivery system: Polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods. **Journal of Chromatography B**: analytical technologies in the biomedical life sciences, v. 797, p. 37-49, 2003.

SINGH, P. et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588–599, 2016.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 9, p. 1254–1276, 2004.

SMANIOTTO, P. H. D. S. et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 4, p. 623-626, 2012.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of chitosan on epithelial cell\right junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2004.

SOUZA, H.; BRAGA, M.; SOSNIK, A. **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêutico avançados**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2018. Cap. 2, p. 68-82.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; BARATHMANIKANTH, S. Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. **Nanoscience Methods**, v. 1, n. 1, p. 56–77, 2012.

THEIN-HAN, W. W. et al. Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3453–3466, 2009.

THOMAS, V.; YALLAPU, M. M.; SREEDHAR, B. Fabrication, characterization of chitosan / nanosilver film and its potential antibacterial application. **Journal of Biomaterials Science,** v. 20, p. 37– 41, 2012.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 4, p. 372–376, 2009.

TSURUTA, D. et al. The Barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. **Trends in Cell Biology,** v. 12, n. 8, p. 355-357, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1– 40, 2006.

VAN HYNING, D. L.; KLEMPERER, W. G.; ZUKOSKI, C. F. Silver nanoparticle formation: predictions and verification of the aggregative growth model. **Langmuir**, v. 17, n. 11, p. 3128–3135, 2001.

VERCIK, L.; VERCIK, A.; RIGO, E. C. S. Kinetics of silver nanoparticle release from chitosan spheres. **Materials Research Society**, v. 2, n. 19/20, p. 1089-1094, 2017.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus Aspergillus clavatus. **Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2010.

VIGNESHWARAN, N. et al. A Novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 12, p. 2012–2018, 2006.

VIMALA, K. et al. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: a facile approach for superior antibacterial application. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v. 76, n. 1, p. 248–258, 2010.

WANG, H. et al. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 3986–3998, 2014.

WANG, L. et al. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 5, p. 610–618, 2002.

WEI, D.; QIAN, W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v. 62, n. 1, p. 136–142, 2007.

WEI, D. et al. Synthesis, properties, and surface enhanced raman scattering of gold and silver nanoparticles in chitosan matrix. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 2566-2573, 2009.

WILLIAMS, D. F. Tissue-biomaterial interactions. **Journal of Materials Science**, v. 22, n. 10, p. 3421–3445, 1987.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

WONGPREECHA, J. et al. One-pot, large-scale green synthesis of silver nanoparticles-chitosan with enhanced antibacterial activity and low cytotoxicity. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 641–648, 2018.

XU, R. et al. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.

YANG E. J.; KIM S, K. J. I. Flamma some formation and IL-1β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, p. 6858–6867, 2012.

YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering C**: materials for biological applications**,** v. 30, n. 6, p. 891–897, 2010.

YUAN, S.; WEI, T. T. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19, p. 467-479, 2004.

ZANCHET, D. **Nanopartículas de ouro passivadas com tióis**: caracterização estrutural e formação de supercristais auto-organizados. 199. 118 f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ZEM, M.; FANG, Z.; XU, C. Novel method of preparing microporous membrane by selective dissolution of chitosan/polyethylene glycol blend membrane. **Applied Polymer Science**, v.91, p. 2840-2847, 2004.

ZEM, X.; RUCKENSTEIN, E. Control of pore in macroporous chitosan and chitin membranes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 4169-4175, 1996.

ZHANG, X. F. et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016. DOI: 10.3390/ijms17091534.

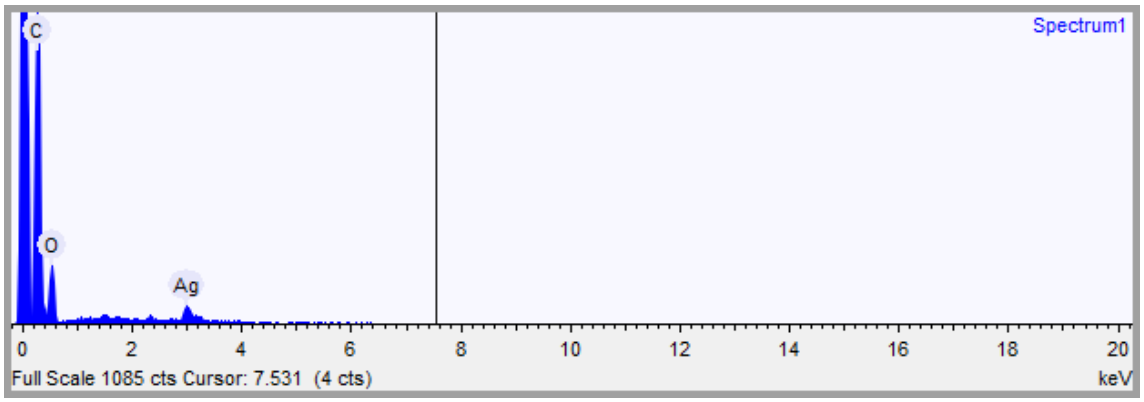
ZHAO, F. et al. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. **Small**, v. 7, p. 1322–1337, 2011.

ZHOU, Y. et al. Functionalized asymmetric poly (lactic acid)/gelatin composite membrane for guided periodontal tissue regeneration. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 8, n.4, p. 229-244, 2017.

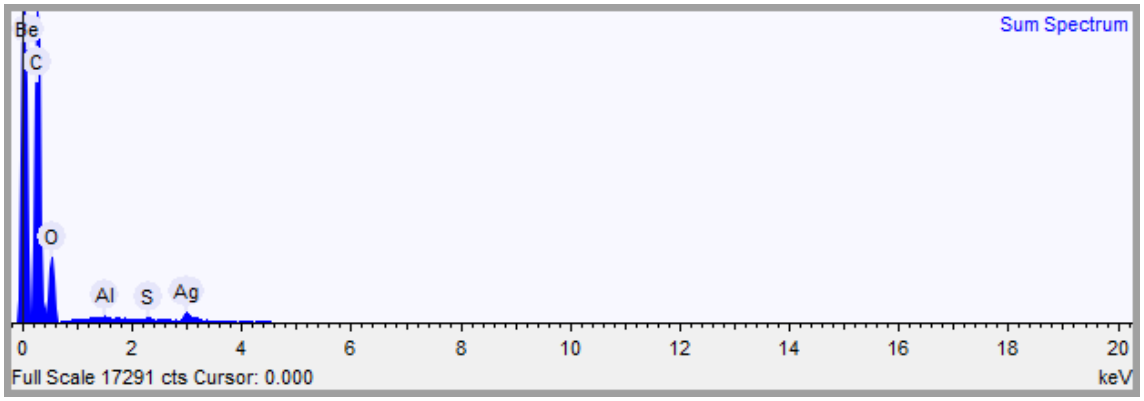
ZIVIC, F. et al. Characteristics and applications of silver nanoparticles. In: BRABAZON, D. et al. **Commercialization of nanotechnologies** - a case study approach. Berlin: Springer, 2018. p. 249-258.

Apêndice 1 – Dados EDS sobre os elementos presentes nas membranas GQAg

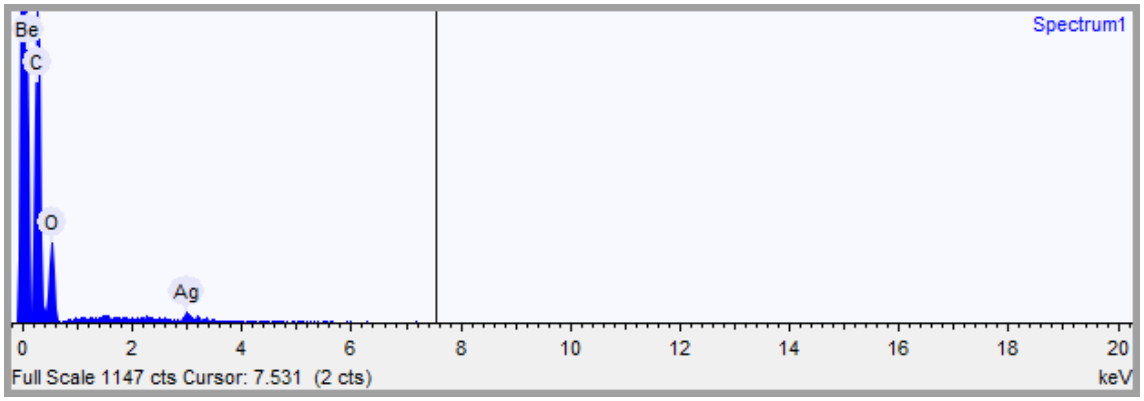
Membrana com 30 mM de NPsAg



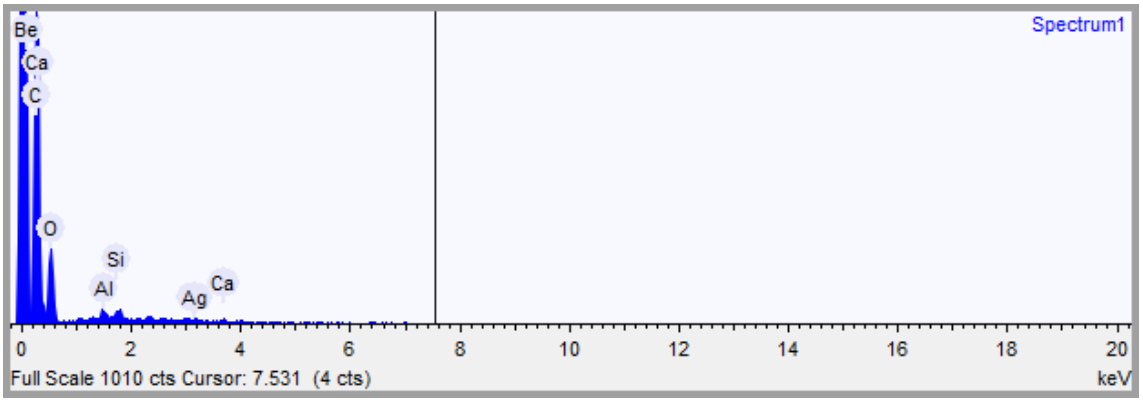
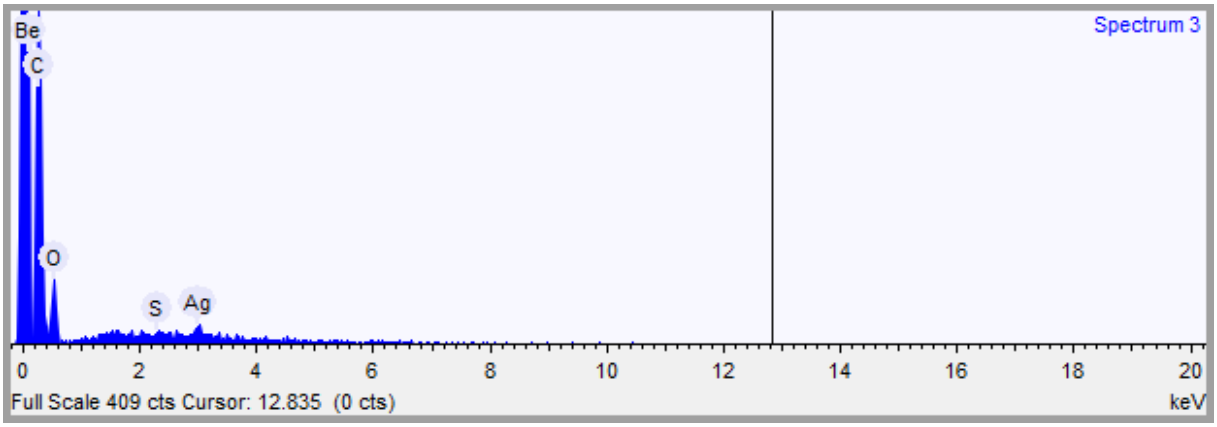
Membrana com 20 mM de NPsAg



Membrana com 10 mM de NPsAg



Membrana com 5 mM de NPsAg



Membrana com 2 mM de NPsAg