

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MATERIAS PARA ENGENHARIA**

**Nanocompósitos de Lactato de Quitosana e NPsAg com atividade  
antimicrobiana**

**Alexandre Flauzino Júnior**

**Itajubá, 25 de outubro de 2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MATERIAS PARA ENGENHARIA**

**Alexandre Flauzino Júnior**

**Nanocompósitos de Lactato de Quitosana e NPsAg com atividade  
antimicrobiana**

**Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Materiais para Engenharia  
como parte dos requisitos para obtenção  
do Título de Doutor em Materiais para  
Engenharia.**

**Área de Concentração: Não Metais**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Elena Leyva  
Coorientador: Prof Dr Álvaro Antônio  
Alencar de Queiroz**

**Outubro de 2021**

**Itajubá – MG**

## **Agradecimentos**

A Deus, Grande Arquiteto do Universo, por me iluminar nas horas difíceis e por me conceder pessoas incríveis nessa caminhada.

Aos meus pais, pelo magnífico apoio e ajuda em todos os momentos, decisões e necessidades, fazendo tudo isso com carinho.

À minha noiva Lívia por me ajudar em todos os momentos de indecisão e pela compreensão e apoio.

A minha orientadora, Professora Maria Elena, sem a qual nada seria possível.

Ao Professor Álvaro pela orientação e ajuda em todos os momentos.

A todos os professores, pela compreensão, preocupação e por todos os ensinamentos. Aos técnicos da Unifei, por terem dedicados um tempo de suas vidas, ao fazerem possível a maioria das caracterizações presentes neste trabalho.

Aos amigos e futuros companheiros de trabalho por todos os momentos de descontração e estudo.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que, de uma forma ou outra, torceram por mim.

**“Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado; a ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus predecessores”**

**Ernest Rutherford.**

**SUMARIO**

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIações E SIMBOLOS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 QUITOSANA .....	3
2.2 LACTATO DE QUITOSANA.....	4
2.3 SULFATO DE CONDROITINA.....	5
2.4 NANOPARTICULAS DE PRATA .....	7
2.5 CURATIVOS PARA TRATAMENTO DE FÉRIDAS.....	10
2.6 MODELO MATEMATICO PARA A ANALISE DO MECANISMO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FARMACOS.....	13
2.6.1 MODELO DE KORSMEYER- PEPPAS.....	13
2.7 ELETROFIAÇÃO.....	14
2.7.1 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO .....	16
2.7.1.1 PARÂMETROS DA SOLUÇÃO .....	17
2.7.1.2 VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO .....	17
2.7.1.3 TENSÃO SUPERFICIAL .....	18
2.7.1.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA .....	19
2.8. OS PARÂMETROS DO PROCESSAMENTO.....	20
2.8.1. TENSÃO APLICADA .....	20
2.8.2 VAZÃO .....	21
2.8.3 DISTÂNCIA DA AGULHA À PLACA COLETORA .....	21

2.8.4	PARÂMETROS AMBIENTAIS .....	22
2.8.5	OS SOLVENTES UTILIZADOS PARA ELETROFIAÇÃO.....	23
2.9	APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....	24
2.10	PRÓTESES MÉDICAS .....	25
2.11	ENGENHARIA TECIDUAL.....	25
2.12	CITOTOXICIDADE.....	26
2.13	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	27
2.14	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	28
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA .....	30
4.2	GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA.....	31
4.3	SÍNTESE DO LACTATO DE METILA E ETILA.....	32
4.4	SÍNTESE DO LACTATO DE QUITOSANA VIA METILICA E ETILICA .....	33
4.5	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO .....	33
4.6	CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE TÉRMICA .....	34
4.7	CÁLCULO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA...34	
4.8	CARACTERIZAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO ( <sup>1</sup> H-RMN) .....	35
4.9	PREPARAÇÃO DAS NANOFIBRAS POR ELETROFIAÇÃO .....	36
4.10	CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	36
4.11	ESTUDO DA LIBERAÇÃO DA NP <sub>s</sub> Ag E SULFATO DE CONDROITINA ....	37
4.12	SÍNTESE DO COMPLEXO SULFATO DE CONDROITINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA (SC-NP <sub>s</sub> Ag).....	37

4.13 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.14 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE .....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>40</b>
5.1 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA DA QUITOSANA .....	40
5.2 GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA.....	42
5.3 SÍNTESE DO LACTATO DE QUITOSANA .....	44
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR .....	46
5.5 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE TERMICA .....	49
5.5.1 ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA .....	49
5.5.2 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO LACTATO DE QUITOSANA .....	51
5.5.3 ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATORIA DIFERENCIAL.....	54
5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO SULFATO DE CONDROITINA: NANOPRATA (SC:NP <sub>s</sub> Ag) .....	55
5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR RMN <sup>1</sup> H .....	57
5.8 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOFRIBAS .....	58
5.9 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	62
5.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE .....	64
5.11 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ESTUDO DE LIBERAÇÃO.....	66
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>70</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores do coeficiente difusão (n) (RITGER, 1987). .....	14
Tabela 2 - Concentração e média dos tempos para as soluções de QUI em tampão acetato .....	40
Tabela 3 – Viscosidade relativa, específica e reduzida para as amostras de QUI em tampão acetato.....	41
Tabela 4 - Valor da Massa Molar Média para a QUI em tampão acetato a 25°C.....	42
Tabela 5 – Valor da área dos picos da QUI. ....	43
Tabela 6 - Rendimento médio obtido nos procedimentos seguidos para a preparação dos lactatos. ....	44
Tabela 7 - Índice de Refração dos Lactatos.....	45
Tabela 8 - Dados referentes as perdas de massas nos estágios de degradação. ....	51
Tabela 9 - Determinação das variáveis para o cálculo da energia de ativação (Ea) da degradação térmica do lactato de quitosana.....	52
Tabela 10 – Análise termogravimétrico de SC e complexo SC:NPsAg.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do copolímero de quitina-QUI. Fonte: Autoria própria.....	3
Figura 2 - Estrutura química do lactato de quitosana. Fonte: Autoria própria.....	5
Figura 3 - Estrutura da unidade repetitiva do Sulfato de Condroitina (PIAI, 2008). ....	6
Figura 4 -Agregados Supramolecular de proteoglicanas. Adaptado de (ALBERTS, et al, 2010) .....	6
Figura 5 – Oscilação de Plasmon das NPs metálicas em resposta a um campo eletromagnético (MONCK, J. J., et al., 2002). ....	9
Figura 6 - Liberação de um fármaco modelo com o tempo; sistema convencional — e sistema de liberação controlada —. Fonte: (PRIMO, 2006).....	12
Figura 7 - Representação do aparelho para a técnica de eletrofiação (FRANCO et al, 2010). ....	16
Figura 8 – Aplicações de fibras eletrofiadas em diferentes setores (BHARDWAJ, KUNDU, 2010). ....	24
Figura 9 – Grau de acetilação da QUI pelo método de Baxter (BAXTER, 1992). ....	32
Figura 10 - Sistema para a produção do lactato. (Fonte: Própria Autoria) .....	33
Figura 11 - Viscosidade reduzida em função da concentração para a QUI em tampão acetato. ....	41
Figura 12 - Áreas para o cálculo do grau de desacetilação da quitosana. ....	43
Figura 13b - Síntese de lactato de quitosana e quitosana - g - PLA .....	46
Figura 14 - Espectro FTIR (a) Lactato de metila; (b) comparativo Quitosana e Lactato de Quitosana. ....	47
Figura 15 - Estrutura química da Quitosana e do Lactato de Quitosana (Fonte: Própria Autoria).....	48
Figura 16 - Curva da perda de massa em função da temperatura da Quitosana e Lactato de Quitosana, (a) TGA; (b) DTGA. ....	50
Figura 17 - Perfis de degradação térmica (TGA/DTGA) do lactato de quitosana nas taxas de 10, 20, 30 e 40°C/min. ....	52
Figura 18 - Regressão linear para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da degradação térmica do lactato de quitosana.....	53
Figura 19 – DSC da Quitosana e do Lactato de Quitosana. ....	54
Figura 20 – FTIR comparativo do SC e do complexo SC:NPsAg.....	56

- Figura 21 - Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (ressonância magnética nuclear) de lactato de quitosana medidos a  $70^\circ\text{C}$  para reduzir a interferência do sinal do solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ). .58
- Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NPsAg a 10% em peso (a) e 13% em peso (c, d) produzidas usando DMF como solvente. O histograma de distribuição é mostrado em (b). .....59
- Figura 23 - Viscosidade da solução e condutividade elétrica em função da concentração de QUI-g-PLA: AgNP: C<sub>4</sub>S medida à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Solvente: DMF. a área sombreada em vermelho indica a região mais adequada para a eletrofição da solução QUI-g-PLA/SC:NPsAg. ....60
- Figura 24 - Ângulo de contato das nanofibras de QUI-g-PLA (a) e QUI-g-PLA/SC:NPsAg (b) à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). .....61
- Figura 25 –Atividade antibacteriana das nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg e sulfato de condroitina contra *S. aureus* e *E. coli* por meio de ensaios de discos de difusão. O Gluconato de clorexidina (CHG) 0,2% foi utilizado como controle positivo e o lactato de quitosana como controle negativo. ....63
- Figura 26 - Proliferação celular de células L-929 avaliada pelo ensaio MTT após 24h de incubação com 0,5% de fenol como controle negativo (-), meio de cultura fresco como positivo (+) e QUI-g-PLA/SC:NPsAg. ....64
- Figura 27 - Análise de microscopia de fluorescência de células de fibroblasto L-929 aderidas ao QUI-g-PLA (a) e QUI-g-PLA/SC:NPsAg (b) após 24h de incubação. Ampliação: 200x. O número de células aderidas para diferentes substratos eletrofiadas semeados com  $1,5 \times 10^3$  células são mostrados em (c). Os dados são relatados como médias  $\pm$  DP. ....65
- Figura 28 – Espectro UV-vis da solução aquosa de QUI-g-PLA/SC:NPsAg. ....66
- Figura 29 - Perfis de liberação in vitro de  $\text{Ag}^+$  íons (●) e CS (○) a partir de nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NPsAg em função do tempo em solução tampão de fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,4) e  $37^\circ\text{C}$  (valores médios  $\pm$  dp; n = 3). ....67

## ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIMBOLOS

QUI-g-PLA – Quitosana quimicamente modificada com enxerto de oligômeros de poli(ácido láctico).

QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag – Nanofibras de Lactato de Quitosana contendo nanopartículas de prata estabilizado com sulfato de condroitina.

DDS – Sistema de Liberação de Drogas (Drug Delivery System).

DNA – Ácido Desoxirribonucléico.

DSC – Calorimetria exploratória diferencial (Differential scanning calorimetry).

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier.

kV – Quilovolts.

Mt/M<sup>∞</sup> – Razão do fármaco no tempo e no infinito.

η<sub>esp</sub> – viscosidade específica.

η<sub>red</sub> – viscosidade reduzida.

η<sub>rel</sub> – viscosidade relativa.

°C – Graus Celsius.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

QUI – Quitosana.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

TGA – Termogravimetria.

UV-Vis – Ultravioleta e visível.

ZnSe – Seleneto de Zinco.

LQ – Lactato de Quitosana.

FDA – Food and Drug Administration

NP<sub>s</sub>Ag – Nanopartículas de prata.

Da – Daltons.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NP - Nanopartícula

NP<sub>s</sub>Ag – Nanopartícula de prata

## RESUMO

A quitosana quimicamente modificada com lactato está entre os derivados de quitosana que apresenta propriedades não citotóxicas bem superiores quando comparados aos outros derivados de quitosana. O lactato de quitosana por sua vez, apresenta solubilidade próxima ao pH fisiológico (pH=7,0) o que melhora significativamente as suas aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. O lactato de quitosana tem sido proposto para várias aplicações biomédicas como curativos para feridas e membranas para a odontologia. No presente trabalho foi realizada a síntese do lactato de quitosana a partir de lactato de metila e etila com a quitosana, a modificação foi comprovada a partir das técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimétrica diferencial de varredura (DSC), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN  $^1\text{H}$ ). As técnicas de caracterização de DSC e RMN  $^1\text{H}$ , mostraram que na modificação química da quitosana além do lactato de quitosana se obtiveram enxertos de oligômeros de poli(ácido láctico) na cadeia de quitosana (QUI-g-PLA). Foi realizada a eletrofiação da quitosana quimicamente modificada QUI-g-PLA contendo o complexo de sulfato de condroitina (SC) e nanopartículas de prata (NPsAg) e então estudada a liberação controlada das nanopartículas de prata e do sulfato de condroitina, visto que as nanopartículas de prata possuem atividade antimicrobianas e o sulfato de condroitina possuem propriedades de proliferação celular. Realizou se o estudo da atividade antimicrobiana, onde apresentou inibição para bactérias tanto Gram positivas como Gram negativas e também foi realizado o estudo de citotoxicidade mostrando que as nanofibras produzidas não possuem efeito negativo na viabilidade celular, apresentando na verdade um aumento na proliferação celular. Até o presente momento não foram observados pelo autor desta proposta de doutorado trabalhos que mencionem a utilização de nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NPsAg, como curativos, sobre esse aspecto parece ser importante o desenvolvimento de curativos para o tratamento de feridas nas suas diversas modalidades: queimaduras, feridas de contato, entre outras, que possuam propriedades antimicrobianas combinadas com o aumento na cicatrização do tecido celular.

## ABSTRACT

The chemically modified of chitosan lactate are among the chitosan derivatives that have much superior non-cytotoxic properties when compared to other chitosan derivatives. Chitosan lactate, has a solubility close to physiological pH (pH=7.0) which significantly improves its applications in controlled drug release systems. Chitosan lactate has been proposed for various biomedical applications as wound dressings and dental membranes. In the present work, the synthesis of chitosan lactate from methyl and ethyl lactate with chitosan was performed, the modification was proven by the techniques of infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), calorimetric differential scanning (DSC), proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). The characterization techniques of DSC and  $^1\text{H}$  NMR showed that in the chemical modification of chitosan in addition to chitosan lactate grafts of poly(lactic acid) oligomers were obtained in the chitosan chain (QUI-g-PLA). Electrospinning of chemically modified chitosan QUI-g-PLA containing the complex of chondroitin sulfate (SC) and silver nanoparticles (NPsAg) was performed and then the controlled release of silver nanoparticles and chondroitin sulfate was studied, since the nanoparticles silver have antimicrobial activity and chondroitin sulfate has cell proliferation properties. The study of antimicrobial activity was carried out, which showed inhibition for both Gram positive and Gram negative bacteria and a cytotoxicity study was also carried out, showing that the produced nanofibers do not have a negative effect on cell viability, actually showing an increase in cell proliferation. So far, the author of this doctoral proposal has not observed any work that mentions the use of QUI-g-PLA/SC:NPsAg nanofibers as dressings, on this aspect it seems to be important to develop dressings for the treatment of wounds in its various modalities: burns, contact wounds, among others, which have antimicrobial properties combined with increased healing of cell tissue.

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero formado por monômeros de quitina e quitosana, sendo considerada biocompatível, porém esta propriedade é dependente da massa molecular, grau de desacetilação e também do método de preparação (LARANJEIRAS, 2009). Entretanto, estudos demonstram que, similarmente a outros polímeros catiônicos, a quitosana apresenta significativa citotoxicidade dependente da sua concentração (EFENTAKIS, STAMOYLIS, 2009; MUZZARELLI, 2005).

Por esse motivo, há a necessidade de preparar derivados de quitosana com baixa citotoxicidade. Entre os derivados de quitosana desenvolvidos se destaca o lactato de quitosana, que apresenta propriedades não citotóxicas bem superiores quando comparados aos outros derivados de quitosana (BAE, 2009).

A quitosana é um polímero insolúvel em solução aquosa com pHs próximos ou superiores a sete, sendo apenas solúvel em soluções aquosas ácidas. Em meio ácido os grupamentos amina livres presentes na quitosana ficam protonados, fazendo com que o polímero seja solúvel em meio ácido, entre intervalos de pHs de 4,5 - 5,0 (FENG, 2005). O lactato de quitosana por sua vez, apresenta solubilidade próxima ao pH fisiológico (pH=7,0) o que melhora significativamente as suas aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. O lactato de quitosana tem sido amplamente utilizado em várias aplicações biomédicas, destacando-se os curativos para feridas e membranas para a odontologia (FENG, 2005; CARRENO, 1997).

Uma alternativa para produção de curativos para feridas, é a produção do lactato de quitosana em forma de nanofibras, uma vez que estas apresentam uma superfície de elevada área superficial, de alta porosidade, e estrutura reticular tridimensional, a qual é semelhante ao tecido natural da matriz extracelular, podendo promover um aumento da adesão, e conseqüentemente a proliferação celular (JUNQ, 1999; QUEIROZ, 2003).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam vantagens na administração do fármaco e benefícios para os pacientes, como: melhoria do efeito terapêutico, toxicidade reduzida, diminuição da dose do fármaco e redução dos efeitos colaterais (QUEIROZ, 2003), entre os diversos fármacos com atividade antimicrobiana presente no mercado, tem destaque as nanopartículas de prata, uma vez que tem sido amplamente utilizada como um potente agente antimicrobiano, em comparação com

outros antimicrobianos já existentes, as nanopartículas de prata se destacam por apresentar alta toxicidade frente a uma ampla gama de micro-organismos, juntamente, com uma baixa toxicidade em humanos. (THOMOAS, 2009).

Dentro dos sistemas de liberação controlado de fármacos utilizando o lactato de quitosana, as nanofibras de lactato de quitosana incorporados com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina oferecem características vantajosas, uma vez que facilitam o transporte eficiente de agentes antimicrobianos, como a nanoprata, e ao mesmo tempo promovem o aumento do crescimento celular provido pelo sulfato de condroitina, em pH 7,0. Portanto, o objetivo da presente Tese de Doutorado é preparar e caracterizar nanofibras de lactato de quitosana incorporado com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina e avaliar de maneira preliminar seu potencial de aplicação como sistema antimicrobiano.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero de origem natural obtido através da desacetilação alcalina da quitina. A quitosana e a quitina são diferenciados apenas pelos números de grupos aminos presentes na sua estrutura. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante da natureza, perdendo apenas para a celulose. A fonte natural mais utilizada para sua obtenção industrial são os rejeitos dos crustáceos. A quitosana é um polieletrólito fraco e em sua estrutura química, Figura 1, existem unidades de 2-acetoamido-2-desoxi-D-glucose (A) e 2-amino-2-desoxi-D-glucose (D) unidas mediante ligações glicosídicas  $\beta$ , com um predomínio da unidade desacetilada (RINAUDO, 2006).

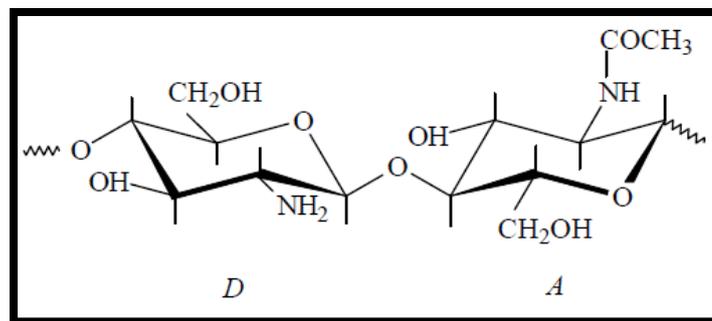


Figura 1- Estrutura química do copolímero de quitina-QUI. Fonte: Autoria própria.

As propriedades físicas e químicas da quitosana são determinadas pelo seu grau de polimerização e estrutura química da cadeia. O grau de polimerização se relaciona com a distribuição de massa molar, o valor comercial para a quitosana está entre 50.000 e 2.000.000 Daltons (MEYERS, 2000).

A composição química, assim como a sequência das unidades monoméricas, define a estrutura química da quitosana. Esta pode ser descrita pela fração molar de unidades acetiladas (ou desacetiladas), definida pelo grau de acetilação (ou desacetilação), que é a porcentagem de unidades monoméricas que estão acetiladas. O grau de acetilação é um parâmetro estrutural que influencia as propriedades físico-

químicas da quitosana como solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outros (PENICHE, 2001).

O grau de acetilação pode ser determinado por vários métodos, como a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de ultravioleta, espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , cromatografia de permeação em gel, titulação condutimétrica, análise elementar e cromatografia gasosa (SHIGEMASA, 1996).

A quitosana é insolúvel em soluções neutras e alcalinas, porém em soluções ácidas diluídas de ácido clorídrico, acético e perclórico, se torna solúvel, devido à protonação dos grupos aminos, tendo como resultado uma carga positiva, assim a solubilidade da quitosana depende da quantidade de grupos N-acetil presentes na cadeia do polissacarídeo (KEAN, 2010).

A utilização da quitosana como biomaterial é baseada em suas inúmeras propriedades, dentre elas destacam-se: biocompatibilidade e baixa toxicidade; biodegradabilidade; potencial formador de complexos poliméricos com polieletrólitos aniônicos tais como proteínas, e outros polímeros; é passível de modificações químicas e é também um material que pode ser trabalhado em diversas formas, como: gel, membranas, esponjas e solução. Além disso, possui boas propriedades cicatrizantes e efeito bacteriostático (KUMAR, 2000).

## 2.2 LACTATO DE QUITOSANA

O lactato de quitosana tem sido utilizado em várias aplicações biomédicas, destacando-se os curativos para feridas e membranas para a odontologia (FENG, 2005). Entretanto, estudos recentes demonstram que, similarmente a outros polímeros catiônicos, do lactato de quitosana apresenta significativa citotoxicidade dependente da concentração do biopolímero (BAE, 2009; FENG, 2005).

Por esse motivo, vários derivados de quitosana têm sido pesquisados quanto à sua citotoxicidade, observando-se que o lactato de quitosana apresenta propriedades não citotóxicas bem superiores a outros derivados da quitosana (QUEIROZ, 2003). Nesse caso, a redução na citotoxicidade parece ser devido a uma redução da interação das cargas positivas do biopolímero com as membranas celulares

carregadas negativamente, que leva ao vazamento de proteínas e outros constituintes celulares (JUNG, 1999).

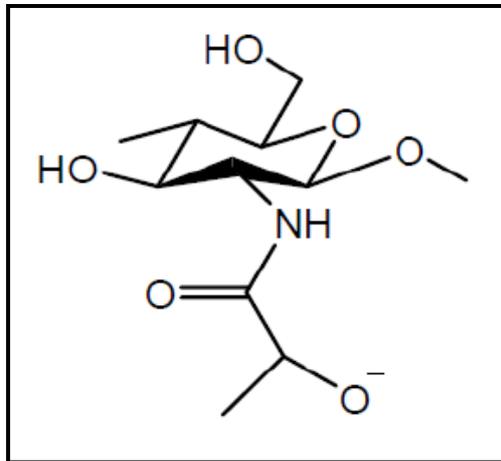


Figura 2 - Estrutura química do lactato de quitosana. Fonte: Autoria própria.

O lactato de quitosana vem sendo estudado na forma de filmes hidrocolóides tendo em vista as aplicações de embalagem com atividades bactericida, sendo mais efetiva contra bactérias gram-positivas, como também possui atividade fungicida. (KOWALCZYK, 2015).

### 2.3 SULFATO DE CONDROITINA

O Sulfato de condroitina (SC) é um componente estrutural de ligações dos tecidos e também um componente da matriz de cartilagem, pertencente à família dos glicosaminoglicanas GAGs, sendo caracterizado como um copolímero alternado dos monômeros  $\beta$  (1,4)-D-ácido-glucurônico e  $\beta$ (1,3)-N-acetil-D-galactosamina que podem ser sulfatados nos carbonos C4 ou C6. A condroitina-4-sulfato é chamada de sulfato de condroitina A e a condroitina-6-sulfato é chamada de condroitina C (FAJARDO, 2009). Esses isômeros possuem uma distribuição diferenciada, relacionada com o estado de saúde do organismo, com a idade e com o tecido (SANTOS,2012).

Dentre as propriedades do sulfato de condroitina se destacam a biodegradabilidade, biocompatibilidade e solubilidade em água, combinadas com a sua habilidade na formação de hidrogéis, isso faz com que sejam muito promissoras

para engenharia de tecidos e aplicações em liberação de fármacos (NAIR e LAURENCIN, 2006).

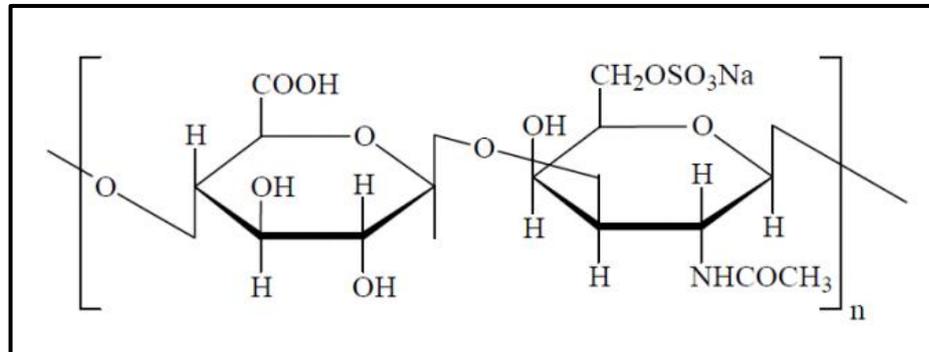


Figura 3 - Estrutura da unidade repetitiva do Sulfato de Condroitina (PIAI, 2008).

As GAGs são subdivididas em (PEREIRA e CARVALHO, 2009): 1. Hialuronas ou ácido hialurônico; 2. Sulfato de Condroitina e Sulfato de Dermatana; 3. Sulfato de Heparana; 4. Sulfato de Queratana. As GAGs, exceto a hialurona, ligam-se covalentemente a um núcleo proteico para formar a Proteoglicana, referenciado na Figura 4. As proteoglicanas absorvem facilmente a água, contribuindo assim para a formação do líquido sinovial, a estabilidade e suporte do tecido conjuntivo, colaborando ainda para a manutenção do volume de água e com a distribuição de eletrólitos por todo o organismo (PERRIMON e BERNFIELD, 2001) (IOZZO e SCHAEFER, 2015).

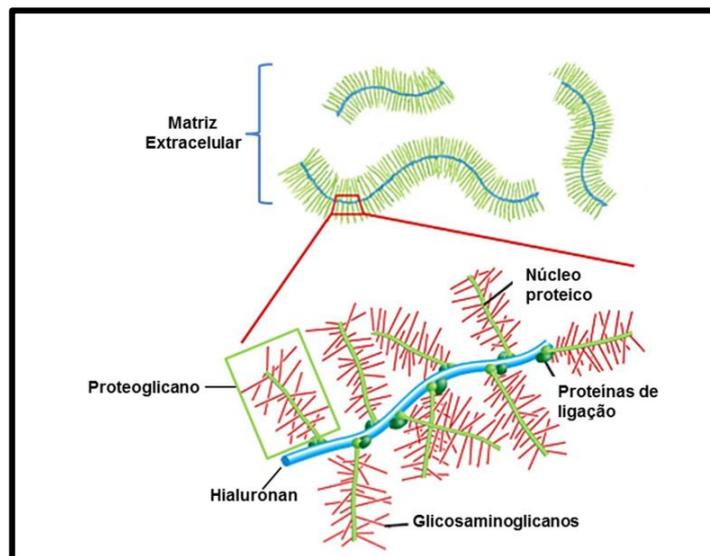


Figura 4 - Agregados Supramoleculares de proteoglicanas. Adaptado de (ALBERTS, et al, 2010)

Devido a presença de grupos funcionais ativos como  $-\text{COO}^-$  e  $-\text{SO}_3^-$ , como mostrado na Figura 3, estes facilitam o acesso às funcionalidades biológicas, os quais têm sido estudados para aplicações no reparo de cartilagem “*in vivo*”. O sulfato de condroitina é uma molécula abundante na matriz do tecido conjuntivo estando envolvido em vários processos patológicos e também fisiológicos, com isso este polímero se apresenta como bom candidato a carregador de fármacos (PIAI, 2008).

O sulfato de condroitina oferece resistência à compressão de tecidos conjuntivos, regulando seu conteúdo de água, e possui características como alta absorção de água, alta estabilidade, baixa toxicidade, flexibilidade para modificação química e possui baixo custo (DIAS, 2008) (OPREA, CIOLACU, et al., 2010).

O sulfato de condroitina é um componente substituto da camada dérmica da pele aprovado pela FDA – Food and Drug Administration, do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do governo americano, responsável pelo controle de novos medicamentos, cosméticos ou quaisquer outras substâncias afins (CHENG, HUNG, et al., 2014).

Logo associações de SC com outros polímeros naturais como a quitosana, vem sido amplamente estudadas, principalmente na área de síntese de nanocompostos poliméricos, como potencial para liberação controlada de fármacos. (PIAI, 2008).

## 2.4 NANOPARTICULAS DE PRATA

A nanopartícula de prata (NP<sub>Ag</sub>) em sua forma coloidal remota ao século XIX, onde a mesma era sintetizada a partir de citratos, as primeiras nanopartículas possuíam estabilidade coloidal e diâmetro médio em torno de 10 nm. (VARNER, 2010). Atualmente diversos artigos publicados ainda utilizam a estabilização por citratos uma vez que estes promovem a dimensão na escala nano. Além disso, outro agente utilizado e documentado são as proteínas, há relatos que remontam a 1902. Um material denominado “Collargol”, uma espécie de nanopartículas com tamanho de partícula de 10 nm, foi produzida comercialmente e utilizada em aplicações médicas desde 1897. Nas décadas seguintes foram descobertas outras preparações com NP (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

A prata já era utilizada como agente antimicrobiana e em doenças infecciosas, cerca de 30 anos antes da descoberta da penicilina, em 1928 (VARNER, 2010).

O método de produção de nanopartículas (NPs), estabilizadas por citratos e conhecido como método Turkevich foi primeiramente usado para a síntese de nanopartículas de ouro, onde se fazia a redução de ácido cloroáurico com citrato de sódio esses eram dissolvidos em água e então aquecidos até a ebulição. Esse método, desenvolvido em 1951, sintetizou nanopartículas de ouro, de forma esféricas e com distribuição de tamanho médio de 20 nm (KRUTYAKOV et al., 2008). Mais tarde, o método de Turkevich foi utilizado por Lee e Meisel na síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em água, porém as nanopartículas obtidas apresentavam formas heterogêneas e distribuição de tamanho médio na faixa de 60 a 200nm (KRUTYAKOV et al., 2008).

O método Turkevich apresenta as vantagens dos íons citrato atuarem simultaneamente como agente estabilizador das NPsAg e agente redutor (PACIONI et al., 2015). Na década de 50 os estudos referentes as NPsAg foram continuadas sem a estabilização por citrato, onde Moudry estabiliza as NPsAg em gelatina, obtendo um tamanho médio entre 2-20 nm, melhorando assim a heterogeneidade das NPs (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). As NPsAg são também impregnadas em carbono, obtendo tamanho médio em torno de 25 nm. Assim em 1954 as NPsAg são registradas nos Estados Unidos como um biocida e até os dias atuais esse material tem sido utilizado para este fim.

Com o aperfeiçoamento da produção da prata em escala nanométrica, houve um aumento na sua eficácia no controle de vírus e bactérias, esse aumento é decorrente da grande área superficial das nanopartículas e, conseqüentemente, maior contato com os microrganismos. Os sistemas de transferência de elétrons, o metabolismo celular e o transporte do substrato na membrana celular de uma célula microbiana são afetados pelas NPsAg (HEIGHT, 2011).

Cerca de 30% dos nano produtos comercializados nos dias atuais possuem a NPsAg em sua composição (REIDY et al., 2013). Além da crescente aplicação comercial, recentemente o número de publicações em revistas internacionais relacionados com nanopartículas metálicas cresceu exponencialmente. O número de publicações com estudos envolvendo NPsAg aumentou em 93% no intervalo de 2001 a 2011. Durante este período, em 2001 foram publicados 247 artigos, enquanto que em 2011 o número de artigos foi de 3603. O número de pedidos de patentes sobre

nanocompósitos e síntese de NPsAg também aumentou consideravelmente nos últimos anos (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

A interação entre as NPsAg e corpo humano não são totalmente esclarecidos, mas, segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana, a Environmental Protection Agency (EPA), uma concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{Kg-dia}$  não é tóxica as células humanas (SANTOS, 2011).

A síntese de nanopartículas de prata utilizando o sulfato de condroitina (SC) como agente redutor/estabilizador é conhecida em diversos trabalhos uma vez que evitam o uso de químicas tóxicas, tornando a síntese biocompatíveis (CHENG, et al, 2014; YOUNG, et al, 2018).

A técnica mais utilizada para comprovar a formação das nanopartículas de prata é a espectroscopia de absorção no ultravioleta, isso é devido a banda de ressonância plasmônica de superfície (Surface Plasmon Resonance – SPR), a banda de plasmon consiste do fato que nas superfícies das nanopartículas metálicas há um grande número de elétrons livres, e esses elétrons livres ao oscilarem coletivamente frente a alta energia provida pela absorção no ultravioleta geram o fenômeno do plasmon superficial, responsável pelas mudanças na coloração das nanopartículas (MANJUMEENA R., et al, 2013).

As excitações coletivas dos elétrons quando da incidência de uma radiação eletromagnética sobre a nanopartículas, induzem a formação de dipolos e promovem a polarização da nanopartículas, Figura 5, (MANJUMEENA R., et al, 2013).

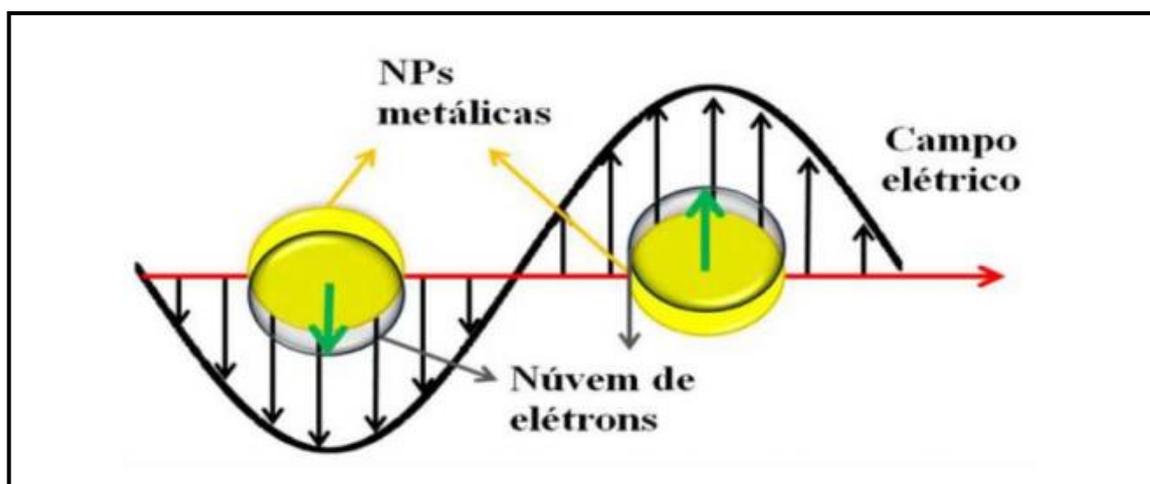


Figura 5 – Oscilação de Plasmon das NPs metálicas em resposta a um campo eletromagnético (MONCK, J. J., et al., 2002).

No momento em que o campo elétrico, proveniente da radiação eletromagnética, atua na NP, a nuvem de elétrons sofre um deslocamento em relação aos núcleos e as cargas positivas agem juntas como uma força restauradora, de origem coulombiana, fazendo com que os elétrons oscilem coerentemente. Para que haja momento de dipolo é indispensável que a nuvem de elétrons oscile na mesma frequência que o comprimento de onda da radiação incidente. Quando um fóton da radiação incidente entra em ressonância com a oscilação coletiva dos elétrons de condução, a absorção ocorre. Cada comprimento de onda produz uma oscilação diferente na nuvem eletrônica, podendo ser ressonante ou não. A banda de absorção dos plasmons superficiais pode ser observada num espectro de absorção óptico linear obtido a partir da absorção na região do UV-Vis (MONCK, J. J., et al., 2002).

A medida do alargamento e também do deslocamento das bandas determinam o tamanho das nanopartículas e assim podem determinar a distribuição de tamanho dessas nanopartículas. As NPsAg apresentam pico intenso de absorção nos comprimentos de onda variando de 400 a 500 nm. (MACHADO, 2012).

## 2.5 CURATIVOS PARA TRATAMENTO DE FÉRIDAS

Existe no mercado muitos produtos para tratar feridas, sendo os curativos mais eficientes aqueles que têm as seguintes características (THOMAS, 2002):

- a) Proteção da ferida de uma infecção secundária.
- b) Ambiente úmido para cicatrização da ferida.
- c) Isolamento térmico.
- d) A retirada do curativo não pode causar trauma à ferida.
- e) Remove a drenagem e restos celulares.
- f) Ser isento de partículas e produtos tóxicos.

No protocolo clínico para o tratamento de feridas a escolha do curativo é de grande importância. O curativo pode ser apenas primário ou fármaco, e quando necessário se recomenda também o uso de um curativo secundário.

Recomenda-se o uso do curativo secundário quando seja necessário proteger de microrganismos a ferida, através de uma barreira mecânica, ou para fixar o curativo primário que geralmente não é auto aderente à pele. As características do curativo

secundário são: proteger a ferida, propriedades absorventes, não aderir à ferida, facilitar a cicatrização, respirável e poroso (THOMAS, 2002).

Também existem os curativos especiais, que são aqueles desenvolvidos para uma proposta específica, entre eles podemos citar (FRANCO, 2007):

- a) Curativos com hidro coloides: estimula a angiogênese e o desbridamento autolítico, acelerando o processo de granulação tecidual;
- b) Curativos com hidrogéis: amolece e remove tecido desvitalizado através de desbridamento autolítico, mantém o meio úmido e estimula a liberação de exsudato;
- c) Curativos com alginato de cálcio: o sódio presente no exsudato e no sangue interage com o cálcio, através de uma troca iônica que auxilia no desbridamento autolítico, e resulta na formação de um gel que mantém o meio úmido para a cicatrização e induz a hemostasia;
- d) Curativos com carvão ativado (contém nitrato de prata 0,15%): o carvão ativado absorve o exsudato e filtra o odor e a prata exerce ação bactericida;
- e) Curativo adesivo de hidropolímero: ambiente úmido, estimula o desbridamento autolítico, absorve o exsudato expandindo-se.

Em ferimentos graves, onde a superfície epidérmica precisa de um complexo processo de cicatrização após a lesão. Recomenda-se o uso de curativos secundários e/ou especiais que cumpram com as características inicialmente mencionadas, é dizer: alto teor de umidade, oxigenação no local da ferida, controle de inflamação, proliferação de fibroblastos e controle microbiano. A quitosana devido a sua estrutura e propriedade antimicrobiana é um material eficiente para a preparação de curativos secundários e/ou especiais (AHMAD, 2017).

Quando a quitosana é preparada por eletrofiação as propriedades para a cicatrização de feridas se potencializam (AHMAD, 2017). A incorporação de um fármaco ou princípio ativo ao curativo, visa aumentar as propriedades antimicrobianas, permitindo aumentar a eficiência e o tempo de uso do curativo na ferida, diminuindo o período de troca.

Nos sistemas de carregamento de fármacos baseados em nanofibras, o fármaco é adsorvido na enorme área superficial, podendo ser futuramente liberado,

de forma controlada, tornando-se mais eficaz no tratamento, pois sendo a liberação de forma controlada tem se uma maior ação terapêutica. (SOUSA, 2009)

Por definição, o termo “sistema de liberação de fármacos”, também conhecido como *Drug Delivery Systems* (DDS), refere-se à tecnologia utilizada para aperfeiçoar a liberação de um fármaco, onde o princípio ativo deve ser liberado de forma controlada, melhorando a resposta terapêutica (SOUSA, 2009). O controle envolve prolongar o tempo de liberação do fármaco na ferida, mantendo a sua concentração plasmática, sendo que a dose do medicamento deve sempre estar dentro do limite da ação terapêutica. (VILLANOVA, 2010).

O grande problema em se utilizar as formas convencionais de administração é que o fármaco ao ser colocado em contato com o organismo, inicia sua ação terapêutica, chegando rapidamente a um pico máximo de ação, e em alguns casos pode ultrapassar o limite máximo, chegando ao nível tóxico, ocasionado dano ao organismo, e subseqüentemente decaindo até atingir o nível subterapêutico, onde não ocorre a ação terapêutica, conforme Figura 1. Assim, doses repetitivas do fármaco são necessárias para manutenção do efeito terapêutico e conseqüente realização eficaz do tratamento a que se destina (NAIR, 2006).

Utilizando a liberação controlada de fármaco, pode se manter o seu nível terapêutico e com isso reduzir a toxicidade ao organismo. Assim facilitando a absorção do mesmo, e gerando uma economia significativa, pois se reduz a quantidade de fármaco aplicada ao paciente e também o tempo do tratamento clínico (LANGER, 2011).

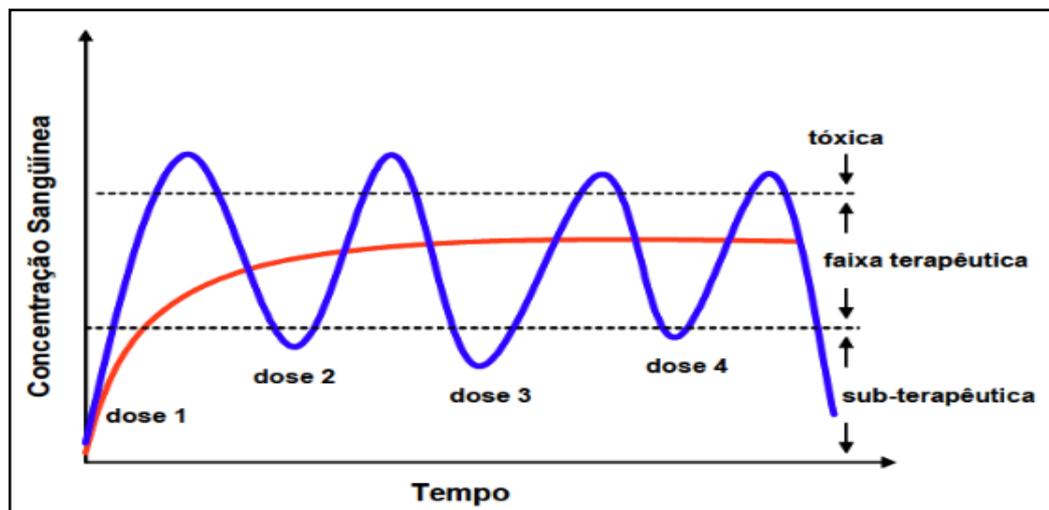


Figura 6 - Liberação de um fármaco modelo com o tempo; sistema convencional — e sistema de liberação controlada —. Fonte: (PRIMO, 2006).

O sistema de carregamento de fármacos baseado no uso de nanofibras envolve mecanismos de liberação controlados por: difusão, reações químicas ou ativação do solvente (LANGER, 2011).

Sistemas controlados por difusão envolvem um processo simultâneo de absorção de água e desorção do fármaco através do intumescimento das nanofibras. Assim, a liberação controlada do fármaco é baseada no princípio que a taxa de dissolução da partícula do fármaco aumenta com o aumento da área superficial tanto do fármaco quanto da matriz (HUANG, 2003). A difusão, a nível macroscópico, obedece à equação semi empírica dada pela Lei de Fick da difusão. (PEPPAS e LANGER, 2003).

## 2.6 MODELO MATEMATICO PARA A ANALISE DO MECANISMO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FARMACOS

O transporte de um fármaco a partir de uma matriz, seja ela polimérica, cerâmica ou outra, é um fenômeno muito complexo que depende de inúmeros fatores. Os experimentos de liberação *in vitro* têm a finalidade de simular de maneira aproximada as condições fisiológicas do corpo humano (pH, temperatura, fluido biológico, etc.), para estudar o mecanismo e cinética de liberação do fármaco no organismo, uma vez que os modelos matemáticos tornam o entendimento da cinética do fármaco mais simples (PEPPAS, 2003).

A interpretação dos resultados experimentais se torna mais simples uma vez que utilizamos os diversos modelos matemáticos existentes. Entre os inúmeros modelos existentes na literatura, foi utilizado no presente trabalho o modelo de Korsmeyer- Peppas.

### 2.6.1 MODELO DE KORSMEYER- PEPPAS

O modelo proposto por Korsmeyer- Peppas tem sua validade comprovada para diferentes sistemas de liberação, com diferentes geometrias, até um limite máximo de absorção da matriz de 25 % de seu volume original.

A equação pode ser representada por: (ABRAHAM, 2001):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  é a razão entre a massa do fármaco liberada no tempo  $t$  e no infinito  $\infty$ ,  $k$  é a constante que depende das características do sistema formada entre polímero e o meio de dissolução e  $n$  é o coeficiente de difusão.

Fazendo a linearização da Equação 1, obtemos:

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln k + n \ln t \quad \text{Equação 2}$$

Assim, a representação de  $\ln \frac{M_t}{M_\infty}$  em função de  $\ln t$  fornece uma reta, a partir da qual se calcula os valores de  $k$  e  $n$ .

Como mostra a Tabela 1, a partir do valor do coeficiente de difusão ( $n$ ) e da geometria da amostra, pode ser estimado o tipo de mecanismo de liberação para o sistema sob as condições experimentais estudadas.

Tabela 1 - Valores do coeficiente difusão ( $n$ ) (RITGER, 1987).

Valores do Coeficiente Difusional $n$			Mecanismo de Liberação
Filmes ou blocos finos	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89		Difusão do tipo II (Relaxamento macromolecular)

## 2.7 ELETROFIAÇÃO

A produção de nanofibras relaciona-se diretamente com a nanotecnologia, promovendo o seu desenvolvimento em diversas áreas de pesquisa como a eletrônica, física, química, medicina, biologia e a engenharia de materiais. Motivada pelas aplicações nestas áreas, a comunidade científica tem revelado especial interesse na fabricação de nanofibras poliméricas nos últimos anos (SONG ET AL,

2008). Um dos métodos mais versáteis para a produção de estruturas nanofibrosas é a eletrofiação (SONG ET AL, 2008; GARG; BOWLIN, 2011).

Esta técnica permite produzir fibras de polímeros com diâmetros nanométricos utilizando campos elétricos. Esta técnica de alta magnitude atraiu maior atenção devido à ampla variedade de aplicações biomédicas, vestuários de proteção, scaffolds para engenharia de tecido, biotecnologia, compósitos, equipamentos eletrônicos, defesa e segurança, engenharia ambiental e outras áreas (BHARDWAJ, KUNDU, 2010; KULKARNI ET AL, 2010; GARG; BOWLIN, 2011). Nanofibras produzidas a partir do processo de eletrofiação apresentam vantagens, tais como alta área superficial, flexibilidade para uma grande variedade de formas e tamanhos e a capacidade de controlar a composição de nanofibras para alcançar os resultados desejados a partir de suas propriedades e funcionalidades. (BHARDWAJ, KUNDU, 2010; KULKARNI ET AL, 2010; GARG; BOWLIN, 2011).

O termo “eletrofiação” é derivado de “fiação eletrostática”. Três componentes são necessários para o processo: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar com uma agulha de pequeno diâmetro e uma placa coletora ligada à terra.

A alta voltagem é necessária para criar um jato carregado eletricamente com solução de polímero para fora da agulha. Um eletrodo está fixado a uma agulha ligado a uma seringa carregada com a solução polimérica e outro está fixado ao coletor ligado a terra. O campo elétrico é aplicado na extremidade do tubo capilar contendo o fluido, isto induz uma carga sobre a superfície do líquido. Repulsão mútua de carga e a contração das cargas superficiais causam uma força diretamente oposta à tensão superficial. À medida que a intensidade do campo elétrico é aumentada, a superfície do fluido na ponta do tubo capilar alonga para formar uma forma cônica chamada “Cone de Taylor” (SILL, RECUM, 2008, BHARDWAJ, KUNDU, 2010; KULKARNI ET AL, 2010; GARG; BOWLIN, 2011)

O jato é estável somente na ponta da agulha, depois disso, o jato apresenta instabilidade a caminho do coletor, com carga elétrica oposta. No tempo entre a saída da seringa e o depósito no coletor, o solvente apropriado evapora e as fibras secas são depositadas na placa coletora como uma rede interconectada (SCHUEREN ET AL, 2010). A fibra coletada normalmente se apresenta na forma de uma manta (BHARDWAJ, KUNDU, 2010, GARG; BOWLIN, 2011).

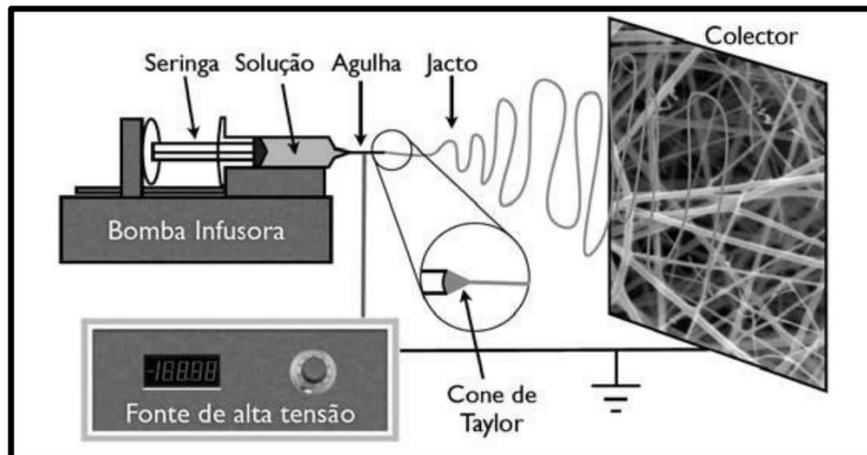


Figura 7 - Representação do aparelho para a técnica de eletrofiação (FRANCO et al, 2010).

O processo de eletrofiação envolve um estiramento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente. Deste modo, as cadeias poliméricas emaranhadas experimentam uma forte força de cisalhamento durante o processo de eletrodeposição e solidificam rapidamente quando atingem a placa coletora, impedindo a sua volta às condições de equilíbrio (RAMAKRISHNA ET AL, 2005). Embora o princípio de funcionamento da eletrofiação seja simples, existem diversos parâmetros de processamento que podem influenciar o formato, o diâmetro e as dimensões das fibras. (SILL; RECUM, 2008).

### 2.7.1 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

O processo de eletrofiação depende de muitos parâmetros associados, classificados amplamente em parâmetros de solução, parâmetros de processo, e os parâmetros ambientais. Estes parâmetros podem influenciar a transformação das soluções de polímeros em nanofibras através da eletrofiação (THOMPSON ET AL, 2007; KULKARNI ET AL, 2010). Os principais parâmetros da solução são: viscosidades, tensão superficial e condutividade elétrica; os principais parâmetros do processo são: tensão aplicada, a vazão e a distância da ponta da agulha à placa coletora; os parâmetros ambientais englobam a umidade e temperatura do ambiente.

### 2.7.1.1 PARÂMETROS DA SOLUÇÃO

As propriedades da solução, incluindo a tensão superficial, massa molecular do polímero, concentração, viscosidade, volatilidade e condutividade elétrica, têm uma importante influência no processo de eletrofiação e na morfologia das fibras. A tensão superficial desempenha um papel importante na formação de defeitos ao longo da extensão da fibra. A viscosidade da solução e a condutividade elétrica determinam a extensão do alongamento do jato fibroso que, por sua vez, tem influência sobre o diâmetro das fibras. Contudo, os efeitos das propriedades da solução são difíceis de isolar, uma vez que a alteração de um parâmetro pode afetar as outras propriedades da solução. Por exemplo, a variação da concentração afetará a tensão superficial, como também a viscosidade. (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

### 2.7.1.2 VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO

A viscosidade é a medida da resistência ou fricção interna de uma substância ao fluxo/escoamento quando se encontra sujeito a uma tensão tangencial. No sistema internacional, a unidade de viscosidade  $\eta$  é pascal segundo (Pa.s). Contudo, a unidade de viscosidade mais usada em artigos de investigação é o poise (P), em homenagem ao fisiologista francês Jean Louis Poiseuille (1799 – 1869). Geralmente, a viscosidade da solução está relacionada com o grau de emaranhamento das cadeias moleculares do polímero na solução. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer electrospinning (formação de micro gotas), em vez do jato fibroso. Com baixa viscosidade, onde geralmente as ligações da cadeia polimérica são de menor intensidade, há uma maior probabilidade de obter fibras onduladas, em vez de fibras lisas. Portanto, fatores que afetam a viscosidade da solução também afetarão o processo e as fibras dele resultante (KULKARNI ET AL, 2010).

Uma das condições necessárias para a eletrofiação ocorrer com formação das fibras, é que um polímero em solução tenha uma massa molecular adequada, além da viscosidade da solução. A viscosidade da solução desempenha um papel importante na determinação do tamanho e morfologia durante a fiação de fibras poliméricas. Como o jato sai da ponta da agulha durante a eletrofiação, a solução de polímero é estirada e viaja até a placa coletora (RAMAKRISHNA ET AL, 2005).

A massa molecular do polímero reflete no comprimento médio das cadeias poliméricas, tem um efeito direto na viscosidade da solução, já que esta será função do nível de emaranhamento das cadeias poliméricas no solvente. Similarmente ao aumento da massa molecular, um aumento na concentração irá resultar em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (RAMAKRISHNA ET AL, 2005).

A viscosidade, a concentração de polímero e a massa molecular do polímero está correlacionadas umas com as outras. As soluções de polímero de viscosidade muito altas, geralmente exibem estresse de relaxamento, o que poderia impedir a fratura dos jatos ejetados durante o processo de eletrofiação ou a solução pode secar na ponta da agulha, antes da eletrofiação ser iniciada. Um aumento na viscosidade ou concentração da solução dá origem a uma fibra com maior diâmetro e mais uniforme. Para a solução de baixa viscosidade é comum encontrar contas depositadas ao longo das fibras, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias entrelaçadas, o que faz com que a tensão superficial seja um fator dominante do sistema ao longo do jato eletrofiado gerando instabilidade do mesmo e apenas contas ou fibras com contas são formadas, enquanto acima de uma concentração crítica, uma estrutura fibrosa contínua é obtida e a sua morfologia é afetada pela concentração da solução.

Em conjunto, os estudos indicam que existem polímero específicos, e valores de viscosidade ótima para eletrofiação e essa propriedade tem uma influência marcante sobre a morfologia das fibras (RAMAKRISHNA ET AL, 2005; KULKARNI ET AL, 2010).

### 2.7.1.3 TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial refere-se à tensão aproximada na camada superficial de um fluido. Quando a solução se encontra num estado de equilíbrio, as moléculas no interior dessa solução são solicitadas igualmente em todas as direções pelas forças de atração das moléculas vizinhas. As moléculas da superfície do fluido sofrem apenas atração lateral e inferior. Devido à interação conjunta destas forças, existe uma tensão na superfície que faz a mesma comportar-se como uma membrana

elástica (MOORE, 1976). As unidades da tensão superficial representam-se pela força exercida numa superfície por unidade de comprimento (N/m). Um fluido em contato com uma superfície sólida toma uma forma, determinada pela relação entre três forças: a força da gravidade, a força da interação entre as suas moléculas (forças de coesão) e a força de interação entre essas moléculas e as partículas da superfície sólida (forças de aderência) (MOORE, 1976).

Na eletrofiação, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. A tensão superficial é uma função da composição dos solventes da solução que desempenha um papel crítico no processo de eletrofiação. Com a redução da tensão superficial de uma solução, fibras podem ser obtidas sem grânulos. Diversos solventes podem contribuir com diferentes tensões superficiais. Geralmente, a alta tensão superficial de uma solução inibe o processo de eletrofiação por causa da instabilidade dos jatos e a geração de gotas pulverizadas (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

A formação de gotículas e fibras depende da tensão superficial da solução e uma tensão superficial menor da solução ajuda na fiação para ocorrer em um menor campo elétrico no processo de eletrofiação. No entanto, não necessariamente uma tensão superficial menor de um solvente será sempre mais adequada para eletrofiação. Basicamente, a tensão superficial determina os limites superior e inferior do processo de eletrofiação se todas as outras variáveis são mantidas constantes (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

#### 2.7.1.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

A condutividade de uma solução é determinada pela capacidade de movimento (em massa) dos íons  $H^+$  presentes na solução ou ainda, a facilidade com que a solução é capaz de conduzir uma corrente elétrica (MOORE, 1976). O pH da solução pode ser influenciado pela concentração de íons  $H^+$  presentes, pois gera valores menores de pH, com isso a condutividade elétrica tende a aumentar com a maior concentração de íons dissolvidos (ZILLMER, 2007).

Quando uma diferença de potencial é aplicada a um determinado volume de solução, a intensidade da corrente que flui pela solução será proporcional à quantidade de íons presentes. Nota-se que soluções com alta condutividade terão

maior capacidade de carga do que soluções com baixa condutividade. No primeiro caso, o jato fibroso, na presença de um campo elétrico, submete-se a uma força eletrostática maior do que no segundo (resultado do somatório de todas as forças de cada carga) (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Condutividade elétrica da solução é determinada principalmente pelo tipo de polímero, solvente utilizado, e da disponibilidade de sais ionizáveis. Verifica-se que com o aumento da condutividade elétrica da solução, existe uma diminuição significativa no diâmetro das nanofibras eletrofiadas, enquanto que com baixa condutividade da solução, resulta em alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para produzir fibras uniformes e livres de grânulos (KULKARNI ET AL, 2010).

Em síntese, geralmente, o aumento da condutividade elétrica da solução ou a densidade de cargas é usado para reduzir e uniformizar o diâmetro das fibras e, ao mesmo tempo, diminuir o número de defeitos (BHARDWAJ, KUNDU, 2010). A adição de sal iônico demonstra efeito sobre a morfologia e diâmetro das fibras eletrofiadas. Sais iônicos tais como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , e  $\text{NaCl}$  produzem fibras livres de grânulos e com diâmetros relativamente menores que variam de 200 a 1000 nm (KULKARNI ET AL, 2010).

## 2.8. OS PARÂMETROS DO PROCESSAMENTO

### 2.8.1. TENSÃO APLICADA

Os investigadores têm sugerido que, quando maior tensão são aplicadas, não há mais ejeção de polímero e isto facilita a formação de uma fibra de diâmetro maior (ZHANG ET AL, 2005). Outros autores relataram que um aumento na tensão aplicada (isto é, através do aumento da intensidade do campo elétrico), aumenta a força eletrostática repulsiva sobre o jato de fluido que em última análise, favorece a diminuição do diâmetro da fibra.

Na maioria dos casos, uma tensão mais elevada provoca um maior alongamento da solução devido à maiores forças eletrostáticas no jato, bem como um forte campo elétrico e estes efeitos conduzem a uma redução no diâmetro da fibra e também uma rápida evaporação do solvente a partir dos resultados da formação de fibras em uma tensão mais alta. Há também uma maior probabilidade de formação de

defeitos. Assim, a tensão influencia o diâmetro da fibra, mas o nível de significância varia com a concentração da solução de polímero concentração da solução e da distância entre a ponta e a placa coletora (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

### 2.8.2 VAZÃO

A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofiação. Na literatura, o número de estudos relacionados com este parâmetro é muito limitado, contudo, relacionam o fluxo da solução com a dimensão e a morfologia das fibras. Em geral, o aumento da vazão favorece o aumento diâmetro da fibra, muito embora exista um limite do diâmetro para o sucessivo aumento da vazão. Vazões elevadas também podem originar fibras com defeitos, devido à elevada quantidade de solvente que deve evaporar antes de alcançar placa coletora (MEGELSKI ET AL, 2002).

O impacto da vazão da solução é também relatado na morfologia das fibras, na porosidade e a geometria. Além disso, para vazões elevadas, a evaporação revela-se incompleta, conduzindo à formação de fibras achatadas, em vez de fibras com secção circular (MEGELSKI ET AL, 2002).

Do mesmo modo, o sucesso da eletrofiação depende também do equilíbrio deste parâmetro, uma vez que quantidades insuficientes ou excessivas impossibilitam a sua realização. No primeiro caso, o Cone de Taylor na extremidade do capilar não se mantém, caso o fluxo se revele insuficiente para substituir a solução projetada ao coletor. No segundo caso, as forças do campo elétrico são impedidas de atuar (na orientação do jato) perante fluxos elevados de solução. Quando isto acontece, a gota que origina o jato desprende-se pela ação da gravidade, sem antes sofrer orientação elétrica (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

### 2.8.3 DISTÂNCIA DA AGULHA À PLACA COLETORA

Uma distância mínima é necessária para dar as fibras tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora, caso contrário, com distâncias que são próximas ou demasiado longe, os grânulos têm sido observados (SILL, RECUM, 2008; KULKARNI ET AL, 2010). Um importante aspecto físico da eletrofiação

de nanofibras é a evaporação do solvente utilizado para dissolver o polímero, assim, deve haver distância ótima entre a ponta da agulha e a placa coletora que favoreça este processo para melhorar a produção de nanofibras livres de grânulos (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

#### 2.8.4 PARÂMETROS AMBIENTAIS

Além de parâmetros de solução e de processamento, há também parâmetros ambientais que incluem umidade e temperatura, estes têm sido conduzidos para examinar os efeitos de parâmetros ambientais sobre o processo de eletrofiação. Com o aumento da temperatura, há um rendimento de fibras com diminuição do diâmetro e atribuem esse declínio devido a diminuição da viscosidade das soluções do polímero com o aumento da temperatura. Há uma relação inversa entre viscosidade e temperatura (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

Aumentando a umidade pode ocorrer um surgimento de pequenos poros circulares na superfície das fibras, aumentando ainda mais a umidade, conduz coalescência aos poros. Verifica-se que em níveis muito baixos de umidade, um solvente volátil pode secar rapidamente com a evaporação do mesmo. Em consequência, o jato necessita de mais tempo para secar. Por outro lado, a liberdade de movimento das cadeias poliméricas é maior perante temperaturas elevadas, resultando na menor viscosidade da solução (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

Pelo princípio de funcionamento da eletrofiação, a condutividade elétrica aplicada durante o processo é responsável pelo prolongamento e distensão do jato polimérico. Como tal, esta distensão é contrariada pelas forças viscosas, em conjunto com a tensão superficial. Se a viscosidade da solução diminuir em função de uma temperatura mais elevada, a taxa de distensão aumenta e consequentemente formam-se fibras de diâmetros menores. Assim, a partir da solução e parâmetros de processamento, os parâmetros ambientais também podem afetar o processo de eletrofiação (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

### 2.8.5 OS SOLVENTES UTILIZADOS PARA ELETROFIAÇÃO

O solvente utilizado na preparação de soluções de polímero tem como objetivo influenciar na sua fiação, porque o primeiro passo e mais importante no processo de eletrofiação é a dissolução do polímero num solvente adequado. Os solventes devem ter algumas propriedades, tais como, boa volatilidade, pressão do vapor do jato, temperatura de ebulição e deve manter a integridade da solução polimérica. Assim, para o sucesso do processo de eletrofiação um sistema de solvente apropriado é indispensável. A interação intermolecular de um sistema polímero-solvente (sistema binário) é e/ou atraente ou repulsivo que depende unicamente do tipo de solvente utilizado (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

No processo de eletrofiação, a evaporação rápida do solvente e a separação de fases ocorrem devido à pressão do vapor do jato, o solvente desempenha um papel crítico na determinação da taxa de evaporação e do tempo de secagem. A volatilidade do solvente também desempenha um papel significativo na formação de nanoestruturas uma vez que influencia o processo de separação de fases. A morfologia e o tamanho de nanofibras fiadas dependem fortemente das propriedades da solução, tais como, a viscosidade e tensão superficial (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

Diversos solventes podem contribuir para diferentes tensões superficiais. A viscosidade da solução é determinada pela concentração do polímero, mas o valor de tensão superficial depende tanto do polímero como do solvente, através da redução da tensão superficial de uma solução de polímero, as fibras podem ser obtidas sem grânulos, mas este deve ser aplicado com cautela. Tem-se reconhecido que a tensão superficial parece mais provável numa função de composições de solvente, mas é insignificamente dependente da concentração de polímero. Uma menor tensão superficial do solvente não é necessariamente sempre adequada para eletrofiação (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

As propriedades de solventes têm um efeito profundo sobre o diâmetro da fibra. Basicamente, o solvente desempenha dois papéis cruciais na eletrofiação: em primeiro lugar, dissolver as macromoléculas de polímero para formar o jato eletrificado e em segundo lugar para transportar as macromoléculas de polímero dissolvido em direção à placa coletora (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

Na eletrofiação espera-se que:

- 1) os diâmetros das nanofibras sejam consistentes e controláveis;
- 2) a superfície das nanofibras seja livre de defeitos ou com defeitos controláveis
- 3) as nanofibras contínuas sejam reproduzíveis.

No entanto, pesquisas têm demonstrado que estes três objetivos não são facilmente obtidos. Uma das propriedades mais importantes relacionadas no processo de eletrofiação é o diâmetro das fibras. Os diâmetros das fibras dependerão principalmente da espessura dos jatos, bem como sobre o conteúdo de polímero nos jatos (HUANG ET AL, 2003). Um problema notório encontrado em eletrofiação são os defeitos, tais como grânulos, isto ocorre em nanofibras de polímero. Verificou-se que a concentração do polímero também afeta a formação dos grânulos, reconheceu-se que maior concentração de polímero resultou em uma redução na presença de grânulos (HUANG ET AL, 2003).

## 2.9 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Do ponto de vista biológico, quase todos os tecidos e órgãos humanos são depositados em forma de nanofibras ou estruturas. Exemplos incluem: ossos, dentina, colágeno, cartilagem, pele. Todos eles são caracterizados por uma matriz organizada hierárquica de estruturas fibrosas realinhadas em escala nanométrica. Nas últimas décadas as pesquisas concentraram-se principalmente na fabricação de nanofibras para aplicações em bioengenharia. (HUANG ET AL, 2003). Um diagrama esquemático das aplicações de eletrofiação em vários campos é mostrado na Figura 8.

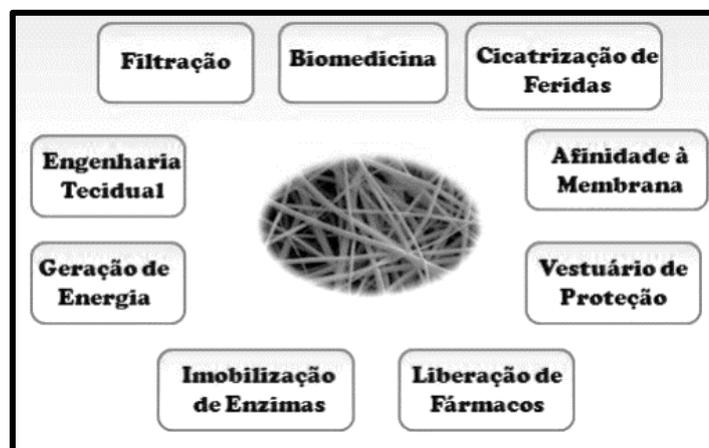


Figura 8 – Aplicações de fibras eletrofiadas em diferentes setores (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

## 2.10 PRÓTESES MÉDICAS

Nanofibras de polímero fabricadas via eletrofiação têm sido propostas para um número de aplicações em próteses de tecidos moles, tais como vasos sanguíneos, de mama, etc. Além disso, nanofibras fiadas de polímero biocompatível podem ser também depositadas como uma película fina porosa para um dispositivo de tecido duro protético concebido para ser implantado no corpo humano. Esta película de revestimento funciona como um dispositivo de estrutura fibrosa em interface entre a prótese e os tecidos do hospedeiro, e é esperado que reduza eficientemente o desgaste na interface tecido/dispositivo e, conseqüentemente, evite a falha do dispositivo após o implante (HUANG ET AL, 2003).

## 2.11 ENGENHARIA TECIDUAL

Para o tratamento de tecidos ou órgãos em mau funcionamento no corpo humano, um dos desafios para o campo de engenharia de tecidos/biomateriais é o projeto de scaffolds/matriz sintéticas que podem imitar a estrutura e funções biológicas da matriz extracelular (ECM). As células humanas podem se anexar e organizar em torno de fibras com diâmetros menores do que os das células. Portanto, scaffolds fibrosos em nanoescala podem proporcionar um modelo ideal para as células migrarem e crescerem ao seu redor. (CHEW, ET AL 2006, SILL, RECUM, 2008)

A regeneração bem-sucedida de tecidos e órgãos biológicos chama a atenção para o desenvolvimento de estruturas fibrosas com arquiteturas de fibras benéficas para deposição e proliferação celular. O interesse na engenharia de tecidos é voltado para a criação de scaffolds reprodutíveis e biocompatíveis resultando em biocompósitos de matriz para reparação tecidual e vários procedimentos de substituição (RECUM, 2008; KULKARNI ET AL, 2010).

Nanofibras de polímero também podem ser usados para o tratamento de feridas ou queimaduras da pele humana, bem como concebido para dispositivos hemostáticos com algumas características únicas. Com o auxílio do campo elétrico, fibras finas de polímeros biodegradáveis podem ser diretamente colocadas no local da ferida da pele para formar uma densa esteira fibrosa, que pode curar as feridas,

incentivando a formação de crescimento normal da pele. Membranas de nanofibras para curativos, normalmente têm tamanhos de poros que variam de 500 nm a 1 mm, suficientemente pequena para proteger a ferida da penetração bacteriana. A eficiência de um filtro aumenta com a diminuição de diâmetro da fibra (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

## 2.12 CITOTOXICIDADE

O teste de citotoxicidade *in vitro* analisa se um produto não ocasiona a morte celular e também se não afeta as funções celulares, se o produto cumprir a esses dois critérios, ele é aprovado no teste de citotoxicidade. A importância do teste de citotoxicidade se dá uma vez que os efeitos citotóxicos podem provocar danos celulares intensos e assim comprometer a viabilidade celular perturbando tanto a integridade estrutural e/ou metabólica das células bem como a sua integridade reprodutiva provocando uma série de efeitos destrutivos. Assim sendo, com o uso das técnicas de cultura celular, os testes podem detectar a inibição do crescimento celular, a ocorrência de lise das células e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas (DAGUANO et al., 2007).

Os testes *in vitro* se tornam uma ferramenta muito importante uma vez que se deseja partir para os testes *in vivo*, de maneira a diminuir o número de animais usados e, conseqüentemente, a diminuição da dor e sofrimento que os testes *in vivo* causam (VALADARES, 2006; VIEIRA, 2009; OECD, 2010). O parâmetro mais investigado pelos testes de citotoxicidade é a viabilidade celular, sendo determinada por diversos processos celulares (KROLL et al., 2009). Existem diversos testes que são utilizados para a avaliação da citotoxicidade, como o teste do corante vermelho neutro, o teste de libertação de enzimas citoplasmáticas como a lactato desidrogenase (LDH), o teste de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazólio (MTT). De entre os que apresentam informação sobre diferentes funções celulares como o teste do MTT ou o teste do vermelho neutro são os mais usados (KROLL et al., 2009; VICENTE, 2012).

### 2.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Tem sido um grande desafio para os pesquisadores, explicar o mecanismo de ação antimicrobiana das NPsAg. Ainda não está evidente se as NPsAg apresentam uma atividade antimicrobiana específica da partícula ou se a liberação de íons  $\text{Ag}^+$  a partir das NPsAg ou pela presença de íons  $\text{Ag}^+$  adsorvidos na superfície das NPsAg, que são responsáveis por essa ação. Em geral, os experimentos são realizados na presença de oxigênio e assim, NPsAg e íons  $\text{Ag}^+$ , estão presentes nessas condições (XIU, Z. M., et al., 2012; XIU, Z. M., et al., 2011; LOK, C. N., et al., 2007).

Dessa forma, não há uma única hipótese para a ação antimicrobiana das NPsAg. Estudos mostram que as NPsAg, assim como os íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) tendem a complexar com grupos tiol (-SH) presentes na membrana celular, causando um dano direto nessa, como o aumento da porosidade, que altera a sua permeabilidade, podendo levar a lise celular. (PAL, S., et al., 2007). Há indícios também, que os íons  $\text{Ag}^+$ , liberados a partir da NPsAg, podem interagir com grupos que contêm enxofre e fósforo de enzimas e proteínas vitais, tornando-as inativas. (PRABHU, S., POULOSE, E. K., 2012).

Outra hipótese nos diz, que as NPsAg e seus íons, no interior da membrana celular, ligam-se com o fósforo e enxofre presentes no DNA, provocando sua desnaturação e impedindo a divisão celular, levando a célula a morte. Outro fator que afeta a ação antimicrobiana das NPsAg, é o tamanho das mesmas. Com a redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica, há um grande aumento na área superficial por unidade de volume, assim a eficácia da ação antimicrobiana aumenta (BERNINI, et al., 2008; FENG, Q. L., et al., 2000; MORONES, J. R., et al., 2005; DAMM, C., et al., 2008).

A prata possui uma ação antimicrobiana conhecida desde os primórdios da civilização. Sua utilização na forma de nanopartículas potencializa esta propriedade e permite sua utilização em uma gama enorme de aplicações. A medicina tem demonstrado que a prata aniquila mais de 650 organismos patogênicos e não cria resistência. Tais características, associadas a baixo custo de produção, tornam as nanopartículas de prata eficaz contra microorganismos nocivos (DASTJERDI, 2009).

A associação do SC-NPsAg, é mostrada por Kim e colaboradores como tendo um alto potencial na cicatrização de feridas e atividade antibacteriana, mostrando um

aumento de cerca de 128 vezes da atividade antibacteriana contra *Enterobacter cloacae* e *Escherichia Coli* quando comparadas ao SC sozinho. Além disso, o estudo *in vivo* mostra que pomadas contendo o complexo SC-NPsAg estimulam a cicatrização de feridas e aceleram a deposição de tecido e colágeno na área ferida, mostrando seu potencial uso para estes fins (KIM, IM, et al., 2013).

## 2.14 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal desta tese foi a síntese de lactato de quitosana e preparação destas na forma de nanofibras para a liberação controlada do agente antimicrobiano, no caso do presente trabalho, o complexo formado pelo sulfato de condroitina e as nanopartículas de prata. Na revisão bibliográfica apresentamos de maneira sucinta a estrutura e principais características dos compostos que serão utilizados e/ou desenvolvidos nesta tese, assim como a ferramenta matemática que será utilizada no estudo da liberação do agente antimicrobiano, como também a preparação das nanofibras, os estudos de citotoxicidade e inibição antimicrobiana.

A seguir apresentamos os objetivos específicos, e os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento da tese. A originalidade do presente trabalho está dada na preparação das nanofibras, baseadas no derivado de quitosana, o lactato de quitosana, pela técnica de eletrofiação, forma simples e diferenciada de obtenção de nanofibras. Também foram preparados o lactato de quitosana, pela reação do ácido láctico com a quitosana, e o agente antimicrobiano, o complexo de sulfato de condroitina e NPsAg. Ambos foram caracterizados por métodos físico-química de análise.

Finalmente ressaltamos que escolha do lactato de quitosana para a formação das nanofibras, foi realizada com base na ausência de trabalhos de nanofibras utilizando esse composto e também devido à suas propriedades, descritas nos tópicos anteriores.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar nanocompósitos de lactato de quitosana e estudar a atividade antimicrobiana destas nanofibras com adição de nanopartículas de prata.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a modificação química da quitosana com ácido láctico.
- Caracterizar por técnicas físico-químicas o lactato de quitosana.
- Preparar nanofibras de lactato de quitosana por eletrofiação.
- Produção das nanopartículas de prata ligadas ao sulfato de condroitina.
- Incorporar nanopartículas de prata (NPsAg) estabilizado com sulfato de condroitina nas nanofibras de lactato de quitosana.
- Caracterizar por técnicas físico-químicas as nanofibras de lactato de quitosana contendo NPsAg com sulfato de condroitina.
- Avaliar a citotoxicidade das nanofibras de lactato de quitosana contendo NPsAg com sulfato de condroitina.
- Estudar a liberação controlada “in vitro” de NPsAg com sulfato de condroitina.
- Estudar a atividade antimicrobiana das nanofibras de lactato de quitosana contendo NPsAg com sulfato de condroitina.

#### 4. MATERIAIS E METODOS

A seguir estão detalhados os reagentes utilizados nos diferentes procedimentos experimentais, assim como sua procedência. Os reagentes citados a seguir foram utilizados sem prévia purificação: acetona Merk, ácido acético glacial Sigma-Aldrich, ácido láctico Sigma-Aldrich, 85%, metanol Sigma-Aldrich, PA, etanol Sigma-Aldrich, Ágar dextrose sabouraud fornecido por Difco<sup>TM</sup>, água bidestilada, nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) da IMPEX, Quitosana Sigma-Aldrich, sulfato de condroitina comercial, Farmácia Bioflora, tampão pH 1,2 e tampão pH 6,8.

##### 4.1 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA

A viscosimetria é um método muito simples e fornece dados precisos e reprodutíveis. A viscosimetria de uma solução depende do polímero, solvente, temperatura, e da concentração da solução do polímero (MARK,2006). A viscosimetria capilar é um dos métodos mais simples e mais utilizados para determinar a massa molar viscosimétrica,  $M_v$ , de um polímero.

A partir das equações:

$$\eta_{\text{rel}} = t/t_0 \quad \text{Equação 3}$$

$$\eta_{\text{esp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad \text{Equação 4}$$

$$\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{esp}}/C \quad [\text{L/g}] \quad \text{Equação 5}$$

Podemos determinar a viscosidade intrínseca através de regressão linear da viscosidade reduzida versus concentração. Nas equações temos que  $\eta_{\text{rel}}$  é a viscosidade relativa,  $\eta_{\text{esp}}$  é a viscosidade específica e  $\eta_{\text{red}}$  é a viscosidade reduzida (LUCAS,2001) (KREVELER,2009).

A viscosidade intrínseca de um polímero é relacionada à massa molar média pela equação de Mark–Kuhn- Houwink–Sakurada (RIMMER,2007).

$$\eta = K.M^a$$

Equação 6

onde **K** e **a** são constantes para um dado sistema soluto-solvente a uma determinada temperatura e **M** a massa molar média do polímero.

A massa molar viscosimétrica média da QUI foi determinada utilizando um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde em banho maria com temperatura controlada de  $25 \pm 0,1$  °C. Uma solução do polímero em tampão acetato foi preparada com 0,250 g do polímero em 10 mL do tampão acetato e após a primeira medida se adicionou respectivamente 1 mL, 1,5 mL, 2,0 mL e 2,0 mL e foi refeita a medida obtendo soluções com concentrações de 1,00; 0,909; 0,800; 0,690 e 0,606 g/L. Também foi realizada a calibração do viscosímetro com o solvente, tampão acetato, a temperatura ambiente (25°C) e assim, determinado o tempo de escoamento  $t_0$  do solvente. O tempo de escoamento das soluções, nas diferentes concentrações, foi observado, tendo sido realizadas 10 medições de tempo para cada concentração e obtida, assim, a média dos tempos (PETER, FRANCO, 2001).

#### 4.2 GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

O grau de N – acetilação é determinado para conhecer a porcentagem de quitina presente na QUI, sendo que a quitina possui o mesmo anel celulósico, porém ao invés de ter um grupamento amino livre como na QUI este tem um grupamento amida (carboxila ligada ao grupamento amino). Sendo assim ao subtrair 100 menos o grau de N-acetilação da QUI, determina-se o grau de desacetilação.

O método usado para essa determinação é do Baxter, método amplamente descrito na literatura de polímeros, para essa determinação a partir do espectro de FTIR-ATR (Espectrômetro da Shimadzu, modelo IRTracer 100 Series, na faixa de operação de 650 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , usando um acessório de refletância total atenuada (ATR), utiliza-se a razão entre a área da banda característica do grupamento amida e a área de uma banda de referência (banda de grupamento hidroxila), usam-se a equação de Baxter, que é dada pela seguinte expressão (BAXTER, 1992).

$$\text{Grau de N-acetila\c{c}\tilde{a}o} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$$

Equa\c{c}\tilde{a}o 7

Onde  $A_{1655}$  e  $A_{3450}$  s\~{a}o respectivamente, as \~{a}reas das bandas relativas \~{a}s absor\c{c}\tilde{a}o de vibra\c{c}\tilde{a}o: da banda da liga\c{c}\tilde{a}o C=O (carbonila, ligada a amina) e da banda da liga\c{c}\tilde{a}o –O-H, tomada como refer\~{e}ncia.

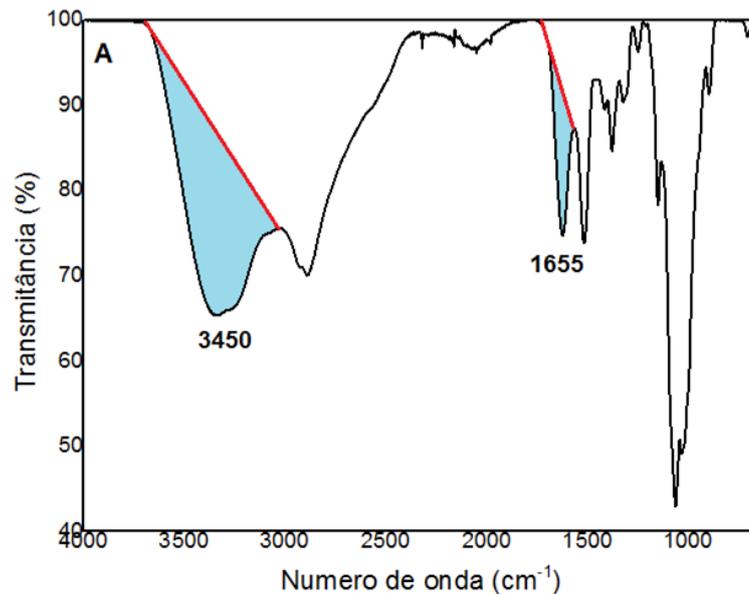


Figura 9 – Grau de acetila\c{c}\tilde{a}o da QUI pelo m\~{e}todo de Baxter (BAXTER, 1992).

#### 4.3 S\~{I}NTESE DO LACTATO DE METILA E ETILA

Para se produzir o lactato de metila foi utilizado um sistema de refluxo acoplado a um bal\~{a}o de fundo redondo, aquecido por uma manta de aquecimento, o qual era necess\~{a}rio para que n\~{a}o houvesse a evapora\c{c}\tilde{a}o dos reagentes vol\~{a}teis do meio de rea\c{c}\tilde{a}o. Primeiramente no bal\~{a}o de fundo redondo foi adicionado 90 gramas de \~{a}cido l\~{a}tico, 32 gramas de metanol/etanol e 1 grama de \~{a}cido p-tolueno sulf\~{o}nico esse sistema foi posto em refluxo, em banho de \~{o}leo, por 8 horas at\~{e} atingir a temperatura de ebuli\c{c}\tilde{a}o. Ap\~{o}s esse tempo a solu\c{c}\tilde{a}o foi transferida para um destilador a fim de se retirar todo o excesso de metanol. Ap\~{o}s o t\~{e}rmino, o lactato de metila foi pesado e medido o seu \~{i}ndice de refra\c{c}\tilde{a}o, assim foi calculado o rendimento da rea\c{c}\tilde{a}o. A produ\c{c}\tilde{a}o do lactato de etila ocorreu da mesma forma citada acima (MARTINO GAUCHI, 2007).

#### 4.4 SÍNTESE DO LACTATO DE QUITOSANA VIA METILICA E ETILICA

A reação de síntese do lactato de quitosana foi realizada através da síntese de éster amidação. Em um balão acoplado a uma coluna de fracionamento e uma bomba a vácuo foi adicionado 50 gramas de solução de quitosana a 2%. A reação foi mantida a uma atmosfera de nitrogênio, a uma temperatura de 65°C (Chapa de aquecimento Nova instruments, modelo: NI 1108). Em seguida foram adicionadas 458 partes de lactato de metila/etila sob gotejamento, a reação mantida a 65 °C por uma hora. Após toda a adição do lactato de metila/etila todo metanol/etanol foi removido do meio de reação por destilação. Ao final da reação uma membrana de cor amarela clara foi visualizada no fundo do balão.

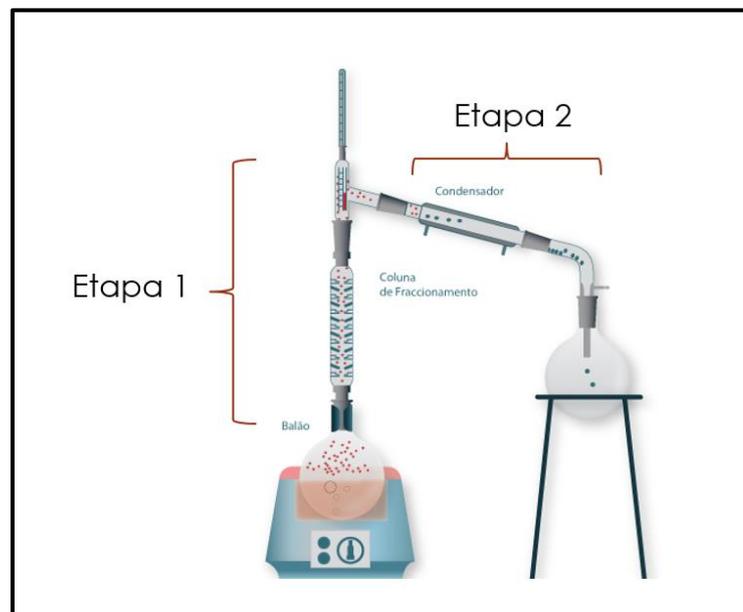


Figura 10 - Sistema para a produção do lactato. (Fonte: Própria Autoria)

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A análise espectroscópica na região do infravermelho com Transformada de Fourier –FTIR, foi feita em Espectrômetro da Shimadzu, modelo IRTracer 100 Series,

na faixa de operação de  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , usando um acessório de refletância total atenuada (ATR). Este acessório é constituído por um cristal misto de Diamante/ZnSe.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica das amostras, foram realizadas por um Calorímetro da Shimadzu, modelo DSC 60 Plus e por um Analisador Termogravimétrico da Shimadzu, modelo TGA 50. Foram utilizados aproximadamente 5 mg de cada amostra nas análises de DSC, usando cadinho de alumínio hermeticamente fechado. As amostras foram inicialmente aquecidas de  $-100^{\circ}\text{C}$  até a  $200^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Todas as varreduras foram feitas sob atmosfera de Nitrogênio a uma taxa de 25 ml/min.

Para o estudo do TGA foram utilizados aproximadamente 10 mg de cada amostra, usando cadinho de platina. As amostras foram inicialmente aquecidas de  $25^{\circ}\text{C}$  até a  $1000^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Todas as varreduras foram feitas sob atmosfera de oxigênio a uma taxa de 25 ml/min.

#### 4.7 CÁLCULO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA

A energia de ativação do processo de degradação do lactato de quitosana foi determinada de acordo com o método de Kissinger (1957), através do primeiro pico de máxima degradação térmica do lactato de quitosana em  $318, 335, 342$  e  $344^{\circ}\text{C}$ , nas taxas de aquecimento de 10, 20, 30 e  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , respectivamente, sob atmosfera de nitrogênio. Os cálculos realizados seguiram procedimento padrão conforme descrito na norma ASTM E1641-04.

Basicamente, a técnica de Kissinger consiste na integração por partes, gerando uma equação que relaciona diferentes taxas de aquecimento com as temperaturas da máxima taxa de perda de massa. Nesse sentido, a energia de ativação envolvida na perda de massa de um determinado material pode ser obtida a partir da equação de Arrhenius, descrita abaixo:

$$k(T) = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $k(T)$  é a taxa de aquecimento em  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $A$  é um fator de frequência em  $\text{min}^{-1}$ , que mede a probabilidade das colisões efetivas,  $E_a$  é a energia de ativação da degradação térmica do lactato de quitosana, expressa em  $\text{kJ/mol}$ ,  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J/Kmol}$ ) e  $T$  é a temperatura em  $\text{K}$ .

Portanto, aplicando-se o logaritmo neperiano em ambos os lados da equação 8, temos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad \text{Equação 9}$$

Plotando-se um gráfico que relaciona o logaritmo neperiano da taxa de aquecimento (eixo das ordenadas) versus o inverso da temperatura absoluta nos picos de maior degradação térmica do lactato de quitosana (eixo das abscissas), obtém-se o coeficiente angular da reta, que é proporcional ao valor da  $E_a$ .

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO ( $^1\text{H}$ -RMN)

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian Unity Plus 500 MHz ( $^1\text{H}$  frequência = 500,13 MHz e  $^{13}\text{C}$  frequência = 125,76 MHz). Com o objetivo de melhorar a resolução dos picos foram estipuladas as seguintes condições: pulso acumulado de 16 varreduras e LB de 0,30 Hz. A largura espectral e os pontos foram de 5000 Hz e 64 K, respectivamente. Os espectros foram calibrados a partir do sinal devido a  $\text{D}_2\text{O}$  em 4,1 ppm. Para diminuir a interferência do sinal do solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ) com os picos da amostra, o experimento foi conduzido a uma temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.9 PREPARAÇÃO DAS NANOFIBRAS POR ELETROFIAÇÃO

O processamento das nanofibras de lactato de quitosana impregnados com nanopartículas de prata e estabilizadas com sulfato de condroitina foram realizados da forma descrita a seguir.

A solução de lactato de quitosana impregnados com nanopartículas de prata e estabilizadas com sulfato de condroitina em dimetilformamida (DMF) (10% m/m) foi adicionada em uma seringa de vidro de 10mL com agulha metálica (20G) e acoplada ao dispositivo electrospinning o qual possui um sistema para pressionamento da seringa com velocidade regulável (sistema de ejeção), permitindo regular a vazão da solução polimérica. A vazão utilizada foi de 0,5 mL/h e uma tensão de +9kV foi aplicada entre a agulha e o disco coletor. As nanofibras foram coletadas sobre uma folha de cobre.

O disco coletor foi posicionado a uma distância de 10 cm da ponta da agulha. O aparelho permaneceu ligado e as nanofibras foram processadas até o consumo de toda a solução da seringa. Foram processadas nanofibras de lactato de quitosana impregnadas com nanoprata estabilizadas com sulfato de condroitina. As nanofibras foram secadas em vacuum por 48 horas a fim de remover todos o solvente remanescente e por fim armazenadas em dessecador para futuras caracterizações.

#### 4.10 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A estrutura/morfologia das micropartículas foi visualizada usando Microscópio Eletrônico de Varredura, da marca Phillips XL 30 FEGSEM, modelo JSM-6701F, operando com condições de vácuo de  $7 \times 10^{-6}$  Torr em uma tensão aceleração de 10 kV. As amostras foram metalizadas em ouro por um revestidor de pulverização automática. As imagens foram tiradas com 5000 x de ampliações de micrografia SEM.

Para a determinação do diâmetro médio, as micrografias foram analisadas com ampliação de 5000x considerando três regiões diferentes de amostras diferentes.

#### 4.11 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DA NP<sub>s</sub>Ag E SULFATO DE CONDROITINA

O estudo de liberação das nanopartículas de prata e sulfato de condroitina das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag foram realizadas em condições estáticas. As amostras foram imersas em solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,4). Durante todo o experimento, os frascos contendo o PBS e as amostras foram armazenados em 37°C, para simular condições fisiológicas do corpo humano. A solução PBS era trocada periodicamente, ou seja, a cada 24 horas por um período de 7 dias, e então aproximadamente a cada 5-7 dias, por um total de 28 dias. A concentração de prata liberada das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag no PBS foi medida com uma absorção de espectrofotômetro UV-Vis (Varian Cary 50) usando a banda de ressonância de plasmon de superfície da prata em  $\lambda_{\text{max}}$  de 435 nm (BHUI, 2009).

A quantidade de sulfato de condroitina liberado das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag foi determinado por ensaio de azul de metileno (ZHOU, 2002). O ensaio é baseado na observação que a absorbância do azul de metileno em 664 nm diminui quando complexação com sulfato de condroitina ocorre. A diminuição na absorção em 664 nm é proporcional à concentração de sulfato de condroitina na solução, fornecendo uma base para a determinação quantitativa de sulfato de condroitina em função do azul de metileno. As curvas de calibração foram realizadas lendo a absorbância do azul de metileno a 664 nm, onde a concentração de azul de metileno era fixa e havia um aumento crescente na quantidade do sulfato de condroitina (ZHOU, 2002).

#### 4.12 SÍNTESE DO COMPLEXO SULFATO DE CONDROITINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA (SC-NP<sub>s</sub>Ag)

Utilizando a equação de Mark – Houwink - Sakurada  $[\eta] = kMa$ , foi possível obter a massa molar média viscosimétrica do SC no valor de  $1,39 \times 10^4$  Da.

O complexo formado por SC e NP<sub>s</sub>Ag (SC:NP<sub>s</sub>Ag) foi obtido por biossíntese, utilizando o SC como agente redutor e estabilizador na redução de íons prata (Ag<sup>+</sup>) em solução aquosa. Foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata e SC, essa

solução foi mantida sob agitação, a 800 rpm, e uma temperatura de 80°C, durante 4 dias. Após passado o tempo determinado, a solução foi congelada e liofilizada, obtendo um complexo em forma de cristais e coloração escura (RIBEIRO, 2016).

#### 4.13 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A fim de se avaliar a atividade antimicrobiana dos nanocompostos LQ e LQ/Sc-NPsAg, seguiu-se a metodologia dos testes de disco-difusão em meio Muller Hilton ágar, utilizando linhagens Gram-positiva de *Staphylococcus aureus* LB25923 e Gram-negativa de *Escherichiacoli* LB25922. O filme das nanofibras de lactato de quitosona foram cortados em forma de discos com 8 mm de diâmetro e esterilizadas em capelas de fluxo laminar por exposição a lâmpada de UV, por 30 minutos, a uma distância de 60cm da lâmpada, sendo estes discos dispersos sobre placas de ágar após a aplicação do inóculo bacteriano, conforme padrão de diluição 0,5 da escala Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As placas em triplicatas foram mantidas em estufas de incubação, por 24 horas, a 37°C. Após este período, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco, indicando o perfil de sensibilidade das bactérias às amostras.

#### 4.14 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As nanofibras lactato de quitosana com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina foram testadas quanto à citotoxicidade em células específicas do tecido de camundongos, os fibroblastos L929 (OZDEMIR, 2009). Antes do teste de citotoxicidade, as nanofibras foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta por 30 min. Apenas células viáveis (Viabilidade > 90%) foram colhidas e contadas em 0,1% por exclusão de azul tripano. A inibição do crescimento de L929 foi avaliada pelo ensaio MTT, com base na clivagem do sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) a formazan por desidrogenases mitocondriais em células viáveis. As amostras de nanofibras foram então incubadas em 1 mL de DMEM a 37°C por 24 h. Depois disso, as amostras nanofibras foram removidas e os extratos

obtidos foram posteriormente diluídos para obtenção de amostras do meio de extração. Fibroblasto L929 viável as células foram plaqueadas em 100 µL de meio e adicionados a placa de microtitulação de poços (placas de microtitulação de 96 poços), incubado a 37° C por 24 h. Após incubação por mais 24 h, o meio de cultura foi removido e substituído com o meio de extração e incubado por 24 h. Então, cerca de 100 µL de solução de MTT foi adicionado a cada poço. Após 24 h de incubação a 37°C, 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para dissolver os cristais de formazan.

A densidade óptica da solução de formazan foi detectada por um leitor de ELISA (Multiscan Dynatec MR5000) a 490 nm. Para fins de referência, as células foram semeadas em meio contendo 0,50% de fenol (controle positivo) e um meio de cultura fresco (controle negativo) sob as mesmas condições de semeadura, respectivamente. A inibição do crescimento foi expressa em função porcentual do controle. Após o ensaio de viabilidade, as amostras de nanofibras lactato de quitosana com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina foram lavadas com solução de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 e fixada com ácido perfluorooctanóico (PFA) 4% (p/v) por 30 min a 4°C. O PFA foi então removido e as amostras de nanofibras lactato de quitosana com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina foram lavadas novamente com PBS. As células do citoesqueleto foram coradas com laranja de acridina por 5 min para realização de imagens adicionais, utilizando um microscópio de fluorescência Carl Zeiss , modelo Axioskop 40 com ampliação de 200x.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA DA QUITOSANA

Para se determinar a massa molar viscosimétrica da quitosana, foi utilizado a equação de Mark–Kuhn- Houwink–Sakurada (RIMMER,2007).

$$\eta = K.M^a \quad \text{Equação 6}$$

onde **K** e **a** são constantes para um dado sistema soluto-solvente a uma determinada temperatura e M a massa molar média do polímero.

Para cada concentração foram realizadas 10 tomadas de tempo, a média calculada é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração e média dos tempos para as soluções de QUI em tampão acetato

Solução	Concentração (g/mL)	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)
Tampão Acetato	0	96,44	0,63
1	1,00E-03	169,44	1,82
2	9,09E-04	161,45	1,45
3	8,00E-04	153,21	0,67
4	6,90E-04	144,17	1,07
5	6,06E-04	137,48	0,47

Calculando as viscosidades relativa, específica e reduzida (Equações 3, 4 e 5), obtemos:

Tabela 3 – Viscosidade relativa, específica e reduzida para as amostras de QUI em tampão acetato.

Solução	$\eta_{rel} = t/t_0$	$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1$	$\eta_{red} = \eta_{esp}/C$
1	1,76	0,76	756,95
2	1,67	0,67	741,58
3	1,59	0,59	735,82
4	1,49	0,49	717,27
5	1,43	0,43	702,23

Traçando-se o gráfico  $\eta_{red}$  versus C (Figura 11), obtemos a viscosidade intrínseca  $\eta$ , na interseção da curva com o eixo y da viscosidade reduzida, sendo igual a  $624,85 \pm 10,20$  mL/g.

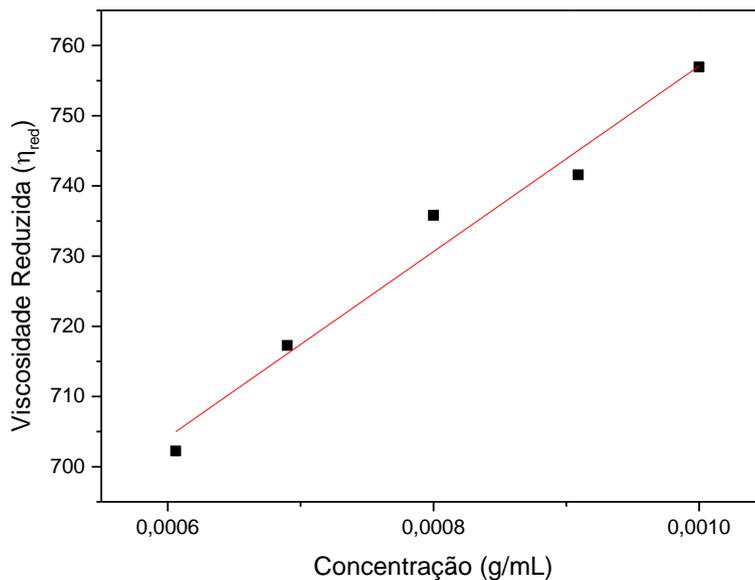


Figura 11 - Viscosidade reduzida em função da concentração para a QUI em tampão acetato.

Os valores das constantes K e a da equação de Mark-Kuhn- Houwink-Sakurada para a QUI em tampão acetato, a  $25,0 \pm 0,1$  °C, bem como a massa molar viscosimétrica média obtida experimentalmente, segundo a mesma equação, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Valor da Massa Molar Média para a QUI em tampão acetato a 25°C.

Polímero	Solvente	Constante	Mv (Da)
		$K \cdot 10^2$ (mL/g)	a
QUI	NaAc (0,2 mol/L), Ac. Acético (0,3 mol/L)	7,4	0,76 1,47 x 10 <sup>5</sup>

A massa molar influencia consideravelmente as propriedades físico-química dos polímeros. A massa molar da QUI depende de sua origem (fonte natural: camarão, caranguejo, etc), mas também pode mudar durante o processo químico de desacetilação. A massa molar pode diminuir quando aumenta o grau de desacetilação.

Na QUI a massa molar influencia, entre outras, as seguintes propriedades, degradação, resistência mecânica e o teor de umidade. Quanto maior a massa molar, melhor a propriedade mecânica e maior a capacidade de adsorção de umidade. QUI com alta massa molar (entre  $1 \cdot 10^4 - 1,2 \cdot 10^5$ ) como a encontrada na QUI comercial estudada neste trabalho, mostraram ser mais eficientes no encapsulamento de proteínas, reduzindo a cinética de liberação, algo desejado em liberações controladas a longo prazo (QUEIROZ, 2003).

## 5.2 GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

A medida do grau de desacetilação da QUI se torna muito importante, pois determina sua solubilidade em ácidos diluídos e tem influência na sua reatividade.

Esse parâmetro foi determinado utilizando a técnica espectroscópica de FTIR-ATR, pelo método de Baxter, que calcula o grau de N-acetilação, pela equação 11.

Foram calculados as áreas dos picos no espectro de FTIR da QUI, os valores encontrados para as áreas no espectro da QUI estão na tabela 5.

$$\text{Grau de N-acetilação} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$$

Equação 10

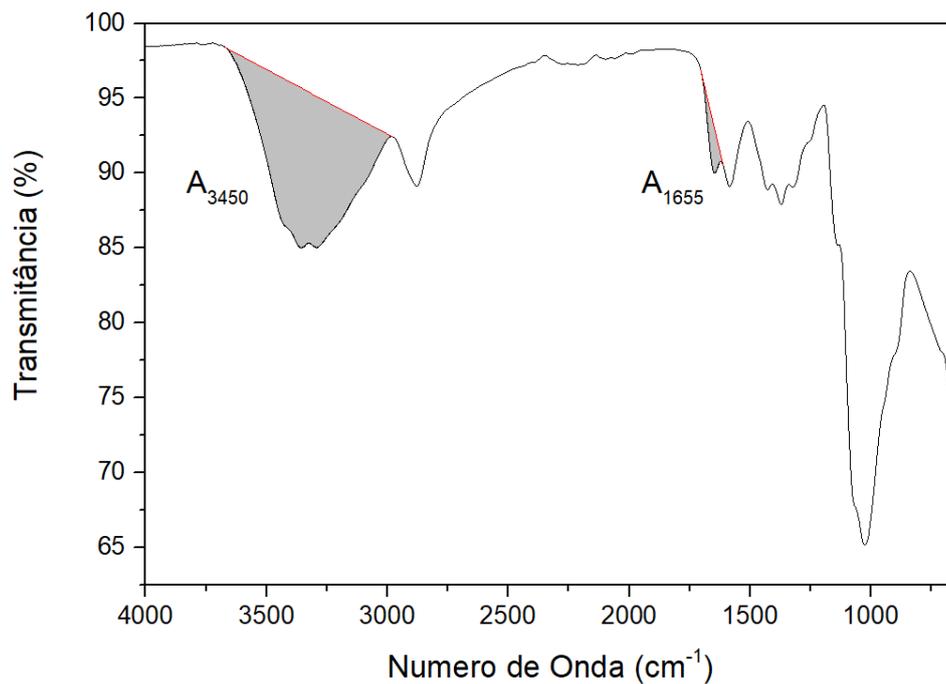


Figura 12 - Áreas para o cálculo do grau de desacetilação da quitosana.

Tabela 5 – Valor da área dos picos da QUI.

QUI	Valores
A <sub>3540</sub>	6505,70
A <sub>1655</sub>	422,55

Pela Equação 11, obtemos que o Grau de N-acetilação (%) = 7,47 ou seja o Grau de desacetilação da QUI é de 92,53 %.

O grau de desacetilação é um parâmetro de grande importância na caracterização da QUI. Este parâmetro determina várias propriedades físicas químicas e biológicas da QUI tais como, hidrofiliçidade cristalinidade, degradação e resposta celular. Segundo a literatura, QUI com graus de desacetilação maiores que 70% ou 100% apresentam prolongados tempos de degradação e elevada adesão celular. De maneira diferente, QUI com graus de desacetilação intermediários mostram altas velocidades de degradação, mas apresentam limitada adesão celular (QUEIROZ, 2003).

### 5.3 SÍNTESE DO LACTATO DE QUITOSANA

O lactato de metila e de etila foram sintetizados pela reação química de esterificação entre o ácido láctico e o álcool metílico e etílico, respectivamente. A reação foi realizada em excesso de álcool, até atingir a temperatura de ebulição, em balão com condensador de refluxo durante 8 horas. Após o término da reação a solução formada foi transferida para um destilador, para que todo o álcool que não participou da reação fosse removido.

Um dos métodos sintéticos de obter poli(ácido láctico) é a reação de policondensação direta do ácido láctico. (GARLOTTA, D., 2001) Portanto, como representado na Figura 13 a, no sistema de reação não podemos descartar que além do lactato de metila ou etila, em relação ao álcool precursor, obtemos também oligômeros de poli(ácido láctico) com grupo terminal éster. O rendimento da reação, apresentado na Tabela 6, foi calculado a partir da conversão da massa de lactato.

Tabela 6 - Rendimento médio obtido nos procedimentos seguidos para a preparação dos lactatos.

Esterificação	Rendimento médio (%)	Aspecto físico
Lactato de Metila	78,5 ± 3,1	Amarelado e Viscoso
Lactato de Etila	78,0 ± 2,1	Amarelado e Viscoso

Os resultados obtidos com ambos os álcoois são estatisticamente similares mostrando que a reação ocorre de maneira eficiente em ambos os meios de reação. Portanto, um estudo das condições experimentais tais como um aumento na pressão do meio, controle mais eficiente da temperatura, otimização da razão ácido láctico/álcool, podem ser realizados visando o aumento do rendimento.

Foi realizado também o cálculo de pureza dos lactatos de metila e etila preparados, para isso foi determinado o índice de refração a 20°C, usando um refratômetro Abbe. O valor do índice de refração a 20°C, reportado na literatura, para o lactato de metila e etila é de  $n_D=1,413$ . Os valores experimentais e o erro relativo encontrado estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Índice de Refração dos Lactatos.

Esterificação	Índice de Refração		Erro Experimental
	Teórico	Experimental	
Lactato de Metila	1,413	1,416	0,21
Lactato de Etila	1,413	1,412	0,07

O desvio do valor teórico da medida de índice de refração pode ser atribuído à presença de oligômeros de poli (ácido láctico) (PLA).

Os lactatos de quitosana foram então preparados a partir dos lactatos de metila e etila, através da reação de amidação de éster, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 90% para ambos os lactatos. A Figura 13b mostra de modo esquemático os produtos que poderão ser formados a partir da reação de amidação entre a quitosana e o lactato de etila e oligômeros de poli(ácido láctico) com grupo final éster.

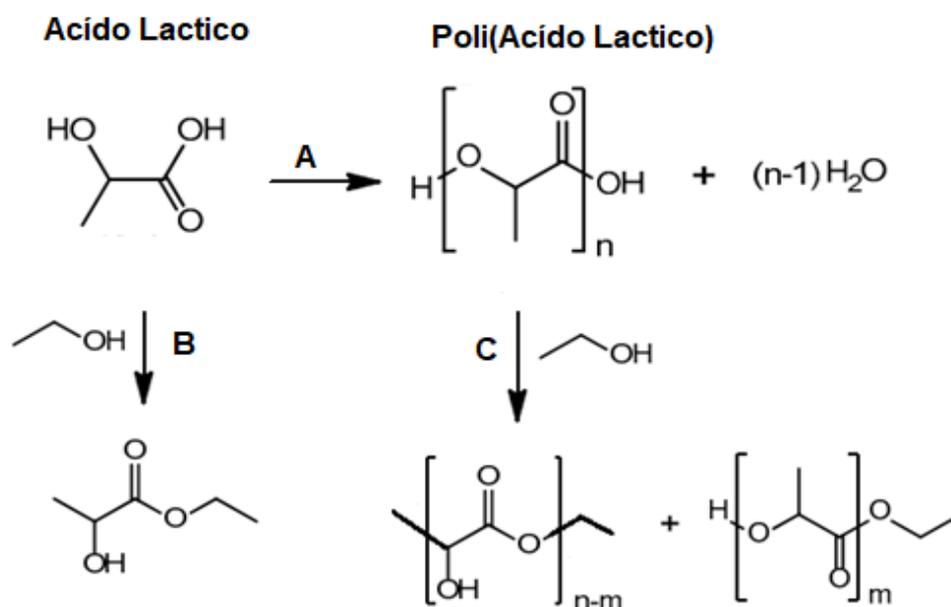


Figura 13a - Síntese de lactato de etila. (A) policondensação direta de ácido láctico. (B) reação de esterificação. (C) reação de transesterificação

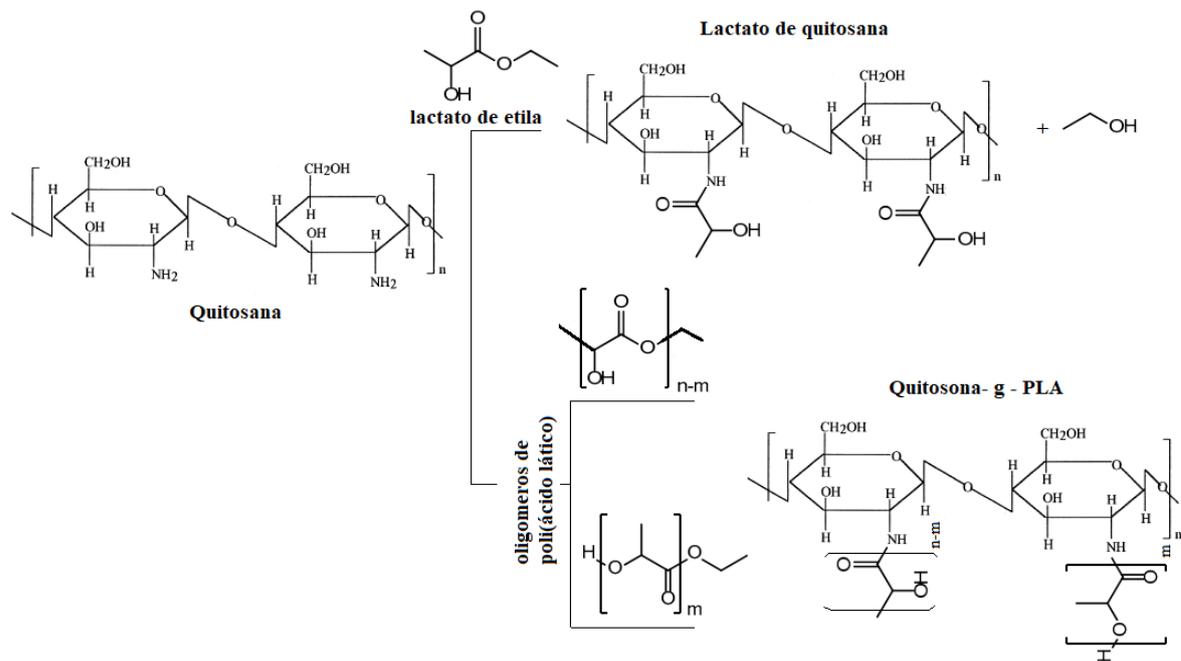


Figura 13b - Síntese de lactato de quitosana e quitosana - g - PLA

A caracterização físico-química dos lactatos de quitosana obtidos são discutidas a seguir.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR

Utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho é possível comparar um espectro da QUI pura com um espectro do lactato de metila e lactato de quitosana e com isso, notar a presença de banda de absorção antes inexistente na QUI pura. A Figura 14a mostra as bandas características do lactato de metila, a Figura 14b mostra comparativamente o espectro FTIR da quitosana e do lactato de quitosana.

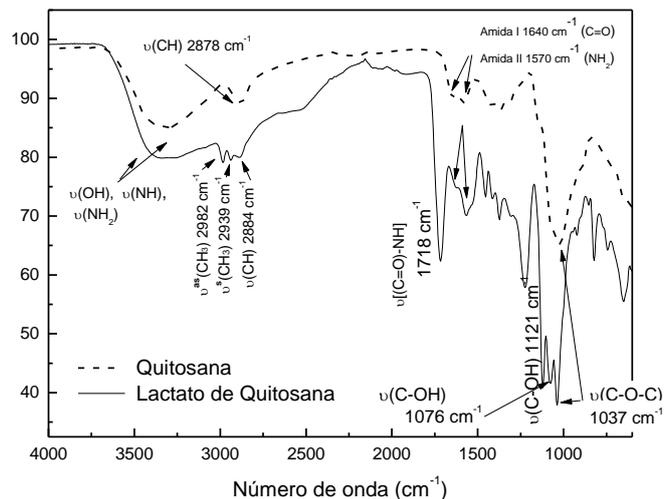
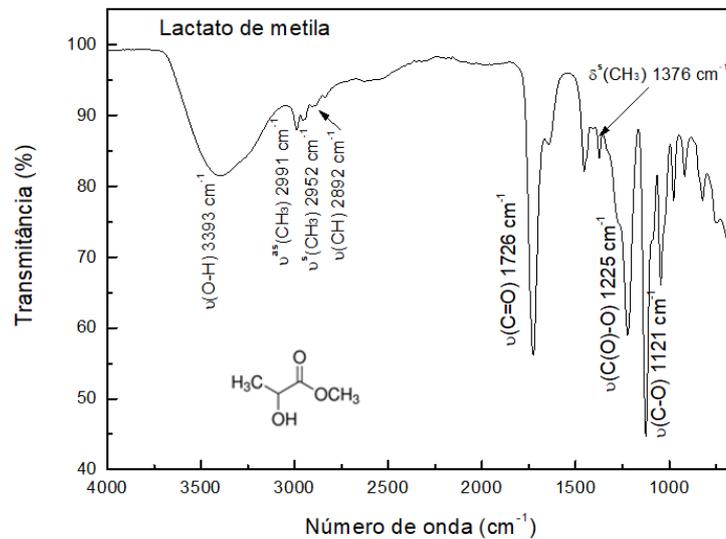


Figura 14 - Espectro FTIR (a) Lactato de metila; (b) comparativo Quitosana e Lactato de Quitosana.

A Figura 14a mostra as bandas características do lactato de metila, confirmando a reação de esterificação, pela aparição da banda de éster em  $1726\text{ cm}^{-1}$  e, a banda de estiramento da ligação  $\text{-C(O)-O}$  em  $1225\text{ cm}^{-1}$ . Também se observam as bandas de estiramento simétrico e assimétricos em  $2952\text{ cm}^{-1}$  e  $2991\text{ cm}^{-1}$  do  $\text{CH}_3$ . A Figura 14b mostra comparativamente o espectro FTIR da quitosana e do lactato de quitosana obtido a partir do lactato de metila. Não foi mostrado o espectro FTIR do lactato de quitosana preparado a partir do lactato de etila por mostrar as mesmas bandas de vibração, como era de esperar. A Figura 15 mostra as estruturas químicas da quitosana e do lactato de quitosana.

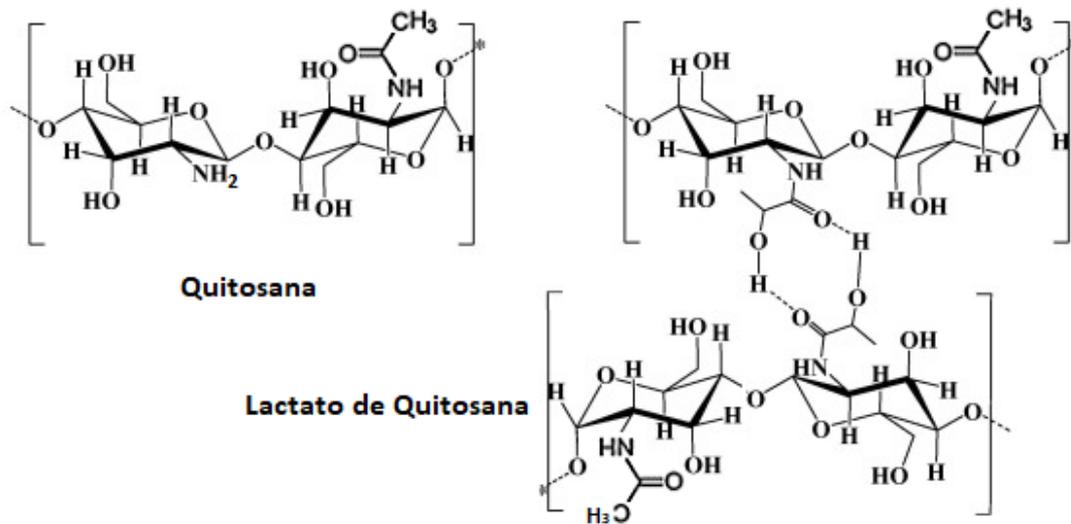


Figura 15 - Estrutura química da Quitosana e do Lactato de Quitosana (Fonte: Própria Autoria).

As bandas características da QUI são observadas a  $3343\text{ cm}^{-1}$  e  $3237\text{ cm}^{-1}$ , bandas de vibração de estiramento das ligações O-H,  $\text{NH}_2$  e N-H, respectivamente. Estas bandas são largas devido às interações intermoleculares entre as cadeias do polissacarídeo. Porém, o alargamento é muito mais pronunciado no lactato de quitosana devido à interação entre os grupos lactatos de duas cadeias, como mostra a Figura 15. Dentre as principais bandas encontramos também a banda da Amida I, banda de estiramento C=O aparece em  $1640\text{ cm}^{-1}$  e Amida II em  $1570\text{ cm}^{-1}$ , banda de deformação N-H. O estiramento da banda carbonila (C=O) no lactato de quitosana aparece em  $1718\text{ cm}^{-1}$ , mostrando um deslocamento a menor frequência se comparando com a banda carbonila no lactato de metila ( $1726\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 14a). Este deslocamento se deve ao efeito mesomérico (+M) (ou de ressonância) do nitrogênio ligado à carbonila na quitosana.

Na região próxima a  $1000\text{ cm}^{-1}$  são observadas as bandas características da estrutura sacarídea da QUI. Como mostra o espectro FTIR da Figura 14b, as bandas de estiramento C-O em  $1121\text{ cm}^{-1}$  e  $1076\text{ cm}^{-1}$  e a banda de estiramento da ligação éter (C-O-C) em  $1037\text{ cm}^{-1}$ .

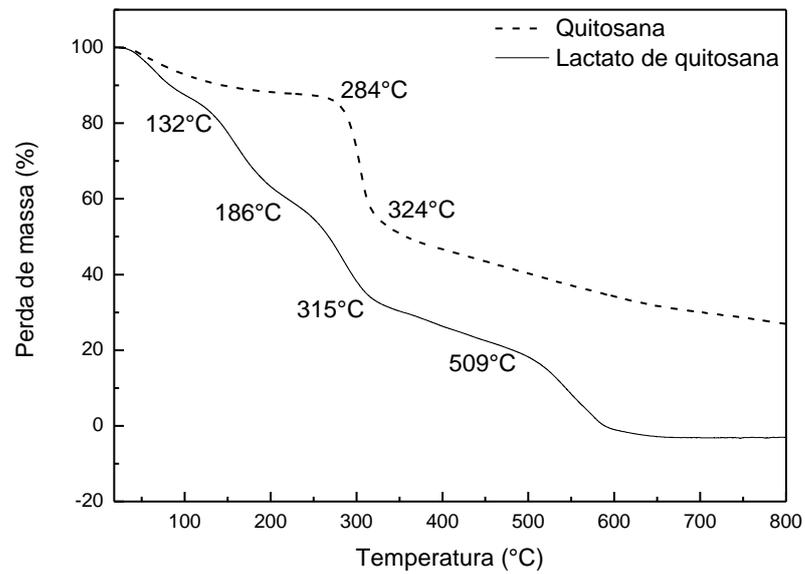
A caracterização por FTIR confirma a reação de esterificação com a formação do lactato de metila e etila e, a formação do lactato de quitosana.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE TERMICA

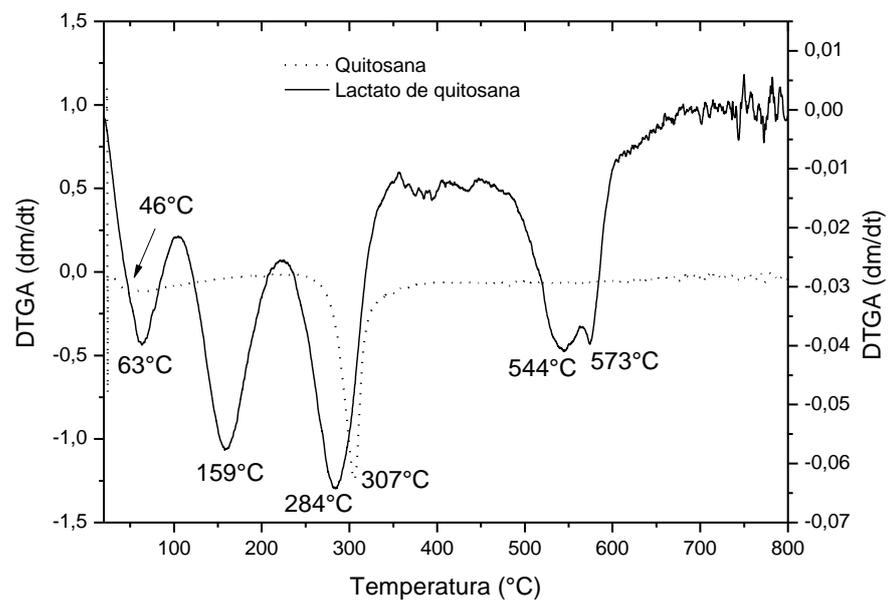
### 5.5.1 ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA

A Figura 16a mostra o resultado obtido na análise termogravimétrica da quitosana e de seu derivado, o lactato de quitosana. Os resultados de TGA obtidos para o derivado de quitosana, produto da reação da quitosana com lactato de metila e etila foram semelhantes, por isso apresentamos apenas o TGA do lactato de quitosana obtido a partir da via metálica. Observa-se que a degradação da quitosana acontece em três estágios diferentes. O primeiro se inicia com o aquecimento da amostra e é referente à perda de água residual da quitosana (~12,7% de massa). A segunda perda de massa se inicia em 284°C, relacionada à degradação da cadeia principal, mostra um perfil de degradação rápido, levando à perda de 33,37% de massa. A terceira perda mostra um perfil lento e contínuo de degradação, se inicia em 324°C e leva a perda de 26,32% de massa. Observa-se que a quitosana não se degrada completamente, permanecendo até 800°C um resíduo de 27,6%.

A degradação do derivado de lactato de quitosana mostra um perfil de degradação completamente diferente ao observado na quitosana. Pelo que mostra a Figura 16a, entorno de 80% da cadeia polimérica degrada a temperaturas mais baixas que aquelas observadas para a quitosana. Porém, 20% da cadeia estabiliza degradando a temperaturas maiores. Um perfil de degradação semelhante foi observado em filmes obtidos a partir da dissolução de quitosana em ácido láctico. Observando-se também o início da degradação a temperaturas mais baixas, o que sugere uma estabilidade térmica menor do derivado se comparado à quitosana. (YODKHUM, K., et al, 2012; EULALIO, H. Y., et. al, 2019). O primeiro estágio da degradação após a perda de umidade, pode ser atribuído à degradação do grupo lateral (lactato de etila e/ou oligômeros de poli (ácido láctico)) (YODKHUM, K., et al, 2012). Portanto, estes novos compostos que chamamos de derivados de quitosana apresentam menor estabilidade térmica se comparado à quitosana.



(a)



(B)

Figura 16 - Curva da perda de massa em função da temperatura da Quitosana e Lactato de Quitosana, (a) TGA; (b) DTGA.

O perfil de degradação de TGA do lactato de quitosana mostra 5 estágios de degradação (DINESH ,2020). O primeiro se inicia com o aquecimento e corresponde

à perda de água (13,86% de massa). O segundo estágio se inicia em 132°C e leva a perda de 26,74% de massa. O terceiro estágio se inicia em 186°C levando a uma perda de massa de 26,4%. A 315°C observamos o início da degradação do 5º estágio com a perda de 13,99 % de massa. O material termina perdendo a massa restante, relativa a 19% de massa, na temperatura de 509°C. A perda nos 5 estágios anteriormente descritos apresentam um perfil lento de degradação. Destacamos que o derivado degrada completamente sem formação de resíduo.

O gráfico de DTGA (Figura 16b) mostra os picos de temperatura que correspondem à máxima perda de massa. O gráfico DTGA confirma os resultados anteriormente discutidos, mostrando que em torno de um 80% do derivado degrada a temperaturas menores que a quitosana.

Tabela 8 - Dados referentes as perdas de massas nos estágios de degradação.

	Estágios de Degradação	T <sub>Onset</sub> (°C)	T <sub>Endset</sub> (°C)	Perda de Massa (%)	Resíduo (%)
Quitosana	1°	25	284	12,70	27,61
	2°	284	324	33,37	
	3°	324	800	26,32	
Lactato de Quitosana	1°	25	132	13,86	0
	2°	132	186	26,74	
	3°	186	315	26,40	
	4°	315	509	13,99	
	5°	509	800	19,00	

### 5.5.2 ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO LACTATO DE QUITOSANA

A energia de ativação da degradação térmica do lactato de quitosana ( $E_a$ ) foi determinada para a degradação correspondente ao terceiro estágio de degradação ( $T_{máx}$  289°C, curva DTG, Figura 16b), com taxas de aquecimento de 10, 20, 30 e 40°C/min. Esta perda é atribuída na literatura à cisão da ligação C-O-C nas posições  $\beta(1,4)$  que liga as unidades monoméricas (YODKHUM, K., et al, 2012). As curvas TGA/DTGA das quatro taxas de aquecimento são mostradas na Figura 17. Observamos como a taxa de aquecimento muda o perfil de degradação do derivado de quitosana. Uma taxa de aquecimento baixa mostra um perfil de degradação

semelhante ao da quitosana ficando um alto teor de resíduo. Comparando as variações de temperatura dos picos obtidos por DTGA, mostrado na Tabela 7, é possível observar que houve um deslocamento das curvas para à direita, à medida em que se aumentou a taxa de aquecimento.

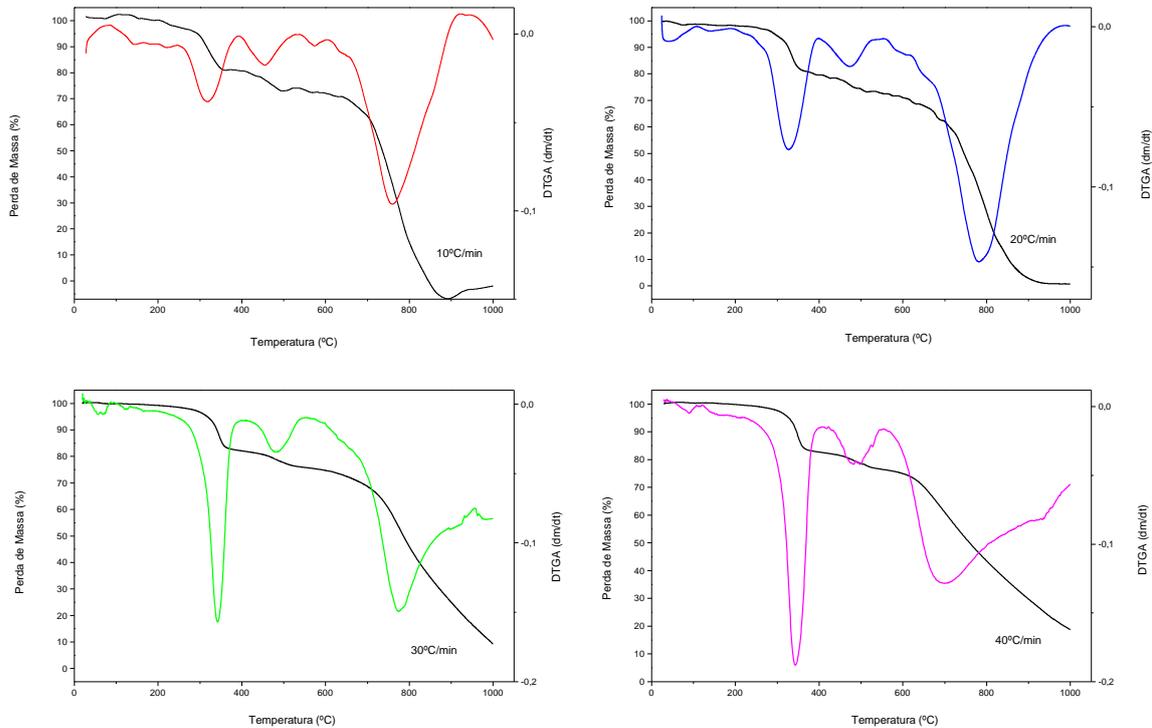


Figura 17 - Perfis de degradação térmica (TGA/DTGA) do lactato de quitosana nas taxas de 10, 20, 30 e 40°C/min.

Conforme procedimento descrito no item 4.7, a  $E_a$  da degradação térmica do lactato de quitosana foi determinada a partir do gráfico apresentado na Figura 18. Os dados para a construção deste gráfico estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Determinação das variáveis para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da degradação térmica do lactato de quitosana.

<b>k</b> <b>(°C/min)</b>	<b>lnk</b>	<b>T(°C)</b>	<b>T (K)</b>	<b>1/T</b>
10	2,303	318	591,15	0,001692
20	2,996	335	608,15	0,001644
30	3,401	342	615,15	0,001626
40	3,689	344	617,15	0,001620

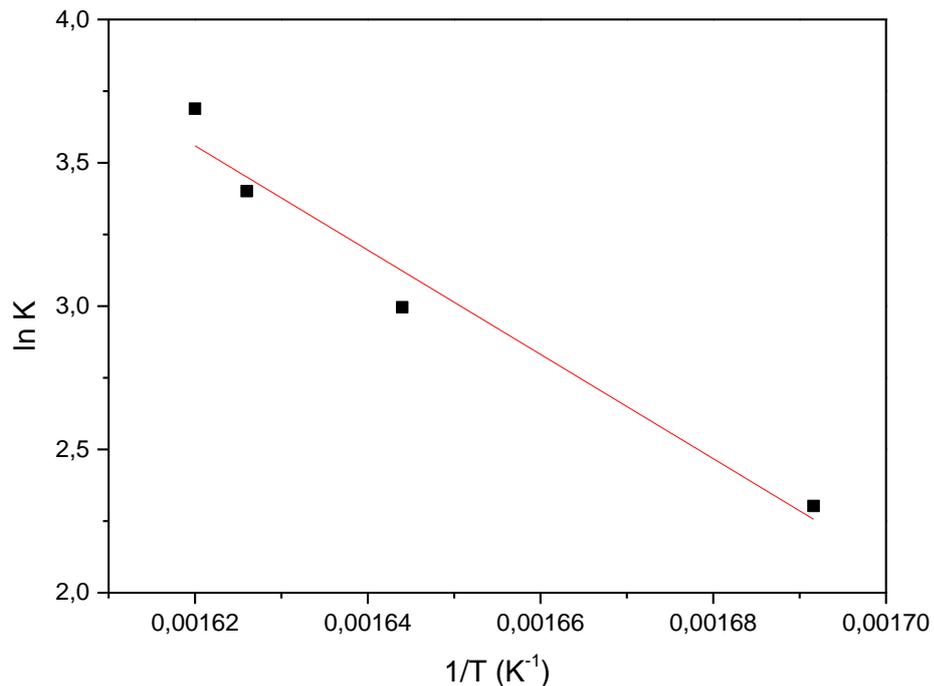


Figura 18 - Regressão linear para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da degradação térmica do lactato de quitosana.

Além disso, comparando-se a equação da reta com a equação 3, tem-se que o coeficiente angular  $\frac{E_a}{R} = -18195,5$ . Logo, a partir da constante universal dos gases ( $R = 8,314 \text{ J/Kmol}$ ), a  $E_a$  obtida foi de  $151,3 \text{ kJ/mol}$ .

Na literatura a  $E_a$  da Quitosana pode variar de  $150$  a  $300 \text{ kJ/mol}$ , dependendo do seu grau de desacetilação, para quitosana com grau de desacetilação maior que  $80\%$  encontramos  $E_a$  em torno de  $150 \text{ kJ/mol}$ , assim pela  $E_a$  do lactato de quitosana obtido de  $151,3 \text{ kJ/mol}$ . pode se afirmar que a modificação química ocorrida na quitosana não alterou sua energia de ativação, visto que a degradação térmica da quitosana ocorre da seguinte maneira, ao longo de toda a cadeia polimérica temos monômeros de quitina que foram desacetilados (chamados de monômeros de quitosana), esse monômeros estão distribuídos de maneira randômica ao longo da cadeia polimérica, e ao realizamos a modificação química da quitosana, transformando a em lactato de quitosana, serão esses mesmo monômeros onde ocorreram a modificação, assim a degradação térmica ocorre primeiramente com a quebra de ligações cruzadas entre os polímeros e depois com a degradação da cadeia polimérica principal (QU, 2000)

### 5.5.3 ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATORIA DIFERENCIAL

A literatura reporta resultados da  $T_g$  da quitosana contendo água, usando a técnica de DSC modulado. Esta técnica permite obter a transição vítrea da Quitosana plastificada devido à presença de água. (DHAWADE, P., 2012)

A Figura 19 mostra comparativamente os resultados obtidos pela análise de DSC para a quitosana e seu derivado obtido a partir do lactato de metila. Observa-se em ambas as amostras o pico endotérmico relacionado à evaporação de água. Para a quitosana este pico endotérmico,  $T_e = 100^\circ\text{C}$  é largo e se inicia (on set) em torno de  $17^\circ\text{C}$ . O Lactato de quitosana inicia a evaporação, on set, a temperaturas mais baixas em torno de  $10^\circ\text{C}$ . O lactato de quitosana mostra dois picos endotérmicos, o primeiro relativo a evaporação de água  $T_e = 100^\circ\text{C}$  e, o segundo com temperatura de pico  $T_p = 180^\circ\text{C}$  relacionada com a degradação.

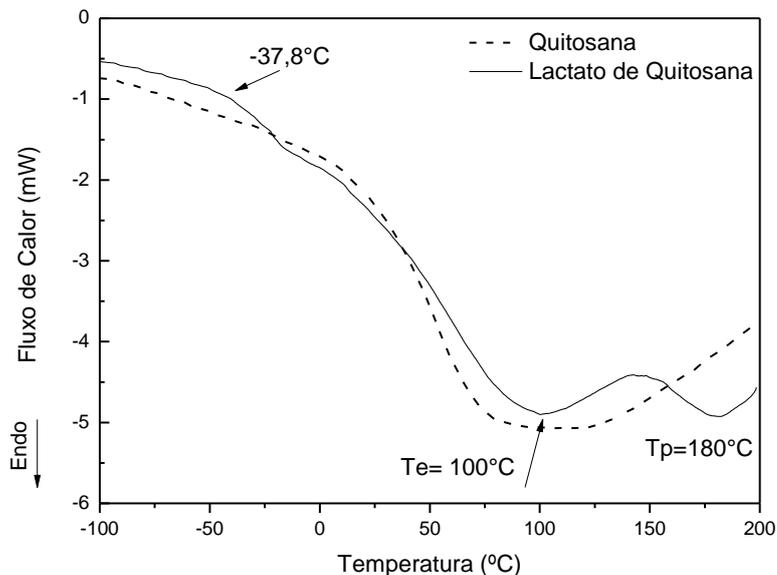


Figura 19 – DSC da Quitosana e do Lactato de Quitosana.

Analisando a Figura 19 vemos que a degradação térmica do lactato de quitosana ocorre a  $180^\circ\text{C}$  possui um pico endotérmico não observado na quitosana, esse pico é devido a quebra dos grupamentos de lactato ligados ao longo de toda a cadeia de quitosana.

Na curva de DSC da quitosana modificada se observa uma mudança na linha base, com on set em  $-37,8^\circ\text{C}$ . Este evento térmico pode ser associado à transição

vítrea borrachosa ( $t_g$ ) de um segmento flexível da quitosana modificada. Não pode ser atribuída à quitosana pura, pois a  $t_g$  da quitosana está acima da temperatura ambiente, em DSC convencional sendo observada em 118°C para a quitosana. Quando plastificada, pela presença de água a  $t_g$  da quitosana pode ser observada em 61°C (DHAWADE, P. P. & JAGTAP, R. N., 2012). O poli (ácido láctico) com massa molar elevada, apresenta  $t_g$  acima da temperatura ambiente. (GARLOTTA, D., 2001)

Utilizamos a equação de Fox-Flory (Equação 12) (GARLOTTA, D., 2001), que relaciona a massa molar com a temperatura de transição vítrea-borrachosa, para estimar teoricamente a massa molecular do segmento flexível que origina o evento térmico observado na curva de DSC a -37,8°C.

$$t_g = t_g^\infty - \frac{K}{M_n} \quad \text{Equação. 12}$$

Onde,  $t_g^\infty$  é a  $t_g$  a massa molar infinita; K é uma constante que representa a contribuição dos grupos finais da cadeia de polímero ao volume livre.

Para o poli (ácido láctico)  $t_g^\infty = 58^\circ\text{C}$  e  $K = 5,5 \cdot 10^4$  (GARLOTTA, D., 2001),

Isolando a massa molar numérica teórica na equação 12, podemos estimar seu valor, sendo igual a 574 g/mol, considerando a massa molar da unidade monomérica que se repete na cadeia de poli (ácido láctico) podemos dizer que este oligômero tem um grau de polimerização igual a 8.

Este resultado confirma que na síntese do lactato de metila e lactato de etila, se obtém como subprodutos oligômeros de poli (ácido láctico), que posteriormente foram enxertados por condensação na cadeia de quitosana.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO SULFATO DE CONDROITINA: NANOPRATA (SC:NPsAg)

A Figura 20 mostra o espectro FTIR comparativo do sulfato de condroitina e o complexo SC:NPsAg. Os espectros não mostram diferenças significativas. A banda larga em 3305  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento dos grupos -OH e N-H. O espectro FTIR do SC possui a banda típica da vibração carbonila do grupo Amida I em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , a banda em 848  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à vibração da ligação C-O-S e, a banda em 1235  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento assimétrico do grupo S=O. A banda de vibração em 1147  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento simétrico do grupo S=O. As bandas em torno de 1076  $\text{cm}^{-1}$  e 1418  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à vibração de estiramento

da ligação C-O. O pico em  $1370\text{ cm}^{-1}$  é referente ao acoplamento entre os grupos OH. Os fortes picos de absorção em cerca de  $1010\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos aos grupos açúcares do SC (GARNJANAGOONCHORN,2007).

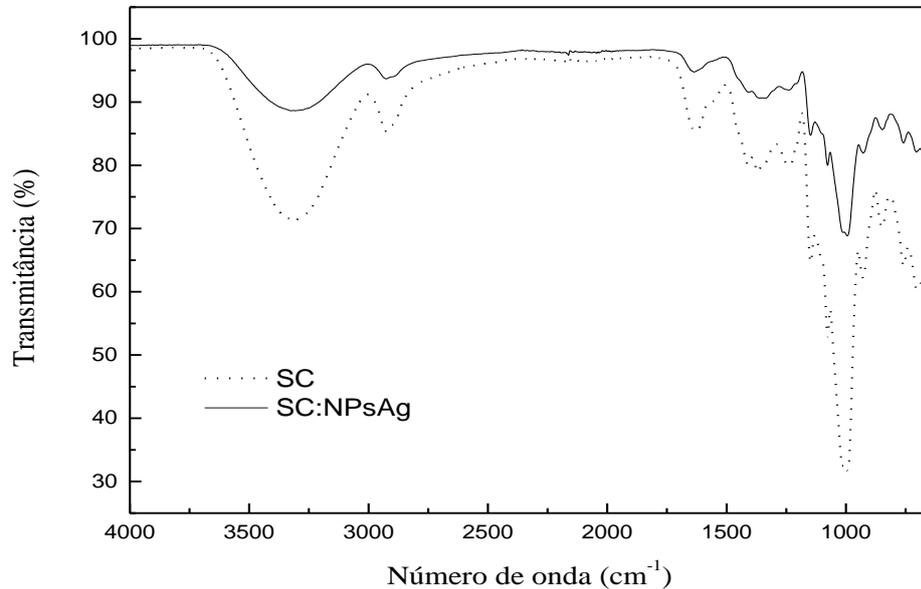


Figura 20 – FTIR comparativo do SC e do complexo SC:NPsAg.

A análise térmica por TGA foram resumidos na Tabela 10. Mostrando que a presença da NPsAg diminui a estabilidade do SC iniciando a degradação da cadeia principal a temperaturas menores.

Tabela 10 – Análise termogravimétrico de SC e complexo SC:NPsAg.

Amostra	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Massa residual (%)
	Temp(°C)	Perda(%)	Temp(°C)	Perda (%)	Temp(°C)	Perda(%)	
SC	0-160	6,9	230-590	88,5	590-800	0,3	3,5
SC:NPAg	0-210	6,9	210-500	87,2	500-800	0,1	5,8

Fonte: (RIBEIRO, 2016)

O resíduo a  $800^{\circ}\text{C}$  no complexo SC:NPsAg é atribuído à Nanopartícula de prata e SC não degradado. Portanto, considerando o teor de SC não degradado, concluiu-se

que nas condições de síntese o complexo apresenta a proporção SC:NPsAg aproximada de 97,7:2,3 (% em massa).

### 5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR RMN $^1\text{H}$

A Figura 21 mostra o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do lactato de quitosana em  $\text{D}_2\text{O}$  há  $70^\circ\text{C}$ . As ressonâncias de prótons das unidades N-acetilglucosamina são observadas em 4,2-4,4 ppm (H-1), 3,6-4,0 ppm (H-3, H-4, H-5 e H-6) e 3,1 ppm (H-2\*) são características da quitosana (LAVERTU ,2003). Os sinais localizados a 1,3 ppm (H-a) -1,42 ppm (H-a \*), são atribuídos aos prótons de metil ( $\text{CH}_3$ ) na cadeia principal do lactato de metila e adjacente à hidroxila final grupos do poliéster, respectivamente. O sinal de próton em 2,1 ppm (H-2), nos mostra a ligação amida, que confirma o enxerto bem-sucedido de quitosana com o lactato de metila (ESPARTERO ,1996).

As cadeias de lactato de metila foram inseridas na concentração de 33,4 mol Lactato de metila para cada 100 mol do anel de glicose da quitosana não enxertada, conforme apontado pela razão dos picos integrais de H-2 e H-2 \* do anel N-acetilglucosamina , mostrado na Figura 21. O modelo químico, mostrado na Figura 21 foi baseada na reação de esterificação dos grupos terminais carboxila do lactato de metila com os grupos amino da quitosana. A razão da integral de H-2 \* para a soma de H-2 \* e H-2 foi  $0,3 / (0,3 + 0,6)$  e confirma que grau de substituição de lactato de metila em quitosana foi de cerca de 33,4%.

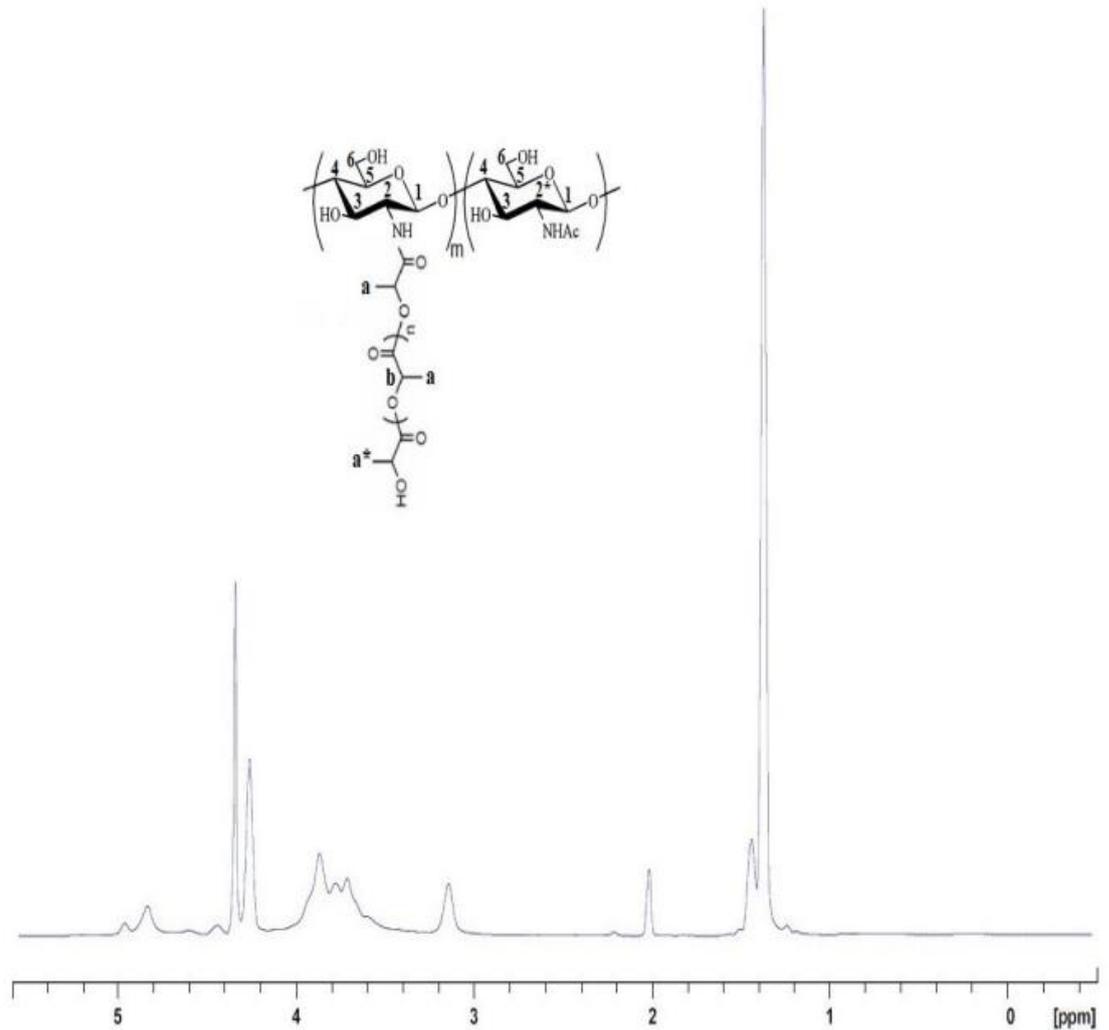


Figura 21 - Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (ressonância magnética nuclear) de lactato de quitosana medidos a 70°C para reduzir a interferência do sinal do solvente (D<sub>2</sub>O).

## 5.8 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOFIBRAS

As imagens de MEV das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg submetidas a eletrofiação são representadas na Figura 22a, mostrando que as nanofibras apresentaram morfologia contínua e lisa com boa integridade estrutural. Uma distribuição normal foi observada ao longo dos dados com uma média de  $340 \pm 18$  nm como pode ser observada na Figura 22b. As nanofibras formadas de QUI-g-PLA/SC:NPsAg em DMF (10% em peso) são lisas e contínuas, Figura 22a. No entanto, o aumento da concentração de QUI-g-PLA/SC:NPsAg, maior a 10% em peso, leva à diminuição da integridade estrutural pela formação de nanofibras defeituosas,

como balões, mostrado na Figura 22c e 22d. Este resultado sugere que a concentração de QUI-g-PLA/SC:NPsAg tem um impacto direto no chicote e no alongamento do jato de polímero durante o processo de eletrofiação. Uma diminuição no chicote ocorre com o aumento da concentração de QUI-g-PLA/SC:NPsAg devido ao peso físico da quitosana modificada e também da interação do QUI-g-PLA/SC:NPsAg com DMF dentro do jato. Isso explica a perda da integridade estrutural das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg submetidas a eletrofiação com a formação de nanofibras defeituosas, Figura 22c, 22d (ABDELGAWAD,2014).

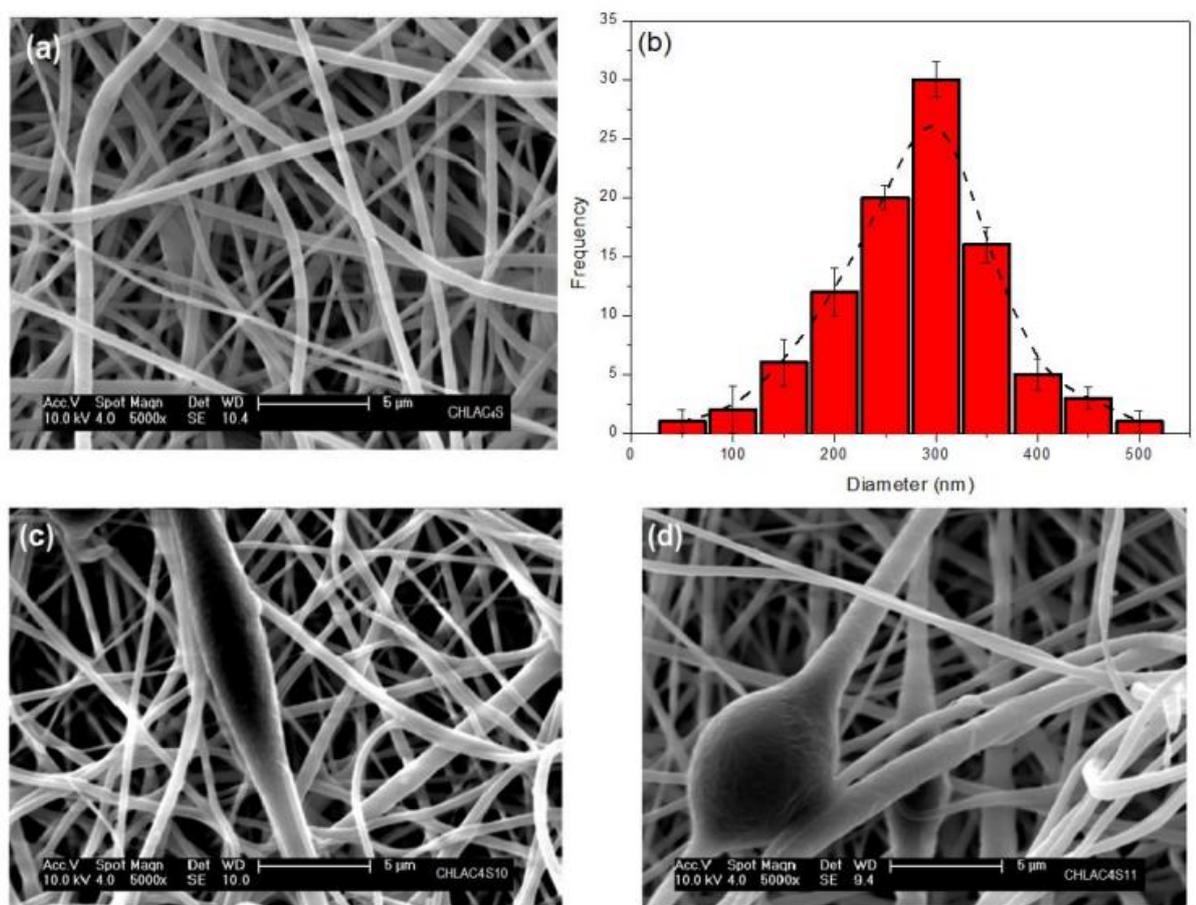


Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NPsAg a 10% em peso (a) e 13% em peso (c, d) produzidas usando DMF como solvente. O histograma de distribuição é mostrado em (b).

A morfologia das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg submetidas a eletrofiação depende de várias condições de parâmetros de processamento. A fim de obter controle sobre as propriedades das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg, como diâmetro, porosidade e morfologia, a viscosidade e a condutividade elétrica foram medidas em

função da concentração da solução QUI-g-PLA/SC:NPsAg em DMF. A Figura 23 mostra que a viscosidade aumenta continuamente com a concentração de polímero indo de 15 mPa.s a 2% em peso a 362 mPa.s a 10% em peso e 3462 mPa.s a 20% em peso.

A condutividade elétrica das soluções de polímero estava entre  $25 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (2% em peso),  $71 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (10% em peso) e  $32 \mu\text{S} / \text{cm}^{-1}$  (20% em peso), mostrada na Figura 23; A condutividade primeiro aumenta indo de 2 a 10% em peso para então diminuir com o aumento da concentração de QUI-g-PLA/SC:NPsAg devido à alta constante dielétrica ( $36,71$  a  $25^\circ\text{C}$ ) e momento de dipolo ( $3,24$  Debye) de DMF (RUMBLE ,2019).

Estes resultados indicam que uma solução ideal de QUI-gPLA: AgNP: C<sub>4</sub>S para a eletrofição de possuir uma condutividade iônica de  $29,8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , viscosidade de  $2959 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  e valores de concentração em torno de 10% em peso.

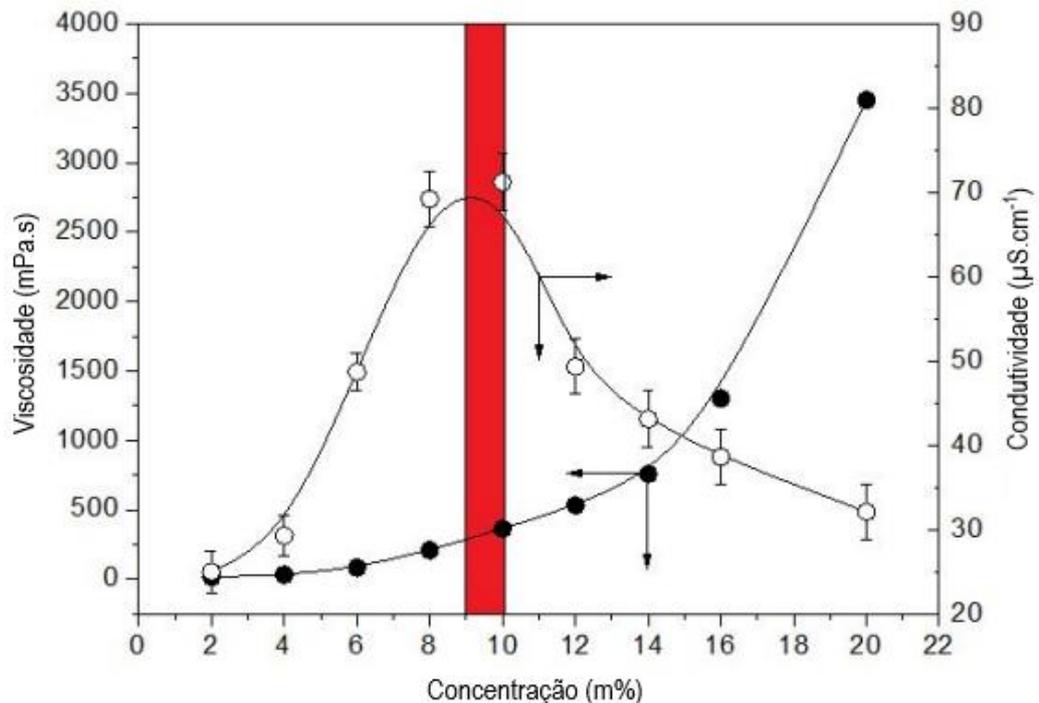


Figura 23 - Viscosidade da solução e condutividade elétrica em função da concentração de QUI-gPLA: AgNP: C<sub>4</sub>S medida à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Solvente: DMF. a área sombreada em vermelho indica a região mais adequada para a eletrofição da solução QUI-g-PLA/SC:NPsAg.

A resposta biológica das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag também pode ser influenciada pela hidrofiliicidade e porosidade das nanofibras, ambas são consideradas propriedades de superfície importantes que afetam a adesão celular e a proliferação de células de fibroblastos (AHMED,2015). As medições do ângulo de contato foram realizadas para nos permitir obter informação sobre a molhabilidade das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag, os resultados são mostrados na Figura 24. O ângulo de contato médio das nanofibras QUI-g-PLA ( $35,3^\circ \pm 3,4^\circ$ ) e QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag ( $12,8^\circ \pm 2,7^\circ$ ) revela a natureza hidrofílica das nanofibras eletrofiadas, Figura 24, bem como o papel do complexo sulfato de condroitina:NP<sub>s</sub>Ag em conferir hidrofiliicidade as nanofibras de lactato de quitosana, o tornando um material nanofibroso. Espera-se que a melhora na hidrofiliicidade com a adição do sulfato de condroitina leve a uma maior afinidade de fibroblastos para as nanofibras QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag em comparação com QUI-g-PLA (XU,2007). A porosidade (P) das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a Equação 13 (DARAEINEJAD,2021).

$$P = \left[ 1 - \frac{m}{A \cdot h \cdot \rho_o} \right] * 100 \quad \text{Equação 113}$$

onde, P, m, A, h e  $\rho_o$  são a densidade aparente, massa, área, espessura e a densidade aparente das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag, respectivamente.

Neste trabalho, foram obtidas nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag com porosidade de  $89 \pm 3,08\%$  e área de poro média de  $0,27 \mu\text{m}^2$ . Os altos valores de porosidade e área média dos poros devem ser adequados para a adesão e proliferação dos fibroblastos nas nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag, porque a matriz extracelular é composta de componentes nanofibrilares (AMEER,2019).

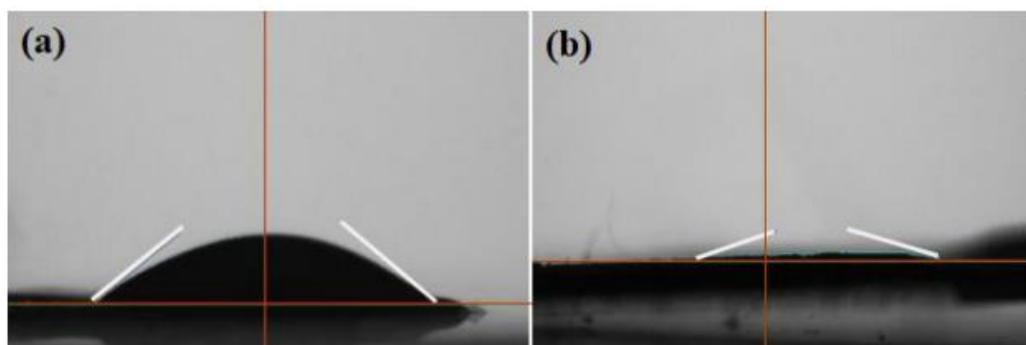


Figura 24 - Ângulo de contato das nanofibras de QUI-g-PLA (a) e QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag (b) à temperatura ambiente (25°C).

## 5.9 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Sabe-se que as bactérias estão presentes em todas as superfícies da pele. No entanto, quando a defesa primária da pele intacta desaparece, as bactérias começam a residir na superfície da ferida. A infecção surge devido à falta de oxigênio, nutrientes, anticorpos ou presença de biofilmes no tecido lesado (CANIC,2020). A infecção da ferida bacteriana é provavelmente a causa mais comum de atraso no processo de cicatrização. Os microrganismos mais encontrados em feridas infectadas são *S. aureus* e *E. Coli* (BESSA,2013). Por essas razões, as propriedades antimicrobianas das nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg estabilizado por sulfato de condroitina contra *E. coli* e *S. aureus* foram avaliadas.

A Figura 25 relata os resultados das propriedades antimicrobianas das nanofibras avaliadas contra microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, Gram (+) e Gram (-), respectivamente. Gluconato de clorexidina (CHG) 0,2% foi utilizado como controle positivo por ser um agente germicida comumente utilizado em serviços de saúde, enquanto o lactato de quitosana foi utilizado como controle negativo, pois não foi encontrado efeito antibacteriano. Nenhuma inibição de zona foi observada nos controles negativos, que continham o sobrenadante de cultura ou caldo nutriente estéril, Figura 25. O ensaio de difusão em disco mostrou que as nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg estabilizado por sulfato de condroitina podem inibir significativamente o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, Figura 25.

Os testes confirmam que a atividade antimicrobiana das nanofibras submetidas a eletrofiação foi superior à CHG para ambos os microrganismos *S.aureus* e *E. coli*, Figura 25. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura científica onde os íons  $Ag^+$  se ligam aos ácidos teicóicos (TAs) encontrados na parede celular da maioria das bactérias Gram-positivas, alterando sua permeabilidade, resultando no enfraquecimento da parede celular e na formação de espécies reativas de oxigênio (BROWM, 2013).

As espécies reativas de oxigênio parecem ser o principal mecanismo responsável pela rápida inibição do crescimento e reprodução das células bacterianas (DAKAL, 2016). A inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli* observada no estudo atual, indica o uso potencial das nanofibras de lactato de quitosana incorporado com

o complexo de NpsAg e sulfato de condroitina como um scaffold antimicrobiano para engenharia de tecidos.

As nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg e sulfato de condroitina, que estão em contato com a pele e o tecido da ferida, interagem com a umidade; resultando na liberação de íons  $Ag^+$  promovendo o efeito antimicrobiano. Além disso, também é importante determinar a citotoxicidade das nanofibras em questão, para assim considerar sua aplicação clínica.

Conforme a Figura 25, tem as barras de erro que indicam a média  $\pm$  D.P. ( $n = 3$ ) e na micrografia do teste microbiológico temos (a) representa o lactato de quitosana e (b) representa as nanofibras lactato de quitosana com nanopartículas de prata e sulfato de condroitina.

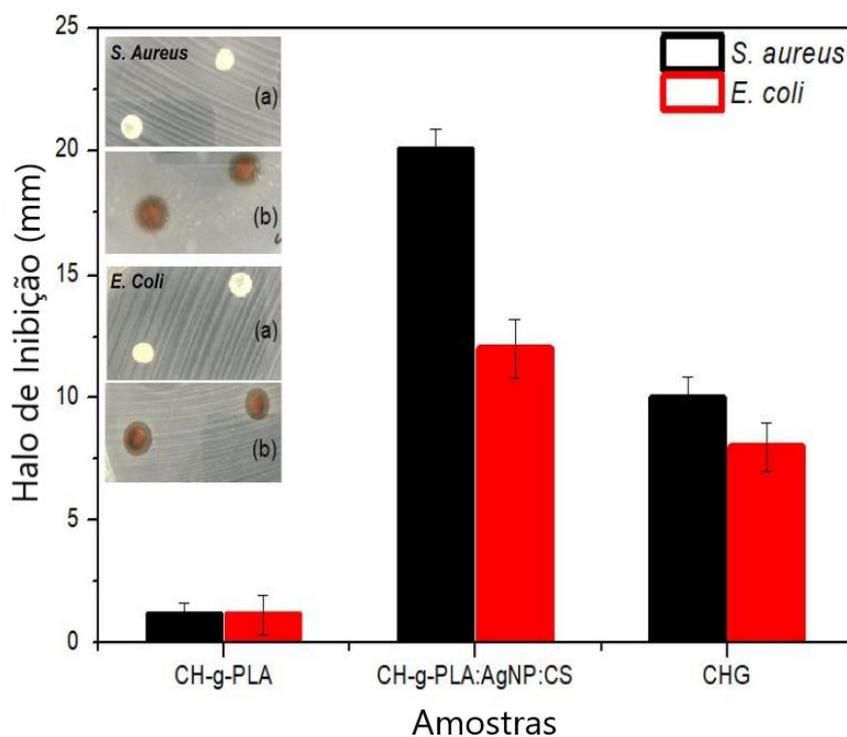


Figura 25 –Atividade antibacteriana das nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg e sulfato de condroitina contra *S. aureus* e *E. coli* por meio de ensaios de discos de difusão. O Gluconato de clorexidina (CHG) 0,2% foi utilizado como controle positivo e o lactato de quitosana como controle negativo.

## 5.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A Figura 26 mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade das nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de nanopartículas de prata e sulfato de condroitina, sendo utilizado fibroblastos L-929 como um modelo de célula de mamífero. Como pode ser visto, as nanofibras de lactato de quitosana incorporado com o complexo de NpsAg e sulfato de condroitina não têm efeito negativo na viabilidade celular. A não citotoxicidade das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg submetidas a eletrofiação pode ser atribuído a um equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico ideal estabelecido pela presença das cadeias do lactato e sulfato de condroitina enxertadas, respectivamente (CUI,2009).

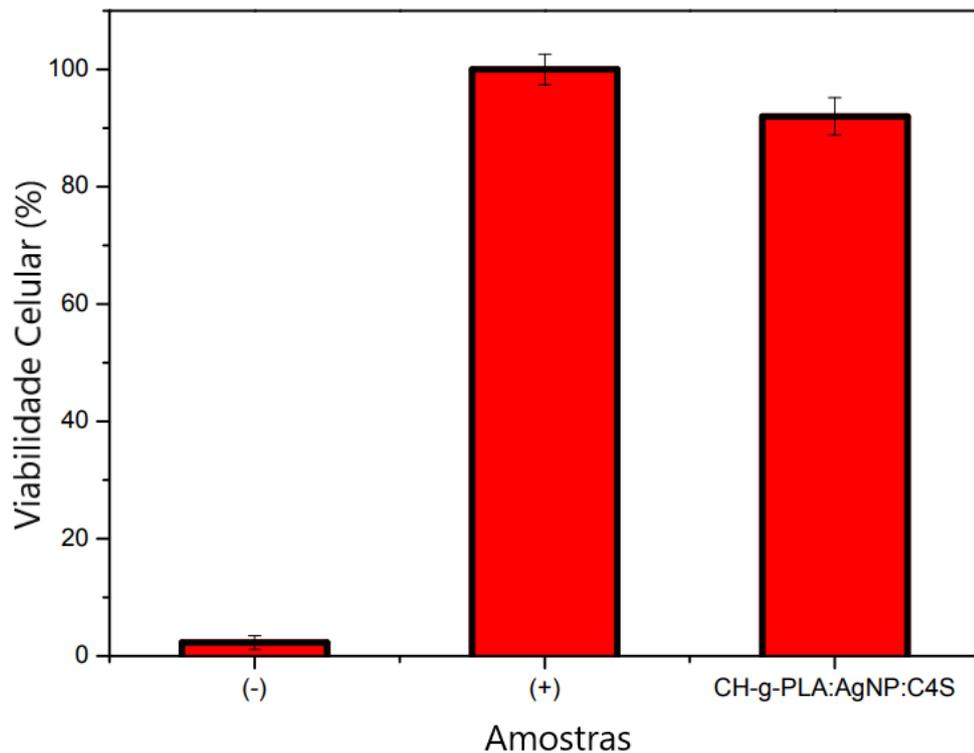


Figura 26 - Proliferação celular de células L-929 avaliada pelo ensaio MTT após 24h de incubação com 0,5% de fenol como controle negativo (-), meio de cultura fresco como positivo (+) e QUI-g-PLA/SC:NPsAg.

A Figura 27 mostra a microscopia de fluorescência de células de fibroblastos aderidas aos scaffold de QUI-g-PLA/SC:NPsAg e QUI-g-PLA para estudar a influência do sulfato de condroitina sobre proliferação das células de fibroblasto em nanofibras eletrofiadas. Os fibroblastos aderidos células em QUI-g-PLA/SC:NPsAg e QUI-g-PLA:AgNP foram coradas com laranja de acridina. Ambos os tipos de scaffold promovem

a adesão e proliferação de células de fibroblastos como mostrada na Figura 26. No entanto, é evidenciado em imagens ópticas de fluorescência, na Figura 27, que na eletrofição QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag as nanofibras exibem mais proliferação de células de fibroblastos de camundongo L929 em relação as nanofibras QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag após 24 horas, como esperado. Sabe se que sulfato de condroitina atua como constituintes de tecidos nativos e são amplamente utilizados para produzir scaffold que servem como um análogo ativo da matriz extracelular nativa (ECM) (ZONG,2005)

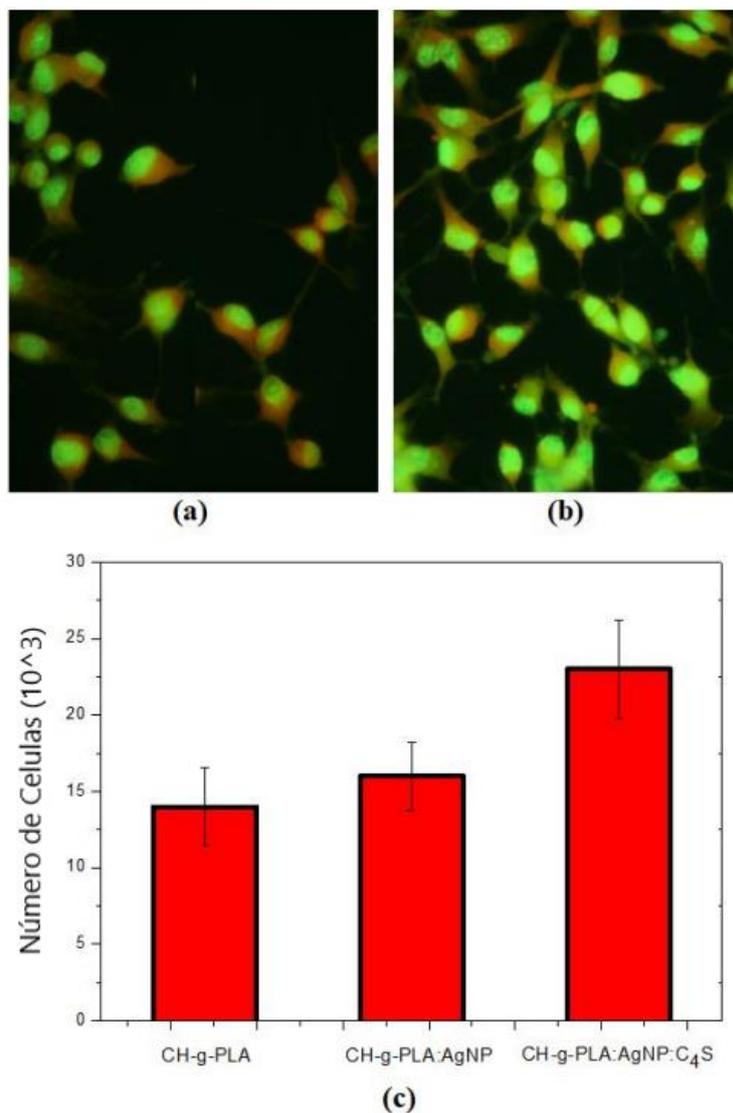


Figura 27 - Análise de microscopia de fluorescência de células de fibroblasto L-929 aderidas ao QUI-g-PLA (a) e QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag (b) após 24h de incubação. Ampliação: 200x. O número de células aderidas para diferentes substratos eletrofiadas semeados com  $1,5 \times 10^3$  células são mostrados em (c). Os dados são relatados como médias  $\pm$  DP.

### 5.11 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ESTUDO DE LIBERAÇÃO

Para realizar o estudo de liberação das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg foi necessário preparar uma curva de calibração. A Figura 28 mostra o espectro UV-vis de soluções aquosas QUI-g-PLA/SC:NPsAg em diferentes concentrações. A banda de ressonância de plasmon de superfície das nanopartículas de prata se observa em 435 nm.

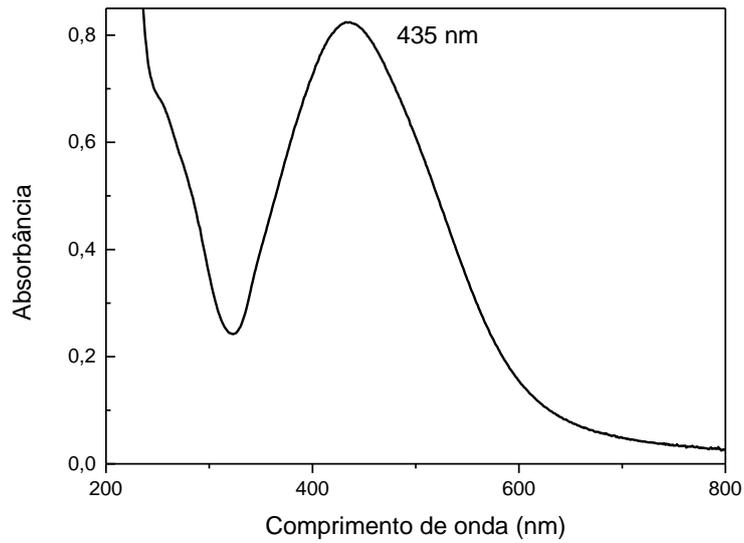


Figura 28 – Espectro UV-vis da solução aquosa de QUI-g-PLA/SC:NPsAg.

O perfil de liberação dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg é mostrado na Figura 29, notasse que a taxa de liberação dos íons  $\text{Ag}^+$  é relativamente alta nos primeiros dias e depois nivela-se com o tempo. As liberações cumulativas ao longo de 10 dias para as nanofibras QUI-g-PLA/SC:NPsAg foram de aproximadamente 40 partes por milhão (ppm) e uma constante taxa de liberação de  $\text{Ag}^+$  em torno de 1 ppm por dia, após os 10 primeiros dias, em estudos anteriores foi relatado que uma constante e prolongado taxa de liberação  $\text{Ag}^+$  em um nível de concentração bem menor em torno de 0,1 parte por bilhão (ppb) já se faz necessária para fornecer propriedades antibacterianas eficazes (KUMAR,2005).

Então, os resultados indicam que as nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NPsAg podem liberar quantidades suficientes de  $\text{Ag}^+$  para exibirem atividade antibacteriana sustentável.

Estudos recentes indicam que sulfato de condroitina é capaz de estimular o processo de cicatrização de feridas em um mecanismo complexo regulado por moléculas de sinalização produzidas por uma ampla gama de células presente na

matriz extracelular (ZOU,2009). O sulfato de condroitina é um grupo importante de proteínas na matriz extracelular que desempenha um papel significativo em cada estágio do processo de cicatrização de feridas (FRANTZ ,2010). Além das características discutidas acima, o lançamento local do sulfato de condroitina pode melhorar as propriedades finais das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag estimulando a reparação de feridas.

A Figura 29 mostra a fração de sulfato de condroitina liberado in vitro a partir das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag em função do tempo. O perfil de liberação mostrado na Figura 29, nos diz que a fração de sulfato de condroitina liberada in vitro aumentou até 12 dias e então alcançou o equilíbrio. Os dados de liberação obtidos das nanofibras QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag foram realizados em condições fisiológicas (tampão de fosfato, 50 mM, pH 7,4) e indicam uma maior retenção de sulfato de condroitina, ou seja, uma liberação de cerca de 58% de massa em 10 dias. Essa maior liberação de sulfato de condroitina sugere um tipo forte de complexação policatião-polianião, interagindo entre os grupos amino não enxertados de quitosana e grupos sulfato do sulfato de condroitina (DENUZIÈRE , 1999).

Então, os complexos formados são muito fortes e podem favorecer o aprisionamento das moléculas de sulfato de condroitina dentro das nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag.

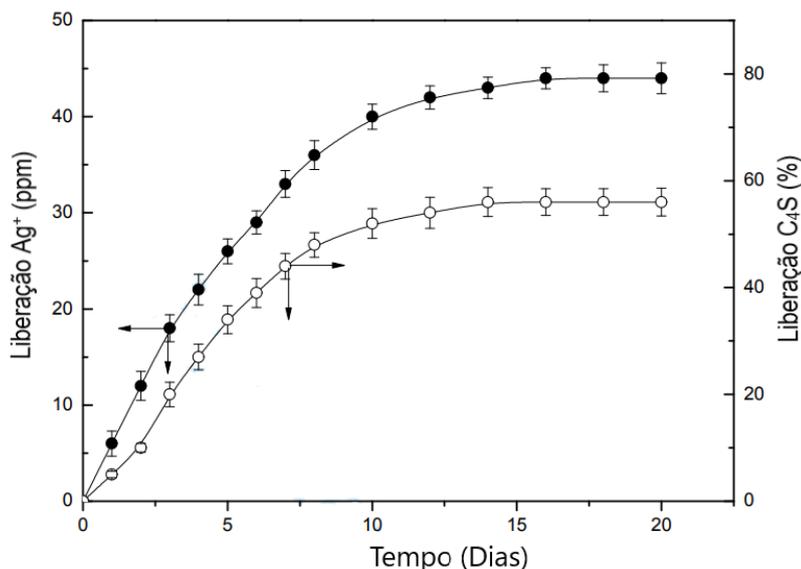


Figura 29 - Perfis de liberação in vitro de Ag<sup>+</sup> íons (●) e CS (○) a partir de nanofibras de QUI-g-PLA/SC:NP<sub>s</sub>Ag em função do tempo em solução tampão de fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,4) e 37 °C (valores médios ± dp; n = 3).

## 6. CONCLUSÕES

Após as análises dos resultados experimentais obtidos, podemos concluir que, a massa molar viscosimétrica média encontrada para a QUI foi de  $1,47 \times 10^5$  Da. Esta massa molar tem um valor intermediário, o que representa a possibilidade de ter boas propriedades físico químicas, permitindo também a solubilidade da QUI em até 2 %m/m, o que facilitou a reação de transesterificação para a formação do lactato de quitosana. O grau de desacetilação obtido foi de 92,53%, o que é muito desejável, visto que quanto menor o grau de desacetilação, maior a quantidade de quitina ligada a QUI, e com isso, mais difícil a solubilidade da QUI em ácidos fracos.

A reação de esterificação foi realizada com êxito obtendo-se valores de rendimento médio de 78,0% tanto para o lactato de metila e de etila, a sua conversão foi comprovado por FTIR.

A reação de aminólise para a síntese do lactato de quitosana foi realizada com sucesso o que foi comprovado pelas análises FTIR, TGA, DSC e RMN  $^1\text{H}$ , onde no FTIR apresentou o aparecimento de bandas de estiramento C-O em  $1121 \text{ cm}^{-1}$  e  $1076 \text{ cm}^{-1}$  e a banda de estiramento da ligação éter (C-O-C) em  $1037 \text{ cm}^{-1}$  confirmando a formação do lactato de quitosana. Pelos resultados obtidos através das análises térmicas, a formação do lactato de quitosana pode ser confirmado pela mudança no perfil térmico das amostras, mostrado pela menor estabilidade térmica no perfil de degradação do lactato de quitosana quando comparado com a quitosana. Através da análise de TGA foi possível calcular o valor de  $E_a$  para o lactato de quitosana encontrando um valor de 151,3 KJ/mol. O DSC mostrou uma tg a  $-37,8^\circ\text{C}$ , na quitosana modificada, que atribuímos ao enxerto de oligômeros de poli(acido láctico) na cadeia de quitosana. O deslocamento do próton em 2,1 ppm (H-2), nos mostra a ligação amida, que confirma o enxerto bem-sucedido da quitosana com o lactato de metila e oligômeros de poli(ácido láctico), permitindo a formação da nanofibra QUI-g-PLA.

A formação do complexo de sulfato de condroitina com NPsAg foi confirmado, pela banda de Plasmon em 435 nm, no UVvis e na caracterização por FTIR e TGA.

As imagens de MEV das nanofibras QUI-g-PLA/CS:NPsAg apresentam uma morfologia contínua e lisa com boa integridade estrutural, e uma espessura média em torno de 340 nm e pelo teste de angulo de contanto nos mostrou que as nanofibras

QUI-g-PLA/CS:NP<sub>s</sub>Ag possuem alta porosidade o que se torna desejável para a adesão e proliferação dos fibroblastos, promovendo assim o crescimento celular e ajudando na cicatrização de feridas.

As nanofibras de QUI-g-PLA/CS:NP<sub>s</sub>Ag apresentaram propriedades antimicrobianas para bactérias do tipo Gram-positiva de *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa de *Escherichia coli*, apresentando halos inibitórios de  $20,0 \pm 3,0$  e  $12,0 \pm 3,0$ , respectivamente.

O ensaio de citotoxicidade mostrou que as nanofibras de QUI-g-PLA/CS:NP<sub>s</sub>Ag não têm efeito negativo na viabilidade celular, apresentando um aumento na proliferação celular, devido ao sulfato de condroitina presente nas nanofibras.

O perfil de liberação dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) das nanofibras QUI-g-PLA/CS:NP<sub>s</sub>Ag indicam que as nanofibras podem liberar quantidades suficientes de  $\text{Ag}^+$  para exibirem atividade antibacteriana sustentável tornando as nanofibras como potenciais candidatas para estudos biomédicos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABDEL-MOHSEN, A. M. et al. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 1177-1187, 2013.

ABDELGAWAD AM, HUDSON SM AND ROJAS OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym*; v.100, p.166-178,2014.

ABRAHAM, G. A.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ROMÁN, J. S. Hydrophilic hybrid IPNs of segmented polyurethanes and copolymers of vinylpyrrolidone for applications in medicine. *Biomaterials*, v. 22, p. 1971-1985, 2001.

AHMAD, M., MANZOORA K., SINGHB S., IKRAMA S., Chitosan centered bionanocomposites for medical specialty and curative applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics* v.529, p.200–217,2017.

AHMED, F. E., LALIA, B. S., & HASHAIKEH, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, n.356, p.15-30, 2015.

AHMED M, DA SILVA RAMOS TA, DAMANIK F, et al. A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis. *Sci Rep*; v.5, p.1-12, 2015.

AHN, J.-S., CHOI, H.-K., CHUN, M.-K., RYU, J.-M., JUNG, J.-H., KIM, Y.-U., CHO, C.-S. Release of triamcinolone acetone from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials*, v.23 , p.1411-1416, 2002.

AKCELRUD, L. Fundamentos da Ciência dos Polímeros. 1ª Edição. ed. Barueri-SP: Manole, 2007.

ALBERNAZ, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Universidade de Brasília. Brasília, p. 122. 2014.

ALBERTS B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed. 2010.

ALVAREZ, P.J.J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, v. 12, p. 4271-4275, 2012.

AMEER JM , KUMAR PR A, KASOJU N. Strategies to tune electrospun scaffold porosity for effective cell response in tissue engineering. *J Funct Biomater*; v.10, p. 1-21,2019.

ANTUNES, F. S. 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.

B. CARREÑO-GÓMEZ, R. DUNCAN, Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspher, *Int J Pharm.*; v.148: p.231-240, 1997.

B. O. JUNG; C. H. KIM; K. S. CHOI, Y. M. LEE, J. J. KIM, Preparation of Amphiphilic Chitosan and Their Antimicrobial Activities, *Journal of Applied Polymer Science*, v.72: p. 1713- 1719, 1999.

BAJPAI, S. K. et al. Silver nanoparticles loaded thermosensitive cotton fabric for antibacterial application. *Journal of Industrial Textiles*, v. 44, n. 1, p. 58-69, 2014.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BAXTER, A.; DILON, M.; TAYLOR, K.D.A.; ROBERTS, G.A.F Improved method for I.R. determination of the degree of acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 14, p.66-169, 1992.

BEKTUROV, E. A., BIMENDINA, L. A. Complexes of water-soluble polymers. *Journal of Macromolecular Sciences-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics (C)*, v. 37, p. 501-518, 1997.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Out/Dez, p. 163-169, 1999.

BERNI NETO, E. A.; RIBEIRO, C. ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. São Carlos, EMBRAPA, 2008.

BESSA LJ, FAZII P, GIULIO MD et al. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J*; v.12, p.47-52, 2013

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

BHATTARAI, N., GUNN, J., ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 83-99, 2010.

BHUI DK, BAR H, SARKAR P et al. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *J Molec Liq*; v.145, p.33–37,2009.

BIGUCCI, F., LUPPI, B., CERCHIARA, T., SORRENTI, M., BETTINETTI, G., RODRIQUEZ, L. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 35, p. 435-441, 2008.

BORENFREUND E., PUERNER J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Journal Toxicol let*, v. 24. p.119-124, 1985.

BRIONES, A. V., SATO, T. Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan-carrageenan. *Reactive & Functional Polymers*, v.70, p. 19-27, 2010.

BROWN S, SANTA MARIA JR JP AND WALKER S. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*; v.67, p. 1-28. 2013

CANCELA, M.A.; ALVAREZ, E.; MACEIRAS, R., Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. *Journal of Food Engineering*; v.71, p.419-424, 2005.

CARASCHI, J., C., CAMPANA FILHO, SÉRGIO P. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio de carboximetilcelulose em solução aquosa. *Polímeros.*, v.9, n.2, p. 70-77, 1999.

CHAPDELAINE M. S. MTT reduction – a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. *Pharmakon Research International*, p.1-6, 2010.

CHENG, K.-M. et al. Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: characterization and surface modification. *Carbohydrate Polymers*, v. 110, p. 195-202, 2014.

CHEW,S.Y., Y WEN,Y., Y DZENIS,Y; KW LEONG,KW. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Curr Pharm Des.*; v.12, p. 4751–4770, 2006

CHRONAKIS, I.S. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review. *Journal of Materials Processing Technology* v.167, p.283–293, 2005

CHUNG, I.-M. et al. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. *Nanoscale Research letters*, v. 11, p. 40-54, 2016.

COSTA JÚNIOR., E.,S. Desenvolvimento da Matriz de Quitosana/PVA quimicamente reticulado para a aplicação potencial para a engenharia de tecido epitelial. Tese de Doutorado UFMG, 2008.

CUI W, ZHU X, YANG Y et al. Evaluation of electrospun fibrous scaffolds of poly(dllactide) and poly(ethyleneglycol) for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C*; v.29, p.1869-1876, 2009.

KOWALCZYK, D., KORDOWSKA-WIATER, M., J. NOWAK, B. BARANIAK, Characterization of films based on chitosan lactate and its blens with oxidized starch and gelation, *International Journal of Biological Macromolecules*,2015.

DAKAL TC, KUMAR A, MAJUMDAR RS et al. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol*; v.7, p. 1-17, 2016.

DARAEINEJAD Z, SHABANI I. Enhancing cellular infiltration on fluffy polyaniline-based electrospun nanofibers. *Front Bioeng Biotechnol*; v.9, p. 1-13, 2021.

DAMM, C., MUNSTEDT, H., ROSCH, A., The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites. In: *Materials Chemistry and physics*, v. 108, n. 1, p. 61-66, 2008.

DANGUANO J. K. M. F., SANTOS C., ROGERO S. O. Avaliação da citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Matéria*, v.12, p.134-139, 2007.

DASH, S., MURTHY, P, N., NATH, L., CHOWDHURRY, P . Kinectic Modeling on Drug release from controlled drug delivery systems . *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Reserch*, v.67, n 3,p. 217 – 233, 2010.

DENUZIÈRE A, FERRIER D AND DOMARD A. Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid): physicochemical and biological studies. *Ann Pharm Fr*; v.58, p. 47-53, 1999.

DESAI,K.G.H.,PARK,H.J.,Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agente on the properties of spray dried microspheres, *Journal of Microencapsulation*, v.22 , p. 377-395, 2005.

DHAWADE, P. P. & JAGTAP, R. N., Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research*, v.3, p.1372-1382, 2012.

DIARMID, A.M., JONES,W., NORRIS,I., GAO,J., JOHNSON,A., PINTO, N., HONE, J., HAN, B., KO,F., OKUZAKI,H., LLAGUNO, M. Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers. *Synthetic Metals*, v. 119, p. 27-30, 2001.

DIAS, Y.J., GIMENES, T.C., TORRES, S.A.P.V. et al. *J Mater Sci: Mater Electron* v.29, p. 514, 2018.

DINESH K. Patel , et al.Bioactive electrospun nanocomposite scaffolds of poly(lactic acid)/ cellulose nanocrystals for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 162, p. 1429-1441,2020.

ESPARTERO JL, RASHKOV I, LI SM et al. NMR analysis of low molecular weight poly(lactic acid)s. *Macromolecules*; v.29, p. 3535–3539, 1996.

EULALIO H. Y. C. et. al. Characterization and thermal properties of chitosan films prepared with different acid solvents. *Rev. Cubana Quím.* v.32, n.3, 2019.

FARIAS, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 129, 2010.

FEDDERSEN, R. L.; THORP, S. N. Sodium carboxymethylcellulose. In: Industrial Gums. Whistler, R. L., BeMiller, J. N. (Eds.), Academic Press, San Diego, p. 537-578, 1993.

FENG, Q. T.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F.Z; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: Journal of Biomedical Materials Research, v. 52, p. 662-668, 2000.

FRANCO, P.Q., SILVA, J.C., BORGES, JP. Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*, v. 22, 2010.

FRANCO, D & Gonçalves L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado, *Ver. Col. Bras. Cir.*,v. 35, p. 203-206, 2008.

FRANTZ C, STEWART KM AND WEAVER VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*; v. 123, p.4195-4200, 2010.

FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. D. S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arq Brasileira de Oftalmologia*, v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FONG, H., CHUN, I., RENEKER, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* v. 40, p. 4585–4592, 1999.

FUJIMOTO, J.; REIS, E.A.O.; PETRI, D.F.S; FILHO, S.P.C., Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína, *Química Nova*, v.25, n.5, p. 757-761,2002.

GARG,K., BOWLIN, G.L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. September. 2011.

GARNJANAGOONCHORN W., L. WONGEKALAK, A. ENKAGUL. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage, *Chemical Engineering and Processing*, p. 465–471, 2007.

GARLOTTA, D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid), *Journal of Polymers and the Environment*, v. 9, n. 2, p. 63-84, 2001.

GEORGE, M., EMILIA ABRAHAM, T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v114, p.1-14, 2006.

HAIDER, A.; KANG, I.K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. In: RAUWEL, P. et.al (Ed.). *Advances in Materials Science and Engineering, Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications*, Hindawi Publishing Corporation, p. 1-16, 2015.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained action medication theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HU, X., LIU, S., ZHOU, G., HUANG, Y., XIE, Z., & JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, v.185, p.12-21, 2014.

HUANG, Z. M., ZHANG, Y. Z., KOTAKI, M., & RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, v.63, p.2223-2253, 2003.

JAMEELA, S.R.; JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: Studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*. v. 16, p. 769-775, 1995.

JOSEPH, S.; MATHEW, B. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles and study on catalytic activity in the degradation of dyes. *Journal of molecular liquids*, v. 204, p. 184-191, 2015.

K. H. BAE, C. W. MOON, Y. LEE, T. G. Park, Intracellular delivery of heparin complexed with chitosan-g-poly(ethylene glycol) for inducing apoptosis. *Pharm Res* v.26, p. 93-100, 2009.

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

KEJING,A., HAIYING,L., SHIDONG,G., KUMAR, D.N.T. , QINGQING, W. Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly(l-lactide) nanofibers by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules* v.47, p. 380–388, 2010.

KIM, J. Y. et al. Wound healing and antibacterial activities of chondroitin sulfate- and acharan sulfatereduced silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 24, p. 390152-390153, 2013.

KREVELER, D. W. V.; NIJENHUIS, K. T. *Properties of Polymers*. 4ª Edição. ed. [S.I.]: Elsevier, 2009.

KROLL A., PILLUKAT M. H., HAHN D., SCHNEKENBURGER J.. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Journal oh Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.72, p.370-377, 2009.

KRUTYAKOV, Y.A.; KUDRINSKIY, A.A.; OLENIN, A.Y.; LISICHKIN, G.V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, v. 77, n.3, p. 233-257, 2008.

KSHITIJ GUPTA , VIJAY P. SINGH, RAJ K. KURUPATI, ET AL; Nanoparticles of cationic chimeric peptide and sodium polyacrylate exhibit striking antinociception activity at lower dose, Elsevier, India, 2008.

KUCINSKA-LIPKA, J., GUBANSKA, I., JANIK, H., & SIENKIEWICZ, M. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning

technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. *Materials Science and Engineering: C*, n.46, p.166-176, 2015.

KULKARNI A., BAMBOLE V.A., MAHANWAR P.A. Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v.49, p.427–441, 2010.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v46, p.1-27, 2000.

KUMAR, M. N. V. R., MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, p.6017-6084, 2004.

KUMAR R AND MUNSTEDT H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*; v.26, p. 2081- 2088, 2005.

LANGER, R.; ANDERSON, D.; TIMKO, B.P.; GAO, W; WHITEHEAD, K. Advances in Drug Delivery. *Annual Review of Materials Research*, v. 41, p. 1-3, 2011.

LEE, J. S., KIM, J. S., LEE, H. G. Gamma-oryzanol-loaded calcium pectinate microparticles reinforced with chitosan: optimization and release characteristics. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v.70, p. 213-217, 2009.

LAVERTU A, XIA Z, SERREQI AN et al. A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal*; v.32: p.1149-1158, 2003.

LEUNG, H.W. Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 49, p. 26-39, 2001.

LI-FENG Q., ZI-RONG X., YAN L., XIA J., XIN-YAN H., In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of humangastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol*; v.11, p.5136-5141, 2005.

LIU C., DESAI, K.G.H., TANG, X., CHEN, X., Drug Release Kinetics of spray-dried chitosan microspheres, *Drying Technology*, v 24, p. 769-776,2006.

LIU Y., PETERSON D. A., KIMURA H., SCHUBERT D. Mechanism of cellular 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal Neurochem*, v. 69, p. 581-593, 1997.

LLOYD H. Management of bleeding and malodour in fungating wounds. *J Comm Nurs* ; v. 22, p.28-32, 2008.

LOK, C-N.; HO, C-M.; CHEN, R.; HE, Q-Y.; YU, W-Y.; SUN, H.; TAM, P K-H.; CHIU, J-F.; C, C-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 12, p. 527-534, 2007.

LOPES, L. Evolução dos Materiais poliméricos - Centenário dos polímeros sintéticos: da bakelite aos nanocompósitos.

LU, J.W., ZHU, Y.L., GUO, Z.X., HU, P., YU, J. Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer* v.47, p.8026 - 8031. 2006.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. 1ª Edição. ed. Rio de Janeiro: e-papers, 2001.

M. C. M. LARANJEIRA, V. T. FÁVERE, Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico, *Química Nova*, ed.32, nº3, p.672 – 678, 2009.

M. EFENTAKIS, K. STAMOYLIS, Na Investigation Into the Swelling Properties, Dimensional Changes, and Gel Layer Evolution in Chitosan Tablets Undergoing Hydration, *Advances in Polymer Technology*, vol. 28, N°1, p.32 – 39, 2009.

MACHADO, F. M. Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 111. 2012.

MANJUMEENA RAJARATHINAM; KALAICHELVAN, P. T., Biogenic nanosilver as a potential antibacterial and antifungal additive to commercially available dish wash and hand wash for an enhanced antibacterial and antifungal activity against selected pathogenic strains. *International Research Journal of Pharmacy*. v4, p 7, 2013

MARK, J. E. *Physical Properties of Polymer Handbook*. 2ª Edição. ed. [S.l.]: Springer, 2006.

MARTINO GAUCHI G; TEISSIER R, Continuous Method for preparing ethyl lactate. Assignee: Arkema France, Colombes. US 7,297.809 B2, 2007.

MATSUSHITA, A. F. Y. et al. Síntese e Caracterização de nanopartículas de prata no polieletrólito Cloreto de 3-N-propilpiridínio silsesquioxano para aplicação em materiais têxteis. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, p. 12. 2012.

MEDEIROS, E. S., GLENN, G. M., KLAMCZYNSKI, A. P., ORTS, W. J., & MATTOSO, L. H. Solution blow spinning: A new method to produce micro-and nanofibers from polymer solutions. *Journal of applied polymer science*, n.113, p.2322-2330, 2009.

MEGELSKI,S., STEPHENS,J.S., CHASE, D.B., RABOLT,J.F. Micro and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Polymer*, p. 8456-8466, 2002.

MELLO, R.S., BEDENDO, G.C.; NOME, F.; FIEDLER, H.; LARANJEIRA, M.C.M. Preparation of chitosan membranes for filtration and concentration of compounds under high pressure process. *Polymer Bulletin*. v. 56, p. 447-454, 2006.

MEYERS, H. K., S. P. Application of chitosan for treatment of waste-waters. *Reviews on Environmental Contamination and Toxicology*, v. 163, p.1-28, 2000.

MICHAELS, A. S., MIEKKA, R. G. Polycation-polyanion complexes: Preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate). *Journal of Physical Chemistry*, v. 65, p. 1765-1773, 1961.

MONCK, J. J.; BARBIC, M.; SMITH, D. R.; SCHULTZ, D. A.; SCHULTZ, S.; Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemistry Physics*, v. 116, n. 15, 2002.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J., The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*, v. 65, p. 55- 63, 1983.

MOURA, M. R. D. Caracterização de matriz polimérica de hidrogel termosensível sintetizada a partir de alginato-Ca<sup>2+</sup> e poli (Nisopropil acrilamida), do tipo IPN e semi-IPN. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, p. 120, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* , v. 102, p. 47-90, 2006.

NARAGINTI, S.; SIVAKUMAR, A. Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalysed reduction. *Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 128, p. 357-362, 2014.

NATH, S. et al. Ligand-stabilized metal nanoparticles in organic solvent. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 341, n. 2, p. 333, 2009.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para aplicação na sanitização de embalagens. *Embrapa Instrumentação Agropecuária*, p. 1-4, 2008.

NOWACK, B.; KRUG, H.F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology*, v. 45, p. 1177-1183, 2011.

O'NEIL, M.J.; et.al. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. Ed. Whitehouse Station, N.J: Merck. 13 ed, 2001.

OLIVEIRA, J. E., MORAES, E. A., COSTA, R. G. F., AFONSO, A. S., MATTOSO, L. H. C., ORTS, W. J., MEDEIROS, E. S. Nano and Submicrometric Fibers of Poly(D,L-Lactide) Obtained by Solution Blow Spinning: Process and Solution Variables. *Journal of Applied Polymer Science*. Wiley Periodicals, Inc. 2011.

OYARZUN-AMPUERO, F. A., BREA, J., LOZA, M. I., TORRES, D., ALONSO, M. J. Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 381, p. 122-129, 2009.

OZDEMIR KG, YILMAZ H AND YILMAZ S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 90B: p. 82–86, 2009.

PAL, S.; TAK, Y.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gramnegative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1712-1720, 2007.

PANZAVOLTA,S., GIOFFRÈ,M.,FOCARETE,L.M., GUALANDI, C.,LAURA FORONI,L., BIGI, A. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-

linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomaterialia* 7 p. 1702–1709, 2011.

PARK, Y. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *nanobiotechnology*, v. 5, n. 3, p. 69-78, 2011.

PARK, K ;SHALABY,W.S.W;PARK,H. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. Ed. Technomic, Lancaster, Pensilvania.USA. p 77-82, 1993.

PARKER, N.G., POVEY, M.J.W. Ultrasonic study of the gelation of gelatin: Phase diagram, hysteresis and kinetics. *Food Hydrocolloids* v. 26, p. 99 -107, 2012.

PENICHE, C., ARGÜELLES-MONAL, W. Chitosan based polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Symposia*, v.168, p.103-116, 2001.

PEPPAS, N. A.; LANGER, R. *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology*. Bioengineering, Food, and natural products, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

PETER, M. G., FRANCO, T. T. *Tópicos especiais em processos bioquímicos: Biopolymers*. Apostila da aula teórica IQ 824-U. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 32, p. 629-640, 1995.

PHILIPP, B., DAUTZENBERG, H., LINOW, K.-L., KÖTZ, J., DAWYDOFF, W. Polyelectrolyte complexes: recent development and open problems. *Progress in Polymer Science*, v.14, p.91-172, 1989.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K.; Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, v 2, p.32, 2012.

PRIMO, F.L. Estudos fotofísicos e in vitro em modelo animal do fármaco fotossensibilizador Foscan ® incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do câncer de pele. [Dissertação]. FFCLRP USP: Ribeirão Preto, 2006.

QU, X., WIRSÉN, A., & ALBERTSSON, A.-C. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. *Polymer*, p 4841–4847., 2000.

QUEIROZ, A. A. A., FERRAZ, H. G., ABRAHAM, G. A., FERNANDEZ, M. M., BRAVO, A. L., ROMÁN, J. S. Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.64, p. 147-154, 2003.

R. A. A. MUZZARELLI, C. MUZZARELLI, CHITOSAN CHEMISTRY: relevance to the biomedical sciences. *Adv Polym Sci*; v.186, p. 151–209, 2005.

R. DASTJERDI et al. / *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.345, p.202–210, 2009.

R. M. C.; MENEZES, R. R.; OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS), *Materials Letters*, v. 149, p. 47–49, 2015.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossíntese de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. *Ciência e Cultura*, v. 65, n. 3, p. 1-5, 2013.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W., LIM., MA, Z. *An Introduction to Electrospinning and Nonofibers*. World Scientific, Singapore, 2005.

RAMASESHAN, R., SUNDARRAJAN, S., JOSE, R., & RAMAKRISHNA, S. Nanostructured ceramics by electrospinning. *Journal of Applied Physics*, n.102, p.111101, 2007.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K.; LYNCH, I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, v. 6, p. 2295-2350, 2013.

REPETTO G., DEL P. A., ZURIRA J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability / cytotoxicity. *Journal Nature Protocols*, v.3, 1125 – 1131, 2008.

RIBEIRO, C.A; Síntese e Caracterização de hidrogéis de Poli (N-Isopropilacrilamida) contendo sulfato de condroitina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas.. Tese de Doutorado de Materiais para engenharia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá,p 62. 2016.

RIMMER, S; CARTER, S.; RUTKAITE, R.; HAYCOCK, J.W. Highly branched poly-(N-isopropylacrylamide)s with arginine–glycine-aspartic acid (RGD)- or COOH-chain ends that form sub-micron stimulus-responsive particles above the critical solution temperature. *The Royal Society of Chemistry*, v. 3, p. 971-973, 2007.

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

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, p. 397-430, 2008.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, v. 5, p. 37-42, 1987.

RODRIGUES, P.O., SEGATTO, M, A. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de metodos estatísticos, modelos dependents e independents de analise. Revista Colombiana de Ciencias Quimico – Farmaceuticas, v.34, n.1, p 13-23, 2005.

ROSENSTEIN, E. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Hochstein, L., (ed.),Ediciones PLM S.A. de C.V., México D.F, 2002.

RUMBLE JR. CRC handbook of chemistry and physics, 100th ed. Boca Raton (EUA), Taylor and Francis Group, 2019.

SANA, S. S. et al. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Grewia flaviscences* and study of their antimicrobial activity. Materials Letters, v. 145, p. 347-350, 2015.

SANCHES, J. F. Biomateriais substitutos ósseos na implantodontia. Funorte/Soebras. Manaus, p. 56. 2010.

SANTOS, E. T. Inserção de nanopartículas metálicas em resina epóxi: estudos espectroscópicos. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, p. 81. 2011.

SCHATZ, C., DOMARD, A., VITON, C., PICHOT, C., DELAIR, T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer based polyelectrolyte complexes. Biomacromolecules, v.5, p. 1882–1892, 2004.

SCHUEREN, L.V., MOLLET, T., CEYLAN, Ö., CLERCK, K.D. The development of polyamide 6.6 nanofibres with a pH-sensitive function by electrospinning. European Polymer Journal v. 46, p. 2229–2239, 2010.

SELL, S.A., MCCLURE, M.J., GARG,K., WOLFE, P.S., BOWLIN, G.L. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews v. 61, p. 1007–1019, 2009.

SEN, I. K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using glucan from mushroom and study of antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 439-449, 2013.

SHARMA, A.; MONDAL, K.; GUPTA, M.N. Some studies on characterization of three phase partitioned chitosan. *Carbohydr. Pol.*, v.52, p.433-438, 2002.

SHARMA, R. A., GESCHER, A. J., STEWARD, W. P., Curcumin: The story so far, *European Journal of Cancer* v. 41, 1955-1968, 2005.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of desacetylation in chitin. *Biological Macromolecules*, v.18, p. 237-242, 1996.

SHU.,X.,Z.; ZHU.,K.,J. The Influence of Multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.54, p 235-243, 2002.

SILL,T.J., RECUMH. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* ;v.29, p. 1989-2006, 2008.

SILVA, F. P. Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Poli[(N-isopropilacrilamida)-co-(Ácido Metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 174. 2006.

SIMONE, S.,FIGOLI,A., CRISCUOLI, A., CARNEVALE, M.C., ROSSELLI, A., DRIOLI, E. Preparation of hollow fibre membranes from PVDF/PVP blends and their application in VMD. *Journal of Membrane Science* v. 364, p. 219–232, 2010.

SONG,J.H., KIM,H.E., KIM, H.W. Production of electrospun gelatin nanofiber by waterbased co-solvent approach. *J Mater Sci: Mater Med* v.19, p. 95–102, 2008.

SOUSA, A. D. Híbridos de Gel Polimérico em Sílica Mesoporosa Estruturalmente Ordenada para Liberação Controlada de Fármacos”. Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Belo Horizonte, p. 175. 2009.

SUNDARRAJAN, S., TAN, K. L., LIM, S. H., & RAMAKRISHNA, S. Electrospun Nanofibers for Air Filtration Applications. *Procedia Engineering*, n.75, p.159-163, 2014.

THOMAS V, YALLAPU MM, SREEDHAR B, BAJPAI SK, Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application, *J Biomater Sci Polym Ed.*;20 n°14, p-2129-44, 2009.

THOMAS, H. C., Tratamento de feridas de úlceras. Ed. Reichmann e autores; 4ª edição, 2002

THOMPSON , C.J., CHASE, G.G., A.L. YARIN, A.L., RENEKER, D.H. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* v.48, p 6913-6922, 2007.

TOMIC-CANIC M, BURGESS JL, O’NEILL KE et al. Skin microbiota and its interplay with wound healing. *Am J Clin Dermatol*; v.21, p 36-43, 2020.

TSUCHIDA, E.; ABE, K.; Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. *Advances in Polymer Science*, v. 45, p.1-119, 1982.

TUAL, C.; ESPUCHE, E.; ESCOUBES, A.; DOMARD, A., Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking. *Journal of Polymer Science*. v. 38, p. 1521-1529, 2000.

URAGAMI, T.; MATSUDA, T.; OKUNO, H.; MIYATA, T. Structure of chemically modified chitosan membranes and their characteristics of permeation and separation of aqueous ethanol solutions. *Journal of Membrane Science*, no 88, p. 243-251, 1994.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, p.93-98, 2006.

VAN M. J., KASPER G. J., CLOOS J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Molecular Biology*, v. 731, p.237- 245, 2011.

VARNER, K. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development. State of the science literature review: everything nanosilver and more. Scientific, technical, research, engineering and modeling support final report. Washington (DC), 2010.

VASIREDDY, R.; PAUL, R.; MITRA, A. K. Green Synthesis of silver nanoparticles and the study of optical properties. *Nanomaterials and nanotechnology*, v. 2, p. 1-6, 2012.

VICENTE A. M. M. Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade de desregulação endócrina. Tese de mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, 2012.

VIEIRA M. S. Emprego da citotoxicidade basal in vitro na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade oral aguda: a grandisina e seu metabolito majoritário como protótipos. Tese de mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade Federal de Goiás, Brasil, 2009.

VIKHOREVA, G.A.; KIL'DEEVA, N.R.; USTINOV, M.Y.; NOCHEVKINA, Y.N. Fabrication and study of the degradability of chitosan films. *Fibre Chemistry*. Vol. 34, p. 407-411, 2002.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

XIU, Z.M.; MA, J.; ALVAREZ, P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environmental Science and Technology*, v. 45, p. 9003-9008, 2011.

XU L-C, SIEDLECKI CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*; v.28, p. 3273-83, 2007.

YAMAMOTO, H.; AMAIKE, M., Biodegradation of cross-linked chitosan gels by microorganism. *Macromolecules*. v. 30, p. 3936 – 3937, 1997.

YANG, D., LI, Y., NIE, J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers* v. 69 , p.538–543, 2007.

YODKHUM, K. & PHAECHAMUD, K.; Thermal Analysis Of Chitosan-Lactate And Chitosan-Aluminum monostearate Composite System. *Advanced Materials Research* v. 506, p. 278-281, 2012.

YOUNG, J-J, et al, Chondroitin sulfate-stabilized silver nanoparticles: improved synthesis and their catalytic, antimicrobial, and biocompatible activities. *Carbohydrate Research* v.457, p. 14 – 24, 2018.

ZHANG, P.Y., WANG,Y.L., XU,Z.L., YANG, H. Preparation of poly (vinyl butyral) hollow fiber ultrafiltration membrane via wet-spinning method using PVP as additive. *Desalination* v.278, p. 186–193, 2011.

ZILLMER, T.A., VARELLA, R.F., ROSSETE, A.N. Avaliação de algumas características físicoquímicas da água do Ribeirão Salgadinho, Nova Xavantina-MT. *HOLOS Environment*, v.7, n.2, 2007.

ZHONG S., W.E. TEO, X. ZHU, R. BEUERMAN, S. RAMAKRISHNA, L. YUE, L. YUNG, Formation of collagen - glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*.; v.6, p. 2998–3004, 2005.

ZHOU SG, JIAO QC, CHEN L ET AL. Binding interaction between chondroitin sulfate and methylene blue by spectrophotometry. *Spectrosc Lett*; v.35, p. 21-29, 2002.

ZOU XH, JIANG YZ, ZHANG GR et al. Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing. *Acta Biomater*; v. 5: p. 1588-1595, 2009.