



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

EWERTON CLEMENTINO DINIZ

**COMPÓSITO BIOPOLÍMERO E ÓXIDO DE ZINCO NANOESTRUTURADO PARA
APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTIVO DE PELE**

Recife

2020

EWERTON CLEMENTINO DINIZ

**COMPÓSITO BIOPOLÍMERO E ÓXIDO DE ZINCO NANOESTRUTURADO PARA
APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTIVO DE PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Edval José Pinheiro Santos.

Coorientadora: Profa. Dra. Andreлина Maria Pinheiro Santos.

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

D585c Diniz, Ewerton Clementino.
Compósito biopolímero e óxido de zinco nanoestruturado para aplicação como substitutivo de pele / Ewerton Clementino Diniz – Recife, 2020.

106 f.: figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edval José Pinheiro Santos.

Coorientadora: Profa. Dra. Adrelina Maria Pinheiro Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Biomédica. 2. Substituto de pele. 3. Filmes polimérico. 4. Quitosana. 5. Óxido de Zinco. I. Santos, Edval José Pinheiro (Orientador). II. Santos, Adrelina Maria Pinheiro (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG / 2021-13

EWERTON CLEMENTINO DINIZ

**COMPÓSITO BIOPOLÍMERO E ÓXIDO DE ZINCO NANOESTRUTURADO PARA
APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTIVO DE PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovada em: 31/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrelina Maria Pinheiro Santos (Coorientadora)
CTG/UFPE

Prof. Dr. Ricardo Yara (Examinador interno)
CTG/UFPE

Profa. Dra. Enayde de Almeida Melo (Examinadora externa)
UFRPE

AGRADECIMENTOS

A meu pai (*in memorian*) e minha mãe por todo apoio e zelo. A eles que por terem batalhado possibilitaram que nada me faltasse durante a graduação e o mestrado.

Aos meus orientadores Dr. Edval José Pinheiro Santos pela sua orientação, paciência e correções que contribuíram para o refinamento e conclusão deste trabalho e Dra. Andrelina Maria Pinheiro Santos pela oportunidade de aprendizado, pela confiança, auxílio e interesse. Agradeço aos dois pela compreensão e empatia quanto aos momentos de dificuldade que enfrentei ao decorrer desse período.

As instituições que possibilitaram e forneceram estrutura para a conclusão deste trabalho, a coordenação do programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, ao Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas (LDN), ao Laboratório de Bioprocessos e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos nos anos do mestrado. Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, em especial a Técnica Marcia Monteiro, por me acolherem e dividirem comigo a bancada e algumas xícaras de café.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica e profissional. A Deus pelo ontem, por hoje e pelo amanhã.

É perigoso, sair porta à fora, você pisa na estrada e se não controlar seus pés, não há como saber até aonde você pode ser levado (TOLKIEN; J. R. R. 1954, p. 94).

RESUMO

Filmes compósitos foram obtidos a partir da quitosana aditivada com óxido de zinco nanoestruturado (nanoZnO). Investigou-se as características do compósito quanto à capacidade para aplicação como substitutivo temporário de pele. A quitosana foi escolhida por apresentar filmes com boa manuseabilidade, homogeneidade, baixa toxicidade e biodegradáveis. O ZnO é um conhecido agente contra bactérias, fungos e vírus; apresenta-se como um pó branco, amorfo e bioativo. O nanoZnO apresenta superfície nanoestruturada, o que confere alta relação entre área superficial e volume, aumentando os sítios de interação contra patógenos. Preparou-se filmes de quitosana (controle) e compósitos com nanoZnO (0,2%; 0,3%; 0,5% e 0,7%) pela técnica de *casting*, em que se solubilizou a quitosana (1%) e o glicerol (1%) em 100 ml de ácido acético glacial (0,5%). Avaliou-se as propriedades químicas (EDS), sensoriais (homogeneidade, facilidade em retirar o filme da placa, manuseabilidade e continuidade) e físicas (espessura, opacidade, teor de umidade, solubilidade, capacidade máxima de absorção e perda de massa). Demonstrou-se com os resultados obtidos que, a espessura sofreu alterações significativas com $p < 0,05$ entre os filmes compósitos (0,2%; 0,3%; 0,5% e 0,7%) e o controle, a opacidade sofreu variações (0,273 - 0,789) com aumento significativo nos filmes com 0,5 e 0,7% de nanoZnO. O teor de umidade foi elevado (42,72% - 47,31%) e o controle (42,72%) diferiu dos filmes aditivados $p < 0,05$. A taxa de solubilidade foi maior nos filmes imersos em água (17,35% - 20,53%) e menor nas soluções salinas NaCl (15,19% - 19,55%) e solução de Ringer (12,62% - 15,56%). A solução de NaCl é muito utilizada na prática médica para reposição de eletrólitos e diluição de medicamentos, a solução de Ringer é isotônica com composição iônica próxima ao plasma sanguíneo. A capacidade máxima de absorção teve maiores taxas em água (257,9% - 350,2%) e menores em tampão fosfato-salino (PBS) (90,5% a 108,7%) e a perda de massa variou bastante de 20,66% a 56,63%. O tampão PBS é muito utilizado em análises bioquímicas. Baseado nos resultados obtidos, observa-se que o compósito investigado tem potencial para uso como substitutivo temporário de pele.

Palavras-chave: Substituto de pele. Filmes polimérico. Quitosana. Óxido de Zinco.

ABSTRACT

Composite films were obtained from chitosan added with nanostructured zinc oxide (nanoZnO). The characteristics of the composite were investigated in terms of the application capacity as a temporary skin substitute. Chitosan was chosen because it presents films with good handling, homogeneity, low toxicity and biodegradable. ZnO is a known agent against bacteria, fungi and viruses; it presents itself as a white, amorphous and bioactive powder. The nanoZno has a surface nanostructured, which gives a high relationship between surface area and volume, increasing the sites of interaction against pathogens. Chitosan films (control) and composites with nanoZnO (0.2%; 0.3%; 0.5% and 0.7%) were prepared by the casting technique, in which they were solubilized chitosan (1%) and glycerol (1%) in 100 ml of glacial acetic acid (0.5%). Chemical properties were evaluated (EDS), sensory (homogeneity, ease of removing the film from the plate, handling and continuity) and physical (thickness, opacity, moisture content, solubility, maximum absorption capacity and loss of mass). It has been demonstrated with the results obtained that the thickness underwent significant changes with $p < 0.05$ between the composite films (0.2%; 0.3%; 0.5% and 0.7%) and the control, the opacity suffered variations (0.273 - 0.789) with a significant increase in films with 0.5 and 0.7% nanoZnO. The content humidity was high (42.72% - 47.31%) and the control (42.72%) differed from the added films $p < 0.05$. The solubility rate was higher in films immersed in water (17.35% - 20.53%) and lower in saline solutions NaCl (15.19% - 19.55%) and Ringer's solution (12.62% - 15.56%). The NaCl solution is widely used in medical practice to replace electrolytes and dilute medications, Ringer's solution is isotonic with an ionic composition close to blood plasma. The maximum absorption capacity had higher rates in water (257.9% - 350.2%) and lower in phosphate-saline buffer (PBS) (90.5% to 108.7%) and the mass loss varied widely from 20.66% to 56.63%. The PBS buffer is widely used in biochemical analyzes. Based on the results obtained, it is observed that the investigated composite has potential for use as a temporary skin substitute.

Keywords: Skin Substitute. Polymeric film. Chitosan. Zinc oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos polímeros.	16
Figura 2 - Estrutura da quitina e quitosana	17
Figura 3 - Mecanismos de ação do ZnO	20
Figura 4 - Micrografias eletrônicas do pó de nanoZnO sintetizado no LDN	23
Figura 5 - Filmes de PHB com nanoZnO a 5% - A) Ampliação 1K e B) Ampliação 10K.	24
Figura 6 - Regra de Wallace e Pulaski (Extensão da lesão)	35
Figura 7 - Profundidade das lesões	36
Figura 8 - Diagrama causa e efeito dos filmes de quitosana	46
Figura 9 - Pó de nanoZnO sintetizado no LDN	47
Figura 10 - Micrografia eletrônica do pó de nanoZnO sintetizado no LDN	48
Figura 11 - Diagrama causa e efeito do nanoZnO	51
Figura 12 - Diagrama causa e efeito do compósito	53
Figura 13 - Fluxograma apresentado as etapas para obtenção da solução filmogênica	58
Figura 14 - A: Pó de Óxido de zinco nanoestruturado gentilmente cedido pelo LDN; B: Sistema preparado para formulação da solução fimogênica ..	58
Figura 15 - A: Solução filmogênica; B: Placa com o filme aderido	70
Figura 16 - Tratamentos FQ, FQ02 e FQ03	70
Figura 17 - Tratamentos FQ05 e FQ07.	71
Figura 18 - EDS do pó de óxido de zinco nanoestruturado	72
Figura 19 - EDS dos filmes de quitosana e compósitos com nanoZnO	72
Figura 20 - Conteúdo de umidade (%) dos filmes	76
Figura 21 - Solubilidade (%) em 24h dos filmes em diferentes soluções aquosas (H ₂ O, NaCL e Ringer).	78
Figura 22 - Capacidade máxima de absorção (%) em 24h dos filmes em diferentes soluções aquosas (H ₂ O, NaCL, Ringer e PBS) ...	81
Figura 23 - Perda de massa (%) em 7 dias dos filmes em diferentes soluções aquosas (H ₂ O, NaCL, Ringer e PBS)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da pele e estruturas responsáveis por elas.	26
Tabela 2 - Características desejáveis para substitutivos	28
Tabela 3 - Compósitos utilizados como substitutivos de pele.	31
Tabela 4 - Critérios avaliados na caracterização sensorial	60
Tabela 5 - Espessura dos filmes produzidos à base de quitosana pura (FQ) e quitosana aditivada com nanoZnO (0,2% - FQ02; 0,3% - FQ03; 0,5% - FQ05; 0,7% - FQ07)	73
Tabela 6 - Transmitância (%) e Opacidade dos filmes produzidos à base de quitosana pura (FQ) e quitosana aditivada com nanoZnO (0,2% - FQ02; 0,3% - FQ03; 0,5% - FQ05; 0,7% - FQ07)	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	BIOCOMPÓSITOS	14
1.1.1	Polímeros	15
1.1.1.1	Quitosana	16
1.1.2	Óxido de zinco	19
1.1.3	NanoZnO utilizado no trabalho	23
1.2	SUBSTITUTIVOS DE PELE	25
1.2.1	A pele	25
1.2.2	Tipos de substitutivos de pele	26
1.2.3	Aplicação	27
1.2.4	Uso de compósitos como substitutivos de pele	29
1.3	QUEIMADURAS	33
1.3.1	Classificação das queimaduras	35
1.3.2	Tratamento	36
1.3.3	Microrganismos mais comuns em queimados	37
1.4	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	39
1.5	ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	39
2	FATORES DE INFLUÊNCIA	41
2.1	MÉTODOS DE SÍNTESE DOS FILMES DE QUITOSANA	41
2.1.1	Fatores de influência da preparação dos filmes de quitosana	42
2.1.1.1	Concentração	42
2.1.1.2	pH	43
2.1.1.3	Grau de desacetilação da quitina	44
2.1.1.4	Temperatura de secagem	44
2.2	MÉTODOS DE SÍNTESE DO ÓXIDO DE ZINCO NANOESTRUTURADO	46
2.2.1	Fatores de influência na preparação do nanoZnO	48
2.2.1.1	Temperatura do meio reacional	48
2.2.1.2	Tempo de reação	49
2.2.1.3	Precursores do ZnO	50
2.2.1.4	pH	51
2.3	FATORES DE INFLUÊNCIA NA PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO	52

2.3.1	Concentração do óxido no filme	52
2.3.2	Dispersão	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	PREPARAÇÃO DOS FILMES	57
3.1.1	Tratamentos	59
3.2	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS ANÁLISES	59
3.3	CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL	60
3.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	61
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	62
3.5.1	Espessura	62
3.5.2	Opacidade	62
3.5.3	Conteúdo de umidade	63
3.5.4	Solubilidade	64
3.5.5	Capacidade máxima de absorção em soluções aquosas ..	64
3.5.6	Perda de massa em soluções aquosas	65
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA POR ANOVA	66
3.6.1	ANOVA	66
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
4	RESULTADOS E ANÁLISES	69
4.1	CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL	69
4.1.1	Retirada da placa, Continuidade e Manuseabilidade ..	69
4.1.2	Homogeneidade	71
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	71
4.2.1	Análise química do nanoZnO	72
4.2.2	Análise química do filmes	72
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	73
4.3.1	Espessura	73
4.3.2	Opacidade	74
4.3.3	Conteúdo de umidade	75
4.3.4	Solubilidade	77
4.3.5	Capacidade máxima de absorção em soluções aquosas ..	80
4.3.6	Perda de massa em soluções aquosas	84
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
5	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	88

5.1	TRABALHOS FUTUROS	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão humano e junto aos seus anexos formam o sistema tegumentar, a pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. É responsável por proteger o organismo de agentes e traumas externos, regula a temperatura corporal, excreção de metabólitos e auxilia na síntese da vitamina D, funções importantes para a homeostase corporal [1][2][3].

Várias causas podem levar a descontinuidade da pele, as mais frequentes são as lesões mecânicas, químicas e físicas. As queimaduras são lesões de origem física, mas especificamente térmica, que provocam diversas alterações fisiológicas, variando de leve vermelhidão ao óbito. A gravidade dos danos gerados depende do grau e da extensão de pele atingida, podendo deixar sequelas funcionais, incapacitantes e desfigurativas. As lesões e a inflamação a pele propiciam um ambiente ideal a microrganismos, elevando o risco de infecções oportunistas e sepse [4][5][6][7].

O tratamento consiste na limpeza da área afetada, aplicação de agente antimicrobiano e curativo oclusivo, o objetivo é a reparação da área tecidual lesionada. Em ferimentos profundos e extensos nem sempre é possível a regeneração da pele, nesses casos a enxertia é o procedimento adotado. Nas últimas décadas houve aumento no interesse do desenvolvimento de materiais (sintéticos ou biológicos) para uso em terapias como substitutivos de pele [6][8][9].

Nesse contexto diversas estruturas apresentam-se como fonte de biopolímeros, dentre eles o amido [10][11], a quitosana [12][13], o alginato [14][15] e a gelatina [16][17].

O mercado dispõe de substitutivos de pele com diversas aplicações, contudo há bastante demanda e materiais elegíveis para este fim. A quitosana é um polímero natural, com baixa toxicidade e abundância na natureza, apresenta a capacidade de formar filmes duráveis tornando-o ideal para uso como substitutivo de pele [18][19][20].

A quitosana é um produto da desacetilação da quitina insolúvel em água, capaz de formar filmes e outros produtos utilizados como biomateriais. A matriz formulada a base de quitosana pode ser aditivada com um agente antibacteriano para uso em terapias tópicas, diminuindo a necessidade de trocas e gerando um ambiente livre de infecções [12][13][21].

Estima-se que um milhão de pessoas sofram queimaduras no Brasil, aproximadamente 100.000 buscam atendimento hospitalar e 2.500 irão a óbito, constituindo-se um agravo de saúde pública. O tratamento é doloroso e os custos são elevados [22].

1.1 BIOCAMPÓSITOS

Segundo a sociedade europeia de biomateriais, biomaterial é qualquer substância, droga ou combinação de substâncias, naturais ou de origem sintética, tais como partes de implantes médicos ou próteses, que interagem com os sistemas biológicos, podendo ser utilizados para substituir ou tratar parcialmente tecidos, órgão ou função corporal [23].

Os biomateriais devem preferencialmente ser de fácil obtenção e ter densidade próxima ao dos meios biológicos, ser atóxicos, não carcinogênicos e devem apresentar biofuncionalidade e biodegradabilidade, a biofuncionalidade só é adequada caso o material seja biocompatível[18][24][25].

A sociedade europeia de biomateriais define biocompatibilidade como "a capacidade de um material desencadear uma resposta adequada do hospedeiro, numa aplicação específica", é o requisito mais importante a ser observado sendo preferível materiais que provoquem o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias [18][24][25].

Quanto ao material de origem, são elencados como metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos. O sucesso dos biomateriais no sistema biológico depende de diversos fatores, entre eles, propriedades do material, os polímeros estão entre os materiais mais utilizados, sozinhos ou em compósitos na formulação de biomateriais [26][27].

Smith (1963) define compósito como: "Um material formado pela mistura ou combinação de dois ou mais micro ou macro constituintes que diferem na forma e na composição química e que, na sua essência são insolúveis uns nos outros". Sendo assim adquirem melhores propriedades ao serem combinados. Os compósitos normalmente são formados por uma substância ou componente contínua, denominada matriz e outra substância, denominada reforço, que é dispersa na primeira. As características dos compósitos são então a soma das propriedades dos seus constituintes [26][27][28].

Há um esforço para substituir materiais industriais a base de petróleo, por alternativas sustentáveis, renováveis e biodegradáveis, para esse fim existe o interesse de em uma ampla gama de biopolímeros como a quitosana, a celulose, o alginato e o colágeno [29].

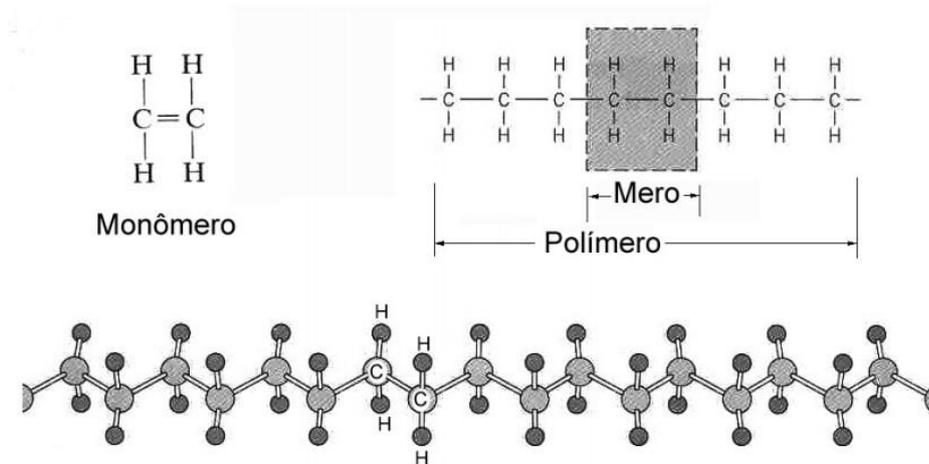
Os biocompósitos e compósitos híbridos apresentam-se como materiais elegíveis e economicamente interessantes para diversas práticas médicas, de implantes ósseos a substitutivos de pele. Formulados geralmente com uma matriz polimérica e reforçada com outra substância natural ou sintética. O reforço a essas matrizes para uso como biomateriais tencionam manipular propriedades mecânicas ou conferir atividade contra agentes patogênicos [30].

Biopolímeros apresentam diversas vantagens como não toxicidade, biodegradabilidade e profusa distribuição, sendo comumente empregados como matrizes para compósitos com diversos fins biomédicos. Alguns ainda exibem bioatividade como a quitosana que possui capacidade de interagir com o sistema humano, auxiliando na reorganização celular, exibindo atividade hemodinâmica e facilitando a cicatrização [29][30].

1.1.1 Polímeros

Mano e Mendes (1999) definem polímeros como "macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra- e intermoleculares. Possuem unidades químicas ligadas por covalências, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominados meros, como ilustrado na Figura 1, o número de meros da cadeia polimérica é denominado grau de polimerização"[27].

Figura 1 - Estrutura dos polímeros



Fonte: Mano e Mendes (2012).

Os polímeros podem ser classificados de acordo com sua origem em sintéticos ou naturais (biopolímeros), os naturais foram os primeiros descobertos e sua síntese envolve reações em cadeia, catalisadas por enzimas do maquinário celular em processos metabólicos complexos. São os padrões utilizados para a confecção de polímeros sintéticos, que por sua vez são basicamente formados a partir do petróleo; quanto ao número de monômeros envolvidos na sua formação, dividem-se em homopolímeros, formados por apenas um tipo de monômero, e copolímeros que contêm quantidades de comonômeros acima de 5%. Podem ainda ser classificados entre orgânicos ou inorgânicos [27].

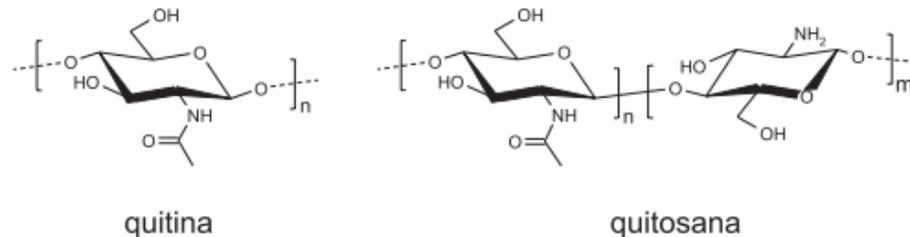
1. 1. 1. 1 Quitosana

A quitina é o material orgânico mais abundante, a produção anual é inferior apenas a da celulose, é produzido estimativamente 100 bilhões de toneladas anualmente. A principal fonte de quitina é a indústria de processamento crustáceo, a porcentagem da substância nesses animais pode variar de 10 a 80% [31][32].

É um biopolímero de elevado peso molecular, produto da desacetilação da quitina. Os copolímeros quitosana e seu precursor a quitina, como ilustrado na Figura 2, são constituídos por unidades de 2- acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose (N-acetilglucosamina) e 2-amino-2-deoxi-Dglicopirranose (glucosamina) unidas por ligações glicosídicas beta (1-4). O que irá diferenciar a quitosana da quitina é a proporção dos elementos, na quitosana a N-acetilglucosamina é predominante, já na quitina o

elemento de maior predomínio é glucosamina. Ambas são insolúveis em água e a quitosana é solúvel em meios ácidos com o pH abaixo de 6,2 [12][13][21][31][33].

Figura 2 – Estrutura da quitina e quitosana



Fonte: Hélio et al. (2006).

É um biopolímero polieletrólito, ou seja, apresentam grupos ionizáveis em toda a extensão da molécula, esses grupos são catiônicos, em consequência possui capacidade de adsorção e habilidade quelante, podendo então ser aplicada desde a agricultura até a engenharia de tecidos [34][35].

É um polímero bioativo, a quitosana em pH7 (o mesmo dos fluidos teciduais) adquire cargas positivas acarretando a aglomeração de elementos do sistema sanguíneo, estimulando a coagulação e a cicatrização, auxilia também na regeneração tecidual enquanto degrada-se naturalmente [21][35]. Nos países orientais a quitosana é bastante utilizada no tratamento de feridas e cicatrização de queimados [36].

Por bioatividade entende-se a capacidade de promover ou participar de uma reação biológica específica, a bioatividade de quitosana deve-se, sobretudo aos grupamentos aminos, a sua capacidade de retenção de moléculas de água, a capacidade de promover o sistema de coagulação via mudança de carga e combater infecções por interação com as membranas dos microrganismos. Oligômeros de quitosana são capazes de ativar macrófagos locais que iniciam uma resposta imune via citocinas [12][34][35][36].

Os grupos aminos predominantes na quitosana, facilitam o rearranjo de moléculas de água em torno da estrutura, essa característica concebe ao material alto grau de retenção de água, podendo ocasionar redução da estabilidade do material por meio da constante umidade provocando o intumescimento da matriz e a desagregação das fibras [12][13][21][37].

A cristalinidade da quitosana está relacionada com o grau de desacetilização, em estado sólido o pó de quitosana costuma ser semicristalino, contudo, ao ser trabalhado o material pode mudar sua conformação, as mudanças ocorrem sobretudo por quebras nas ligações de hidrogênio intermolecular que podem tornar o material mais amorfo [12][38][39].

Alguns fatores como origem, pureza, tempo de preparação e temperatura (de reação e secagem) podem interferir na cristalinidade. A cristalinidade da quitosana pode ser um fator determinante em características do material, a permeabilidade ao vapor d'água e absorção de moléculas de água parecem ser inversamente proporcional a cristalinidade, a degradação e reatividade são mais evidentes em quitosanas mais amorfas [12][38][39].

A quitosana costuma ser misturada com outros polímeros devido a resistência e maleabilidade serem limitadas, a adição de outro polímero como agente plastificante, permite tentar controlar o tempo de degradação e resistência mecânica do material [12][40][41].

A versatilidade, abundância, características e facilidade na manipulação fez da quitosana um dos principais biopolímeros pesquisados para aplicação biomédica. A bioatividade desse material, que possui ação anti-inflamatória, antimicrobiana e aceleração na cicatrização, torna-o um ativo valioso na exploração de aplicações diversas [42].

Gokarneshan (2017) espera que as nanofibras de quitina e quitosana sejam aplicadas em produtos biomédicos em um futuro próximo, baseado no que indica a literatura sobre o papel dessas nanofibras no aumento de camada granular da pele quando aplicada topicamente e na supressão de fibrose, via modulação de citocinas, que é iniciado pela secreção através de macrófagos ativados por oligômeros de quitosana, as citocinas sinalizam e mediam o processo inflamatório e cicatrizante [12][13][21][42].

Membranas, hidrogéis e filmes também podem ser aplicados diretamente em feridas, as formulações da quitosana permitem grande variabilidade de aplicações em diferentes formas. Hidrogéis e filmes são comumente estudados em associação com outros polímeros ou agentes antimicrobianos em compósitos. Objetiva-se nessas aplicações a oclusão da ferida, cicatrização rápida, manutenção da umidade e proteção contra infecções oportunistas [43].

A quitosana possui características interessantes para aplicação como biomaterial, apresentasse biodegradável, biocompatível e atóxico. Possui atividade antimicrobiana, decorrente dos grupos aminos presentes nas unidades de glucosamina, as características químico-físicas da quitosana facilita a formação de géis e filmes com boas propriedades mecânicas diversas, é utilizada tanto para cicatrização da pele como reestruturação cartilaginosa e óssea. É empregada como suplementação alimentar, na agricultura, em revestimento de alimentos, em sistemas de liberação controlada de fármacos e em curativos disponíveis no mercado [12][13][21][34].

O Hemcon® (2003) é um desses curativos, projetado em parceria com o exército dos Estados Unidos, apresenta-se como uma esponja de quitosana, formulada pela liofilização do acetato de quitosana e revestida de teflon. O curativo apresenta efeito hemostático sendo também eficaz contra bactérias Gram positivas e negativas [21][44][45].

A evolução do Hemcon® originou outros dois produtos o Chitoflex® (2006) e o Chitogauze® (2014). O Chitoflex® possui dupla face de quitosana ativa é mais flexível e eficaz no estancamento do sangue, a Chitogauze® é formulada a partir de uma trama de poliéster/*rayon* revestida de quitosana. Ambos produtos apresentam poderoso efeito hemostático, com comprovada supressão de hemorragias, oferecem barreira contra agentes externos e eficiente atividade contra microrganismos [44][45].

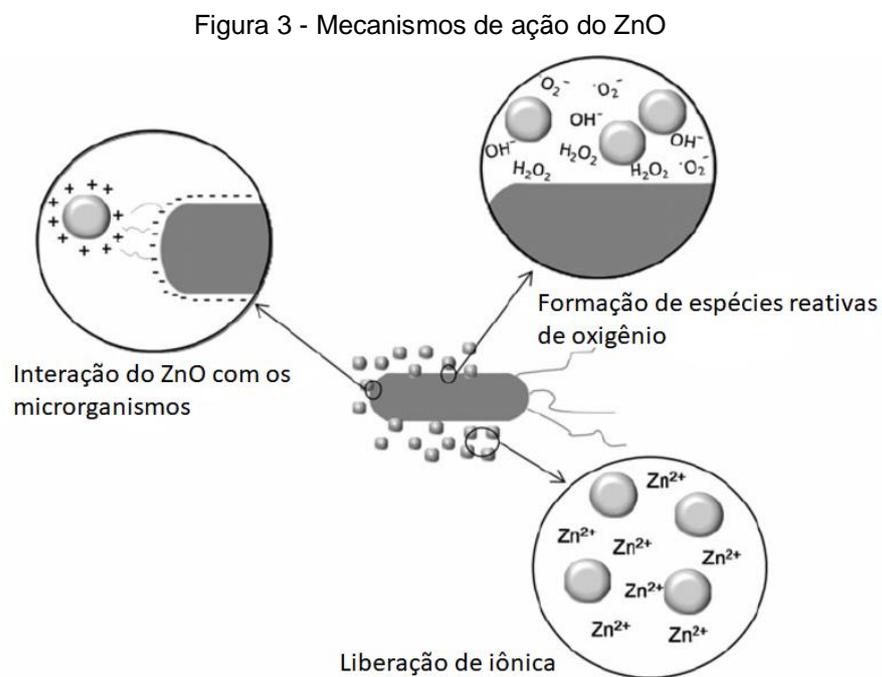
Os produtos baseados em quitosana podem apresentar-se como esponjas, hidrogéis, filmes, *scaffolds* e nanoestruturas. Uma matriz de quitosana é insolúvel em água, maleável, com baixa opacidade, intumescente e capaz de ligar-se a outros materiais poliméricos [29][30].

1.1.2 Óxido de zinco

O óxido de zinco apresenta-se como um pó fino, amorfo e de coloração branca. Bioativo, o óxido de zinco possui comprovado efeito contra diversos microrganismos. O método de ação do óxido consiste na sua interação com a parede externa do organismo e formação de espécies reativas de oxigênios. A eficácia do material pode ser alterada com a formação de nanoestruturas [47][52].

Na natureza ele pode ser encontrado na zincita, contudo para as diversas aplicações industriais do material existem diversos métodos de síntese baseados em outros precursores do óxido. As vantagens no uso de agentes inorgânicos, como metais e óxidos metálicos, frente aos já aplicados no combate a agentes infecciosos utilizados na antibioticoterapia, não está apenas relacionada a resistência adquirida por microrganismos aos antibióticos de costume, partículas como as de ZnO apresentam alta estabilidade, baixa toxicidade e resistência ao calor, tornando-as bastante pesquisadas como reforço para o combate contra patógenos [29][47][51].

O efeito contra agentes infecciosos do ZnO, parece estar atrelada ao tamanho de suas partículas com maior eficácia presente em cristais com menores tamanhos. Sendo assim a síntese do ZnO em nanoescala reforçaria sua eficácia antipatogênica, contudo o método de ação ainda é motivo de discussão, três vias (Figura 3) principais são creditadas para o efeito do ZnO, a formação de espécies reativas de oxigênio, a liberação iônica de ZnO^{2+} e os danos causado pelo óxido ao interagir com os sítios externos dos agentes patogênicos [51][54][55].



Fonte: Espitia et al. (2012).

A nanociência e nanotecnologia, área que atua na escala de 1 a 100 nanômetros, começou a se estabelecer na década de 80, do século passado, com o surgimento de novos instrumentos científicos, o estudo dos nanomateriais tornou-se

o foco de diversos pesquisadores a fim de controlar estruturas e suas propriedades em escala cada vez mais reduzidas [46].

Os materiais apresentam diferentes propriedades devido às alterações decorrentes da mudança de escala, ao atingir a escala nano os materiais tem seus elétrons confinados em seu interior, isso muda as propriedades elétricas, ópticas e magnéticas tornando-as mais acentuadas, por outro lado também há um aumento da razão entre a área e o volume do material tornando os efeitos da superfície mais evidentes, essas características podem ser aproveitadas em várias aplicações [47][48].

Em primeira aproximação pode-se considerar que o pó é formado por esferas. Considere-se as seguintes equações:

$$A = 4\pi R^2$$

$$V = \frac{4\pi R^3}{3}$$

E a relação entre a área superficial e o volume:

$$\frac{A}{V} = \frac{4\pi R^2}{\frac{4\pi R^3}{3}} = \frac{3}{R}$$

Em que: A é a área da esfera; V é o volume da esfera; R o raio da esfera.

Nota-se que para um mesmo volume de material, composto de esferas de volume V, a área de interação, A, aumenta à medida em que V diminui. Vale salientar que, embora a aplicabilidade de materiais manométricos esteja em expansão, V muito pequeno pode trazer impacto negativo ao penetrar em sistemas biológicos.

O ZnO apresenta estabilidade química elevada, tem baixa constante dielétrica, alta transmitância luminosa e grande atividade de catalise, e incrível absorção infravermelho e ultravioleta. Por causa de suas características piezoelétricos, luminescentes, semicondutores ou condutores e bactericidas pode ser utilizado em eletrônica, catálise, fotodetectores, sensores, células solares e compósitos para biomateriais [47][49][50].

Embora apresentem vantagens, o elevado interesse no estudo das nanopartículas trouxe a necessidade de pesquisar seus efeitos tóxicos a níveis ambientais e aos sistemas orgânicos. O uso das partículas de ZnO a certos níveis de concentração é comprovadamente seguro e permitida pelo FDA, contudo as nanopartículas apresentam alta distribuição sistêmica ao entrar em contato com a circulação sanguínea [56][57][58].

Estudos com nanopartículas indicam que o aumento no uso pode ocasionar presença e deposição das nanopartículas em sítios corpóreos. A distribuição pode se dar por meio das vias aéreas e aplicação tópicas de cosméticos e medicamentos, já sendo relatado a presença de traços de nanopartículas ZnO em locais como mamas, alvéolos pulmonares e em células da glia [59][60].

O tamanho das nanopartículas permite a ultrapassagem da barreira hematoencefálica e conseqüentemente a distribuição no sistema nervoso central. Estudos *in vitro* e em modelos animais, demonstram a alteração de processos mediados pelo sistema nervoso devido a presença das nanopartículas [60][61][62].

As nanopartículas podem causar apoptose celular, danos neurais e interferir nas trocas iônicas via canais de cálcio. O mecanismo envolvido na cito e genotoxicidade das nanopartículas de ZnO está relacionado a liberação de íons ZnO^{2+} no meio extracelular, o que causa reações imunes e danos intracelulares [58][60][62].

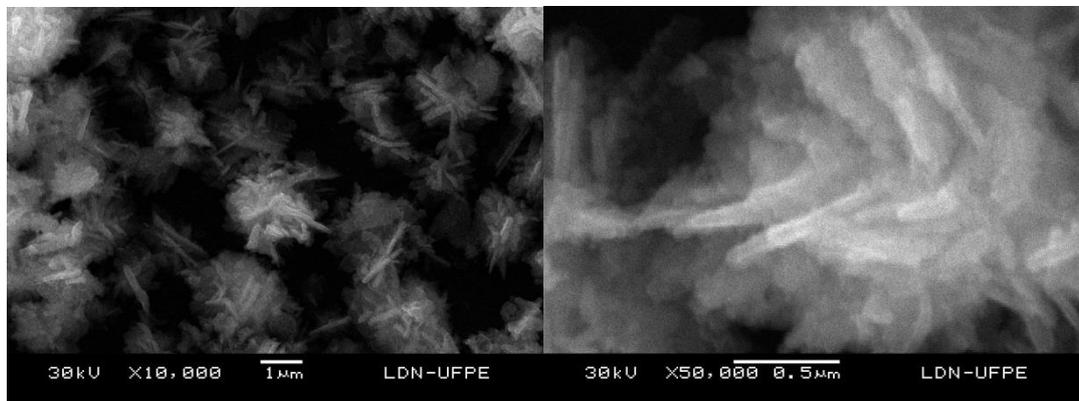
As nanopartículas de ZnO utilizadas no trabalho apresentam forma aproximada de uma microesfera não nanométrica com a sua superfície nanoestruturada com prevista aplicação tópica, o que dificulta a penetração na circulação e impede a deposição no sistema nervoso como relatado nos nanocristais [56][57]. Esse tipo específico de pó de ZnO é denominado de nanoZnO. Para facilitar o entendimento é possível imaginar o nanoZnO, utilizado nesse trabalho, como um maracujá e sua área superficial com a casca enrugada.

O nanoZnO utilizado mantém a boa capacidade anti-infecciosa, presente em nanoesferas devido sua superfície nanoestruturada, preservando a alta relação entre a área superficial e o volume das nanoestruturas. O que resulta em mais sítios de interação com agentes patógenos e mantendo os íons ZnO^{2+} localmente, contribuindo aos danos aos agentes infecciosos.

1.1.3 NanoZnO utilizado no trabalho

O óxido de zinco utilizado neste trabalho foi sintetizado no LDN - LABORATÓRIO DE DISPOSITIVOS E NANOESTRUTURAS, vinculado a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O método de síntese é baseado na via Sol-gel. No LDN desenvolveu-se tecnologia de filmes de ZnO piezoelétrico para sensores inteligentes e ZnO nanoestruturado (nanoZnO) (Figura 4) para aplicações em compósito.

Figura 4 - Micrografias eletrônicas do pó de nanoZnO sintetizado no LDN.



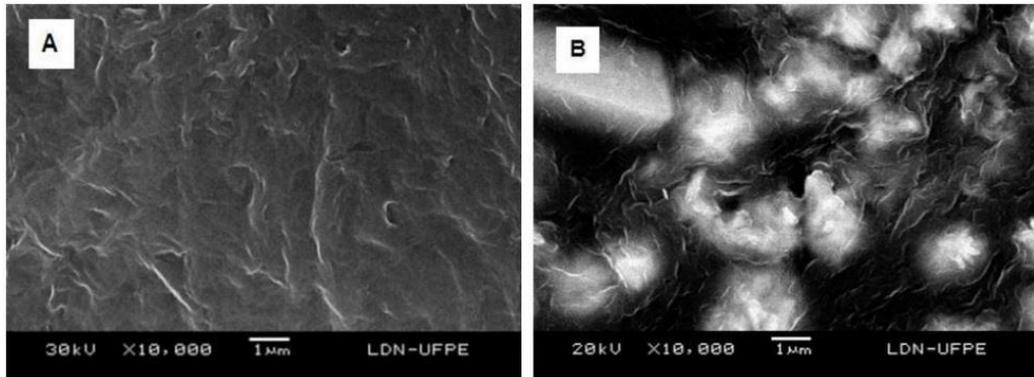
Fonte: Cedido gentilmente por SANTOS, ANDRELINA M.P. (2020).

Santos e Santos (2008), produziram filmes finos de óxido zinco a partir do acetato de zinco dihidratado, o filme passou por etapas de pré-aquecimento (105° C) e cozimentos (300° C) a baixas temperaturas resultando em filmes finos de óxido de zinco para aplicação em revestimentos de sensores inteligentes [63].

Lima Júnior et al. (2016) utilizou as nanopartículas para formulação de compósitos com filmes de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB 1,3 g), o nanoZnO foi capaz de dispersar-se homogeneamente (Figura 5) no filme além de aumentar a cristalinidade do polímero. O principal objetivo do estudo era formulação de embalagens de alimentos, sendo assim o efeito esperado do óxido de zinco era a inibição bacteriana e boa dispersão do nanoZnO nos filmes aumentando a eficácia da interação do óxido com os possíveis microrganismos oportunistas. Foram observados nas análises químicas a interação do PHB com o óxido que agiu como nucleante no polímero, o aumento da cristalinidade também foi observado com a elevação da concentração das

nanopartículas. O filme apresentou atividade antibacteriana na concentração de 5% m/m contra *E. coli* no teste em disco [64].

Figura 5 - Filmes de PHB com nanoZnO a 5% - A) Ampliação 1K e B) Ampliação 10K



Fonte: Lima Júnior et al. (2016).

O nanoZnO também foi solubilizado em diferentes biopolímeros, a quitosana e o alginato foram testados como revestimentos de frutas por Arroyo et al. (2019), o nanoZnO (1% v/v) foi disperso em géis com diferentes proporções dos polímeros. Os revestimentos mostraram-se eficazes em adiar o apodrecimento de goiabas o que indica o efeito antibacteriano do nanoZnO [65].

Vasconcelos (2016), experimentou o nanoZnO em filmes e blendas para embalagens, no seu trabalho as concentrações do nanoZnO foi de 0,1 e 0,2% m/v. Os resultados obtidos indicaram que o nanoZnO alterou pouco a coloração dos filmes, tornando-os mais opacos (diferença que variou de 0,2 % a 8 % em relação aos filmes sem nanoZnO) e a dispersão foi homogênea. O nanoZnO foi capaz de melhorar a resistência mecânica principalmente na concentração de 0,1%, os filmes também apresentaram eficácia contra *E. coli* e *S. aureus* nos testes em disco, o tamanho do halo mostrou-se dependente da concentração, indicando maior eficácia na concentração de 0,2% [66].

O extrato com as nanopartículas de ZnO, mostraram-se eficazes ao inibir os crescimentos de várias espécies de bactérias e fungos patogênicos que afetam gêneros alimentícios, Carnaval (2019) observou a atividade antimicrobiana com formação de halo para as espécies de *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* (Gram +) e *Xanthomonas phaseoli* (Gram -), com maior eficácia apresentada na Gram -, foram testados extratos puros e diluídos em concentração de 1 a 3%, os extratos diluídos também mostraram ação fungicida contra o *Botrytis cinerea* [67].

Carnaval também testou o nanoZnO (0,5%) em filmes compósitos com resíduos de farinha de mandioca (5,0%) e extrato de resíduo de siriguela (20%), os discos dos filmes não formaram halo o que significa que houve crescimentos nos microrganismos testados (*S. aureus* e *E. coli*), contudo houve inibição parcial próximo aos filmes, notadas por zonas mais claras no centro da placa (entre os discos dos filmes) e ao redor dos discos, indicando menor presença de colônias nessas zonas [67].

1.2 SUBSTITUTIVOS DE PELE

Os substitutivos de pele são ferramentas terapêuticas utilizadas nos tratamentos de feridas crônicas ou agudas. Apresentam como principal função a manutenção da umidade e oclusão do leito em cicatrização, enquanto mantem o ambiente livre de infecções [68]. A humanidade sempre buscou biomateriais que fossem compatíveis e eficazes na mitigação de danos a pele; há constante evolução no desenvolvimento de substitutivos sintéticos e naturais [23][68].

1.2.1 A pele

A pele e seus anexos (pelos, unhas e cabelos) formam o sistema tegumentar, recobre o corpo e regula diversas funções. É o maior órgão humano podendo alcançar de 15% a 17% do peso corporal total, sua espessura varia de 1,5 a 4 milímetros. A pele é composta por três camadas principais, são elas:

- **Epiderme:** É a camada superior da pele, origina-se do ectoderma e é composta por células epiteliais, a espessura da epiderme distingue a pele em fina e espessa (palma das mãos, planta dos pés e algumas articulações).
- **Derme:** Encontra-se abaixo da epiderme e é formada de tecido conjuntivo fibroso de origem mesodérmica.
- **Hipoderme:** Não faz parte do tecido tegumentar, mas compartilha funções com a pele, é composto de tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, faz a ligação com os demais tecidos e órgãos do corpo [1][3][8].

Dentre as funções (Tabela 1) desempenhadas pelo sistema, inclui-se, tanto a proteção dos órgãos internos, quanto a **proteção** do organismo contra patógenos e traumas externos; **Regulação da temperatura** mediada pela circulação sanguínea e glândulas sudoríparas que atuam na troca de calor com o ambiente externo; **Excreção** a pele também tem papel na excreção de metabólitos através do suor; executa papel importante na sintetização da **vitamina D** e conta com receptores sensoriais, responsáveis por levar estímulos externos (tato, pressão, etc.) ao sistema nervoso [1][2][3].

Tabela 1 - Propriedades da pele e estruturas responsáveis por elas.

Propriedades da pele	Responsáveis
Resistência	Principalmente o colágeno - A tensão de ruptura da pele varia de 2,5 a 16 MPa.
Flexibilidade	Principalmente a Elastina - O módulo de elasticidade da pele é aproximadamente 36 GPa.
Extensibilidade	Principalmente a Elastina - O alongamento máximo da pele é aproximadamente 70% do comprimento original.
Proteção mecânica	Hipoderme, Queratina - A espessura total da pele varia de 1,5 a 4 mm.
Termorregulação e Secreção	Sistema nervoso, vasos, poros, queratina - A pele apresenta permeabilidade ao vapor d'água em 4.63 WVP (g/h/1).
Proteção contra patógenos / Radiação UV	Células imunes, camada hidrolipídica (pH 5,4 - 5,9) / melanina.

Fonte: Junqueira e Carneiro (2017); Thiodeau e Patton (2015); Sanders et al (1972); Hansem et al. (2002).

1.2.2 Tipos de substitutivos de pele

Há vasto material acerca dos substitutivos de pele, por isso há várias formas de classificação e é uma ampla gama de produtos, contudo não há um substitutivo considerado ideal para todas as situações e o padrão ouro continua sendo o autoenxerto. Inicialmente podem ser indicados dois grandes grupos de substitutivos [23][68]:

- Temporários: Aqueles que auxiliam na resolução do processo de cicatrização podendo ser trocados por enxertos ou degradados ao final do processo cicatrizante. Nessa categoria encontram-se por exemplos xeno e alo-enxertos, além de curativos a base de material degradáveis e sintéticos [8][23][68][69].
- Permanentes: Restauram áreas da pele e não são removidos mesmo em caso de enxertia. Nessa categoria se encontram os enxertos autólogos e matrizes associadas a células do próprio indivíduo ou matrizes dérmicas [23][68].

Quanto a origem os substitutos cutâneos podem ser classificados em biológicos, sintéticos ou biossintéticos. Os biológicos englobam classes de materiais oriundos de transplante seja humano ou animal, em que se aproveita alguma parte (matriz dérmica, por exemplo) ou totalidade do tecido (como nos enxertos do próprio paciente). No mercado existem produtos de origem biológica, como as matrizes de cadáveres humanos ou bovinos [69][70].

Os materiais sintéticos são formulados artificialmente, geralmente a base de polímeros como o poliuretano, abrangem grande parte dos materiais presentes no mercado com custo mais acessível [69][70].

Os materiais biossintéticos compreendem os materiais que em seu processamento incluem materiais de origens biológicas e sintéticas ou materiais naturais (como os biopolímeros) que passam por algum processamento químico. Os mais recentes produtos da engenharia tecidual encontram-se nessa categoria que abrange vasta gama de produtos e protótipos em pesquisa [8][70].

1.2.3 Aplicação

As lesões decorrentes de traumas por queimaduras costumam ser extensas, além de levar a sequelas físicas (cicatrices, contraturas) e psicológicas, costumam causar uma resposta inflamatória intensa e degradação de áreas de pele, em muitas situações serão necessárias intervenções reparativas ou substituição do tecido lesado. A primeira escolha terapêutica nesses casos é o autotransplante, contudo, a técnica conta com diversas limitações, seja de ordem anatômica como a delimitação da área doadora e da área total do implante; estéticas como má cicatrização e infecciosas que são recorrentes em ambientes hospitalares interferindo no processo de cura [9][71][72].

Os substitutivos devem apresentar características que os tornem ideais (Tabela 2) para uso em humanos, segundo Sukali et al. entre essas características desejáveis estão, resistência a infecções, manutenção da osmolaridade entre os fluidos e a água, durabilidade, flexibilidade, baixo custo e fácil aplicação. Salienta-se que nenhum substituto apresenta todas características ideais e os valores desejáveis são bastante variados a depender do material e aplicação destinada [8][74].

Tabela 2 - Características desejáveis para substitutivos

Características	Resultados esperados
Aderência	Melhora cicatrização e a movimentação do paciente. Pelo teste <i>pell</i> a superfície ou a borda adesiva não pode ultrapassar a força de 300-400g. No ensaio de adesão celular observa-se se as células em cultura crescem na superfície. O teste de molhabilidade identifica a natureza da superfície, se hidrofóbica ou hidrofílica, em queimaduras com exsudato é essencial um ângulo de contato entre 40 - 90° (hidrofílica).
Transporte de Vapor de água	Evita desidratação da área e a retenção exacerbada de líquidos. Valores aceitáveis de permeabilidade podem variar de 2.02 a 25.0 WVP(g/h/1)
Resistência	Facilita a mobilidade do paciente e impede o rompimento. Os valores variam a depender do material e aplicação desejada, para polímeros leva-se em consideração os valores da tensão de ruptura da pele que estão entre 2,5 a 16 MPa.
Durabilidade	Evita trocas excessivas e diminui riscos de infecções. Os valores variam a depender da aplicação. Para feridas de 1 e 2 grau é desejável estabilidade de 1 - 3 semanas.
Degradabilidade	Evita trocas excessivas e diminui riscos de infecções. Os valores variam a depender da aplicação. Para feridas de 1 e 2 grau é desejável estabilidade de 1 - 3 semanas.
Baixa Antigenicidade	Evita a rejeição do tecido. Comprovado por ensaios de viabilidade celular, produtos que apresentem viabilidade abaixo de 70% são considerados citotóxicos.
Ação e barreira contra patógenos	Diminui o risco de infecções. Também é necessário que o material se apresente impermeável à patógenos.

Fonte: Santos e Gonçalves (2016); Spielmann et al. (2007); Nangia et al. (1991); Erasmus e Jonkman (1989).

Os substitutivos cutâneos abrangem uma gama de produtos heterogêneos, Kumar et al. (2008) em sua classificação tipifica os substitutivos quanto a aplicação em **Classe I** – Curativos temporários impermeáveis, esses não possuem componente

epidérmico e são essencialmente impermeáveis, podendo ser em uma ou duas camadas. São curativos e agem como barreiras mecânicas reduzem a perda de líquido por evaporação; **Classe II** - Substitutivos cutâneos duráveis de camada única podendo ser epidérmico e dérmico, podem apresentar proteínas da matriz e células autólogas; **classe III** - Substitutivos de pele compostos, nessa classe inclui-se os autoenxertos e os enxerto alógenos de pele e também os mais recentes desenvolvidos por engenharia tecidual, com presença de matriz e células, sendo indicado para grandes queimados [37][70].

1.2.4 Uso de compósitos como substitutivos de pele

A maioria dos materiais orgânicos e os substitutivos modernos são formados pela mistura de materiais, sendo eles blendas poliméricas, formulações com culturas e/ou matrizes dérmicas e **compósitos** [68][79].

Os substitutivos compósitos usualmente tentam combinar características de materiais sintéticos e naturais, sobretudo polímeros, objetivando simular propriedades da pele nos curativos. Busca-se a otimização das propriedades de biodegradação, mecânicas e dentre outras que facilitem a cicatrização da pele [68][79].

A quitosana o colágeno e o ácido hialurônico estão entre os biopolímeros mais utilizados em compósitos, entre os materiais sintéticos comumente associados estão o PGA, PVA e Carboxietil; geralmente esses polímeros são combinados com células autólogas [79].

Alguns compósitos mais simples também formam substitutivos eficazes, nesses associasse geralmente a matriz polimérica a um agente que apresente atividade contra microrganismos. Em queimados o uso da prata [12] é bastante explorado, outros metais e óxidos metálicos como os de titânio [56][80] e zinco [64][67] também apresentam potencial anti-infeccioso. As nanopartículas de metais e óxidos metálicos são uma importante ferramenta contra espécies resistentes aos antibióticos usuais [12][81].

O íon prata é hoje o principal composto metálico utilizado no tratamento para queimaduras, é usada de forma tópica ou em revestimentos oclusivos. O uso de polímeros com coloides ou nanopartículas de prata tem como objetivo principal a atividade antibacteriana e antifúngica conferida por ela, em várias espécies, incluindo as resistentes [12][81]. É utilizada em compósitos com celulose, colágeno, poliuretano,

polietileno, quitosana dentre outras formulações. A principal desvantagem da prata está nos potencial genotóxico e citotóxicos, também no retardamento na cicatrização em algumas feridas [82].

As nanopartículas de zinco apresentam-se promissoras, sabe-se que o zinco está presente em processos metabólicos do organismo, além de apresentar papel na proliferação celular e cicatrização, contudo, busca-se em compósitos para substitutivos a atividade antibacteriana e antifúngica apresentada por esse material [56][90][91]. Nanopartículas de zinco são eficientes no ataque as paredes e cápsulas externas bacterianas e fúngicas, além de invadir e interferir nos processos metabólicos dos patógenos. O uso associado a polímeros naturais e sintéticos pode ser eficaz a um amplo espectro fúngico e bacteriano [64][66][67].

O mercado oferece substitutivos com origens diversas, o mercado já conta com hidrogéis, filmes, *scaffolds*, esponjas e outras formulações com vantagens e desvantagens a depender do tipo de lesão e tratamento desejado. E na pesquisa outros materiais estão em desenvolvimento devido à grande abrangência e possibilidades na área.

Abaixo alguns exemplos (Tabela 3) de substitutivos compósitos no mercado e em pesquisa:

O *Integra*® é formulado a partir de duas camadas, uma grossa substitutiva dérmica baseada em colágeno bovino associada a condroitim 6-sulfato de tubarão, aliada a uma camada externa (substitutiva da epiderme) de silicone. O *Integra* é aplicado onde a pele danificada foi removida, protegendo contra infecções e mantendo a temperatura e fluidos corporais. O colágeno e o glicosaminoglicano (estruturas presente em humanos) são absorvidos na cicatrização, o silicone poderá ser retirado após a absorção. É contraindicado em pessoas alérgicas a substâncias do produto ou com infecções previa [83].

O *Biobrane*® é um biocompósito formulado a partir de uma matriz de silicone ultrafina unida a uma trama de náilon, associado a esse tecido de náilon há ainda peptídeos de colágeno de porco que auxiliam na cicatrização e remodelação da pele. É utilizado principalmente em pacientes pediátricos, aplicado principalmente em áreas adjacentes a enxertos de pele e removido de 7 a 14 dias após [84][85].

O *AquacelAg*® é um compósito mais simples de camada única, o curativo é composto de fibras de carbomexetil de sódio não tecidas e impregnadas com prata iônica. O curativo é indicado para retenção da umidade enquanto protege o leito da

ferida de infecções. O produto forma um gel ao entrar em contato com os fluidos da ferida e a liberação da prata é controlada por até duas semanas, dando um amplo uso ao curativo para feridas crônicas e agudas [86].

Abbasipour et al. (2014) em seu trabalho utilizou como matriz a gaze comum de algodão bastante utilizada na prática médica e a reforçou, objetivando obter um efeito antibacteriano e aumentar a eficácia da manutenção da umidade e absorção do exsudato. Para isso um compósito foi formulado mergulhando a gaze comum em uma solução coloidal de quitosana com nanopartículas de prata e zinco. Como resultado obteve-se um curativo com maior absorção e eficácia comprovada contra *E. coli* e *S. Aureus*.

Tabela 3 - Compósitos utilizados como substitutivos de pele.

Compósito	Característica
Integra® ¹	Membrana camada dupla, a dérmica de colágeno bovino + condroitim 6-sulfato de tubarão, e a externa de silicone. Oclui a ferida enquanto os componentes dérmicos são absorvidos [83].
Biobrane® ¹	Membrana camada dupla, silicone unida a uma trama de náilon imbuído de peptídeos de colágenos (suíno). Oclui e auxilia na cicatrização e remodelação da pele [84][85].
AquacelAg® ¹	Curativo de camada única de carbomexitil de sódio não tecidas e impregnadas com prata iônica. Retém a umidade e libera controladamente a prata contra infecções [86].
Gaze + Quitosana NPs de ZnO/Ag ²	Gaze comum revestida de quitosana e NPs ZnO/Ag ² . Retém a umidade e protege contra infecção bacteriana [87].
Quitosana + Nps de ZnO/Ag ²	Esponja de quitosana reforçada com nanopartículas de prata e zinco. Oclui, auxilia na coagulação, cicatrização, reepitelização e protege contra infecções [89].
Quitosana + Nps de ZnO/Ag ²	Filme de camada única de quitosana mais nanopartículas de ZnO. Oclui e protege contra infecções [88].

Fonte: Integra Skin (2018); Biobrane (2018); Farroah e Frew (2013); Barnea et al. (2010); Abbasipour et al. (2014); Lu et al. (2017); Qiu et al. (2018).

*Primeira coluna: compósitos utilizados como substitutivos de pele no mercado e em pesquisa.

**Segunda coluna: características e propriedades desses compósitos.

***NPs: nanopartículas; ¹ produtos disponíveis comercialmente, ² produtos em pesquisa.

Zhong et al. (2017) utilizaram as nanopartículas de prata e zinco, para reforçar uma matriz esponjosa porosa baseada em quitosana, o compósito foi eficaz na coagulação sanguínea nos testes com ratos e apresentou efeito contra antibacteriano, o curativo promoveu um ambiente seguro e reforçou a cicatrização e repitelização da área afetada. Qiu et al. (2018) também preparou uma matriz de quitosana aditivada

com nanopartículas de ZnO, os filmes resultantes mostraram-se flexíveis, com boa dispersão das nanopartículas e boa interação entre os componentes demonstrando potencial aplicação como revestimentos e curativos.

Como já mencionado anteriormente existe uma ampla gama de produtos no mercado e em pesquisa, o que abrange diferentes formulações e aplicações. Como observado na Tabela 3 NPs comerciais de ZnO (20nm) em associação a NPs comerciais de prata (120nm) foram impregnadas em gaze comum com isso obteve-se um novo compósito com qualidades aprimoradas [87].

Ainda na Tabela 3 é importante ressaltar a versatilidade da quitosana, nos exemplos é aplicada em formulações distintas como esponja [89] e filme [88], os métodos para aditivação também foram diferentes, para a esponja de quitosana optou-se pela preparação inicial do nanocompósito Ag/ZnO por deposição e precipitação, para só então a esponja de quitosana ser mergulhada em solução com o compósito Ag/ZnO, resultando na esponja aditivada. Para os filmes a obtenção das NPs foi *in situ*, acetato de zinco foi adicionado à solução de quitosana, o Zn^{+2} proveniente do acetato foi fixado na matriz e convertido em NPs de ZnO por uma reação posterior com NaOH. Como resultado temos o exemplo de uma matriz esponjosa altamente porosa com nanopartículas comerciais e outra em formato de filme com nano e micropartículas obtidas *in situ* [89][88].

É interessante destacar as diferenças observadas entre os compósitos formulados por quitosana e nanopartículas por Lu et al. (2017) [89] e Qiu et al. (2018) [88] e o formulado neste trabalho com as nanoZnO.

Em ambos na esponja com Lu et al. (2017) e e filmes com Qiu et al. (2018) trabalharam com nanopartículas, o que pode acarretar alguns efeitos negativos devido ao tamanho e distribuição em órgãos humanos, como descrito anteriormente na Seção 1.1.2. Nos filmes desenvolvidos por Qiu et al. (2017) a reação *in situ* com o NaOH para conversão do ZnO^{+2} resultou em nanopartículas e microesferas, o que pode resultar em má distribuição e dispersão nos filmes, podendo resultar em áreas com propriedades distintas em um mesmo filme.

A metodologia de síntese de nanoZnO desenvolvida por Santos e Santos (2008) baseada na técnica sol-gel além do baixo custo permite um controle no tamanho dos grãos, o que resulta em melhor homogeneidade do nanoZnO disperso [63][64][66], como também a nanoestruturação é apenas na área superficial

resultando em microesferas nanoestruturadas, sendo assim evita-se os efeitos negativos da nanoescala descrito na Seção 1.1.2.

A matriz de quitosana apresenta características distintas a depender de sua formulação, Lu et al. (2017) formulou em formato de esponja porosa o que pode conferir alto grau de intumescimento e transporte de vapor d'água, as características mecânicas também serão distintas de um filme, e a propriedade de barreira e a permeabilidade será alterada, foi possível observar ainda que a quantidade de poros diminuiu ao adicionar as nanopartículas, pois muda-se a conformação da matriz. A formulação contou ainda com nanopartículas de prata buscando provavelmente maior eficácia contra microrganismos e uma possível ação sinérgica com o as NPs de ZnO, contudo as alterações mecânicas podem ser mais elevadas e deve-se cuidar com a dispersão e interação entre essas nanopartículas [12][89].

No geral as esponjas de quitosana apresentam mais intumescimento e transporte de vapores ao ser comparada aos filmes, podendo ser bastante explorada em feridas hiper úmidas e exsudadas [12][13][21].

Já a formulação de Qiu et al. (2018) tem um produto em formato de filme, como no nosso trabalho, embora o processo seja bastante diferente Qiu et al. (2018) sintetizou as nanopartículas de ZnO em um processo in situ com NaOH, resultando em partículas com tamanhos nano e micrométricos [88], o NaOH também é uma base forte o que pode afetar o pH. O nanoZnO utilizado no trabalho como será detalhadamente descrito no capítulo 3 é solubilizado já pronto na solução de quitosana nos 15 minutos finais.

1.3 QUEIMADURAS

A queimadura é um trauma de origem térmica, química ou elétrica, a resposta do organismo dependera da extensão e profundidade da lesão. Podendo apresentar de uma simples vermelhidão local até uma grave resposta sistêmica e ao óbito. As sequelas deixadas podem ser incapacitantes e desfigurativas, afetando tanto a funcionalidade como o psicológico do paciente. O tratamento costuma ser demorado, custoso e doloroso para o paciente, e estressante para os profissionais e acompanhantes [2][4][31].

A resposta inicia-se imediatamente após o trauma, os sinais da inflamação (rubor, tumor, calor e dor) podem ser observados. O processo é guiado por

retroalimentação, ou seja, sinais, produtos e etapas ativadas iniciam as posteriores. Dois principais eventos caracterizam a queimadura, o edema resultante da elevação da pressão hidrostática e a inflamação que é norteadada por mediadores locais como os radicais livres, células necróticas ou citocinas [9][72].

Constituem-se um problema mundial de saúde pública, segundo a OMS (2008) estima, de 200 a 300.000 mortes ocorram anualmente resultantes das complicações por queimaduras. Os países de baixa e média renda são os que mais afetados, juntos são respondem por 95% dos óbitos. As consequências vão além dos óbitos, relata-se também deformações, deficiências, perdas financeiras, exclusão social e dependência do estado [6][92].

As estatísticas brasileiras seguem as internacionais sendo os maiores atingidos pessoas de baixa renda e crianças. As principais causas são: escaldações, choque elétrico e contato direto com o fogo. No Brasil a maioria dos acidentes ocorrem na residência das vítimas, o SUS registrou entre 2013 a 2014 mais de 15.000 internamentos decorrentes de queimados na faixa etárias de 0 a 10 anos. Cerca de 1.000.000 de pessoas sofrem queimaduras anualmente no país, desses aproximadamente 100.000 buscam atendimento hospitalar e 2.500 irão a óbito. O valor gasto pelo SUS de 2017 a 2018 no tratamento de grande, médios e pequenos queimados foi de aproximadamente R\$ 49,334 milhões [6][22][93][94].

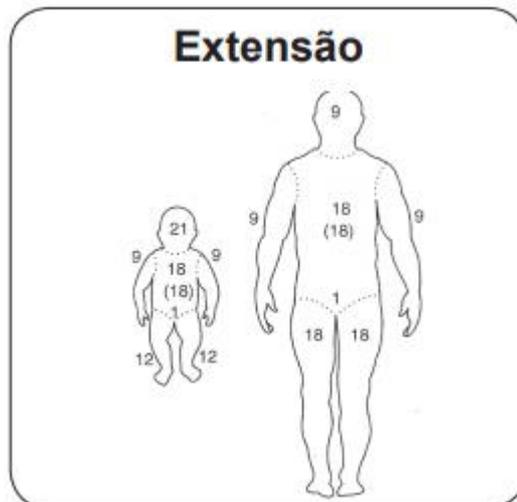
Segundo os dados, indexados no DATASUS, referente a queimaduras e corrosões (CID-10), de janeiro de 2008 a abril de 2018 houveram 258.638 internações, a região sudeste foi a mais atingida com 86.837, os homens foram maioria com 162.699 internados e as mulheres representaram 95.939 de casos, a média de permanência foram 10 dias [22][92].

1.3.1 Classificação das queimaduras

As queimaduras afetam o metabolismo e a fisiologia, alterando a temperatura, controle osmótico e lubrificação da pele, a gravidade dependerá da causa, extensão e profundidade, são comumente classificadas pela profundidade (1, 2 e 3 grau) e extensão [72].

Para o cálculo da **extensão** do agravante da lesão, utiliza-se a regra de Wallace e Pulaski da superfície corporal queimada (SCQ) (Figura 6), conhecida como regra dos nove. No método áreas do corpo somam percentuais, que são distintos para crianças e adultos. Em áreas de menor extensão ou locais isolados do corpo, usa-se a palma da mão (inclusive os dedos) do paciente, a palma equivale a 1% da SCQ. As queimaduras então são divididas em leves (atinge até 10% da SCQ), moderadas (10 a 20% da SCQ) ou graves (mais de 20% da SCQ) [9][72].

Figura 6 - Regra de Wallace e Pulaski(Extensão da lesão)



Gomes et al. (2001).

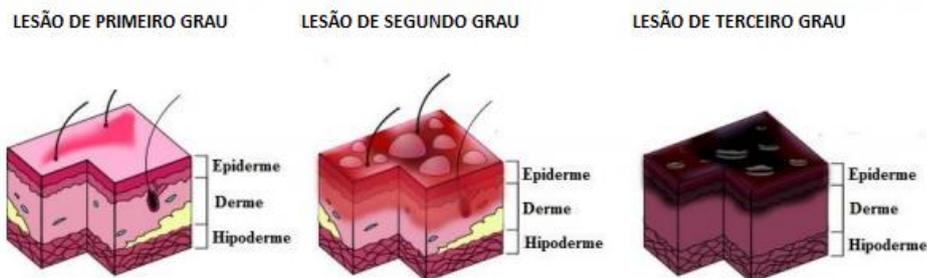
Profundidade, são divididas em lesões de 1, 2 e 3 grau (Figura 7).

- I grau: Atinge a camada externa da pele, epiderme, é a mais simples de ser tratada, não causa mudanças hemodinâmicas ou grandes alterações clínicas significativas, apenas pequena resposta inflamatória local, a cicatrização geralmente ocorre em uma semana [4][9][72].
- II grau: Atinge a epiderme e derme podendo dividir-se em superficial e profunda, não destroem todos elementos da pele, permitindo reepitelização

parcial ou total. A cicatrização pode ser espontânea como a de primeiro grau ou mais demorada a depender do desenrolar do processo inflamatório, varia de 7 a 21 dias [4][9][72].

- III grau: Acomete a totalidade do sistema tegumentar e pode alcançar outros tecidos mais profundos, como músculos e ossos é a mais grave e difícil de ser tratada; Essa classe de lesão não reepiteliza e necessita de enxertia [72].

Figura 7 - Profundidade das lesões



Fonte: Onofre (2014).

1.3.2 Tratamento

O tratamento irá depender da profundidade, extensão e tecido lesado. É necessário considerar a fisiopatologia associada a cada tipo de lesão. O tratamento terá como alvos a restauração tecidual; a manutenção da funcionalidade e reparação estética da área afetada [4][8].

O tratamento de feridos conta com métodos clínicos e cirúrgicos, os curativos estão entre os métodos mais utilizados para reparação tecidual de áreas lesionadas. Samaniotto et al. (2012), definem curativos ou coberturas como meios terapêuticos consistindo na limpeza e aplicação de material sobre uma lesão a fim de, protegê-la e dar suporte para as melhores condições de resolução do processo patológico, os curativos podem então ser o tratamento definitivo ou etapa auxiliar até a cirurgia [8].

A escolha adequada do material irá requerer avaliação pela equipe médica e conhecimentos dos processos fisiopatológicos e clínicos, a grande diversidade de curativos terapêuticos pode confundir quanto ao melhor material a ser utilizado. As queimaduras de terceiro grau e algumas de segundo grau profundas irão precisar de enxertia, padrão ouro do tratamento, contudo geralmente esses pacientes requerem bastante enxerto devido a extensão da área lesionada. Os tipos de enxertos são,

autoenxerto, quando o material provem do próprio doador; Homoenxerto: transplante entre indivíduos distintos, porém da mesma espécie; Xenoenxerto: quando o doador e o receptor são de espécies diferentes [8][9][95][96].

1.3.3 Microrganismos mais comuns em queimados

Apesar dos diversos avanços no tratamento de queimados, as complicações resultantes de infecções continuam sendo um dos maiores obstáculos no tratamento e cura, aproximadamente 75% dos óbitos em pacientes queimados, são decorrentes de infecções (principalmente associadas à pneumonia e sepse) [24][97][98].

Segundo a OMS, o controle adequado de infecções nesses pacientes contribui para a redução da morbidade e mortalidade, além de garantir um melhor restabelecimento da homeostase e diminuição de sequelas associadas às lesões. O pior prognóstico em países de média e baixa renda quando comparada a países ricos está associada a mecanismos de protocolos de controle e assepsia hospitalar, que tem garantindo a queda das taxas de mortalidade nos países ricos [72][99].

A pele íntegra atua como barreira contra patógenos externos, a quebra dessa barreira associada a um ambiente propício e nutritivo (presença de proteínas e tecidos desvitalizados), corrobora para o desenvolvimento e proliferação de microrganismos, em casos mais graves o paciente pode desenvolver sepse [24][100].

A sepse ocorre quando há a quebra entre o equilíbrio entre hospedeiro e microrganismos, a queimadura induz a introdução de patógenos via sistemas linfáticos ou circulatórios. Outros fatores podem ampliar o risco de sepse, a imunossupressão, a migração bacteriana de outros sítios corpóreos, a internação prolongada e a resistência bacteriana [24][97][98].

Os protocolos médicos prezam a rapidez na limpeza, retirada da pele morta e controle bacteriano com produtos tópicos, esses procedimentos não são por acaso. A colonização bacteriana nas feridas costuma ocorrer nas primeiras 48 horas por bactérias Gram-positivas, com o decorrer dos dias (5 a 7 dias) outros microrganismos colonizam a área incluindo as Gram-negativas, leveduras, espécies das floras do indivíduo (gastrointestinal e trato respiratório) e bactérias presentes no ambiente hospitalar [98].

As Gram-negativas tornam-se predominantes após a primeira semana, elas são bastante comuns em pacientes com infecções graves e estão associadas ao

aumento em 50% nas taxas de mortalidades em pacientes com bacteremia. Os tratamentos com antibióticos podem resultar em: aumento das bactérias resistentes e colonização fúngica [24][101].

O uso da penicilina mudou o espectro de bactérias mais comuns em grandes queimados, o *Streptococcus pyogenes* foi a causa mais frequentemente reconhecida de sepse por queimaduras de infecções cutâneas locais e sistêmicas no início do século passado, o advento da penicilina tornou o *Staphylococcus aureus* (Gram positivo mais comum e geralmente a primeira espécie colonizadora das áreas afetadas) e a *Pseudomonas aeruginosa* os espécimes mais isolados em queimaduras [24].

O *S. aureus* é a espécie que está mais associada à morbidade e mortalidade em pacientes com queimaduras de grande extensão, essas bactérias estão presentes na flora transitória de até um terço dos pacientes, sendo eles próprios os reservatórios da infecção. O *S. aureus* é capaz de causar bolhas de impetigo, mesmo após cicatrização ou enxertia de pacientes com queimaduras extensas, essas bolhas apresentam-se na forma de pequenos abscessos superficiais e multifocais, requerendo o desbridamento cirúrgico. As técnicas atuais que diminuíram a mortalidade são baseadas no aumento do intervalo entre lesão e o início da infecção [24][100].

As Gram-negativas são bastante isoladas entre pacientes de queimados em UTI, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sp.* são as mais prevalentes [102]. Hoadle et al. (2006) em um estudo que avaliava a prática de controle de infecções em unidades de queimados nos Estados Unidos, mostrou que a *Pseudomonas aeruginosa* era a mais prevalente em até 44% das unidades, seguido dos *S. aureus* resistentes a metilina - *MSRA* (13%), *Acinetobacter* (9%) e *Enterococcus*. *Pseudomonas* apresentam infecções bem características, inicialmente localizam-se superficialmente, com secreções purulentas e um característico odor doce, o maior risco é espalhar-se para o tecido profundo e causar a sepse.

O *Acinetobacter baumani*, responsável por 11 a 13% dos casos tem adquirido resistência nos últimos anos, infecções com essa espécie estão bastante associadas com bacteremia (46% dos pacientes desenvolvem a condição e cerca de 38% vão a óbito) [24][103].

Chaves silva et al. (2009) realizaram um estudo epidemiológico das infecções em uma unidade de tratamento de queimados em Fortaleza, avaliaram 419 vítimas de

queimaduras, os microrganismos mais presentes foram o *S. aureus* presente em 34,69%, a *Pseudomonas sp.* em 33,33%, *Enterobacter sp.* em 14,29%, seguidas da *E. coli* e da *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente, 4,08% e 3,40% [98][100][104].

A diminuição das bactérias pode fazer aflorar a colonização fúngica, casos de infecções fúngicas em pós-queimados ocorrem geralmente duas semanas após o trauma. A *Candida albicans* é a espécie mais relatada nesses pacientes, entre as não *albicans* costuma-se identificar a *C. Tropicalis* e *C. parapsilosis* em 4,2% dos pacientes, *Aspergillus* são também bastante associadas a pacientes queimados [24][101].

1.4 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um compósito no qual a matriz é à base do biopolímero quitosana, aditivado com o óxido de zinco nanoestruturado, para aplicação como substitutivo temporário de pele em queimados.

Além do objetivo principal, abaixo estão elencados os **objetivos específicos** do trabalho:

- a) avaliar como diferentes concentrações de nanoZnO afetam as propriedades do compósito;
- b) caracterização dos compósitos quanto as propriedades químicas, sensoriais e físicas;
- c) aplicação da técnica da análise de variância (ANOVA) para avaliação das propriedades e comparação de médias pelo teste de Tukey;
- d) Elaboração de protocolo experimental.

1.5 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação descreve o desenvolvimento de um compósito formulado a partir do biopolímero (quitosana) e nanopartículas de óxido de zinco (nanoZnO), o compósito deve apresentar características que o habilitem como substitutivo de pele para tratamento de queimados, diminuindo a quantidade de trocas necessárias na lesão, boa capacidade de absorção do exsudato do leito da ferida e degradação concomitante ao tempo de cicatrização de 1 a 3 semanas, o mesmo de feridas de 1° e 2° graus.

Capítulo 1 - Introdução

Esse capítulo tem como objetivo apresentar a fundamentação bibliográfica dos temas envolvidos no trabalho.

Capítulo 2 - Fatores de influência

Esse capítulo apresenta os fatores de influência selecionados na formulação dos filmes poliméricos de quitosana, da síntese do nanoZnO e na formulação do compósito.

Capítulo 3 - Material e métodos

O material e métodos para o desenvolvimento do compósito são descritos neste capítulo e por fim é apresentado o tratamento estatístico utilizado.

Capítulo 4 - Resultados e análises

Nesse capítulo se descreve os resultados obtidos das análises e análise dos resultados frente a outros trabalhos.

Capítulo 5 - Conclusões e trabalhos futuros

O capítulo conclui o que foi desenvolvido até aqui e os próximos passos para seguimento da pesquisa.

2 FATORES DE INFLUÊNCIA

Neste capítulo são abordados os fatores que interferem na preparação do compósito, formulado de uma matriz de quitosana reforçada com óxido de zinco nanoestruturado, e os fatores selecionados para a otimização do produto final. A identificação de como os parâmetros metodológicos adotados atua na formulação do compósito é importante para identificar, corrigir e otimizar os processos do trabalho e como eles refletem nos resultados apresentados nas etapas experimentais.

2.1 MÉTODOS DE SÍNTESE DOS FILMES DE QUITOSANA

Diversas técnicas foram desenvolvidas ao longo do tempo para a obtenção de filmes, blendas e compósitos. Dentre os métodos estudados para obtenção de filmes de quitosana, atualmente usa-se com mais frequência os seguintes: casting, revestimento (*dipping*, *spray coating*, *spread-coating*) e extrusão [105][106].

- **Revestimento:** Os revestimentos são aplicados a uma superfície para proteção e inibição do crescimento de microrganismos. O conjunto de técnicas de revestimento são utilizados principalmente na indústria alimentícia na proteção de alimentos perecíveis como vegetais e carnes. No método *dipping* o produto é diretamente imerso na solução filmogênica, o excesso é retirado e o produto é armazenado. Na técnica de *spray coating* o revestimento é aplicado com um pulverizador e para o *spread-coating* a aplicação é feita por um pincel ou espátula. Após a aplicação do revestimento o excesso é retirado e o produto seca naturalmente formando uma película envolta [105][106].
- **Extrusão:** É um processo mecânico, por meio de fusão, que força uma mistura a adquirir o formato desejado. O processo passa por várias etapas, inicialmente uma mistura para o filme é preparada, geralmente a quitosana para extrusão é utilizada com outro polímero, o produto é colocado na extrusora que por meio de uma rosca levará o produto a um cilindro aquecido, o cilindro aquecerá o produto ao ponto de fusão, o material resultante plastificado é forçado contra duas telas de aço retendo qualquer impureza e por último o produto sai pela matriz que dará a forma ao filme [105][106].
- ***Solution casting:*** É uma técnica simples onde o polímero a ser utilizado é dissolvido totalmente no seu solvente o gel filmogênico resultante é então

derramado em uma superfície como por exemplo a placa de *petri*, o filme é obtido por secagem e evaporação do solvente [105][106].

A técnica utilizada no trabalho é a de casting, é uma técnica simples que produz filmes com boas propriedades. Para o objetivo do trabalho onde é preciso manter homogeneidade da espessura, da massa e prover uma barreira durável e avaliação das características, filmes por *casting* se saem bem, também é uma técnica mais econômica e simples do que extrusão. No mais, filmes com bons resultados e manuseáveis de quitosana e outros polímeros já foram desenvolvidos pelo grupo utilizando a técnica de *casting*.

2.1.1 Fatores de influência da preparação dos filmes de quitosana

Os parâmetros de interesse na formulação dos filmes de quitosana são, concentrações do polímero, pH, grau de desacetilação da quitina e temperatura de secagem (Figura 8).

2.1.1.1 Concentração

A concentração atua em diversas propriedades mecânicas do polímero, a viscosidade da quitosana é alterada quando esse parâmetro é manipulado, a viscosidade, apresenta papel importante na degradabilidade do biopolímero [107]. A concentração de quitosana também é capaz de aumentar a capacidade de resistência do filme elevando à resistência a ruptura. Em *scaffolds* [108] e hidrogéis [109], a concentração pode ser alterada para aumentar a resistência à compressão do material, compósitos podem utilizar a quitosana para aumentar a durabilidade e degradabilidade [108][109][110].

É notório também a interação entre quitosana e a água o que poderá ser afetado pela concentração. Assis e Silva (2003) ao avaliaram a capacidade de absorção de água em filmes de quitosana, notaram um aumento exponencial da absorção de água ao aumentar a concentração. Correlo et al. (2007) avaliaram a absorção de água e degradação de diversas blendas contendo quitosana e outros polímeros em diferentes concentrações, a absorção de água apresentava aumento proporcional ao teor de quitosana na blenda.

A distribuição da massa do filme tem de ser uniforme, sem acúmulo de massa em pontos distintos, o que poderia alterar a manuseabilidade e a resistência do material, isso poderá ser avaliado através das médias das espessuras em pontos distintos do filme. Um filme homogêneo e bem distribuído não apresentará discrepâncias nesses valores em uma mesma amostra. A quantidade de quitosana no gel também irá alterar a morfologia final do filme, o aumento da concentração no preparo da solução, tende a formar áreas de nucleação do polímero. O aumento do polímero no gel também afetará o pH final aumentando a enovelção da trama e conseqüentemente formando aglomerados e dificultando a dissolução final [112].

Por sua vez concentrações baixas poderá resultarão em filmes muitos finos e sem resistência, com alta degradabilidade e baixa durabilidade. Com pouca distribuição de massa o filme tende a ter uma trama mais espaça e ser mais suscetível a solubilização e disrupção [13][108].

Sendo assim alguns fatores devem ser observados na formulação dos compósitos, área final do filme, ou seja, diâmetro da placa onde será distribuído, tempo de dissolução, pH e solvente utilizados e presença ou não de bolhas e impurezas que possam interferir na continuidade do filme.

2.1.1.2 pH

O pH final da solução filmogênica vai estar diretamente relacionada a concentração da quitosana, e ao pH do solvente utilizado, sabe-se que a quitosana é solúvel em ácido devido a protonação dos seus grupamentos aminos em pH abaixo de 6 [114].

Os grupamentos aminos formarão interações intramoleculares entre a quitosana, as moléculas de água e o plastificante na formação dos filmes. O pH do solvente irá interferir na taxa de dissolução da quitosana resultando em diferenças nas características funcionais do filme, a diminuição do pH altera o equilíbrio entre a protonação do NH₂ e a desprotonação do OH aumentando significativamente a interação com as moléculas de água [115].

O ácido acético costuma apresentar filmes com alta resistência a tração comparada a outros ácidos orgânicos, também tende a resultar em baixa permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade. Quanto menor o pH maior será a

dissolução e grupamentos aminos presentes, a manutenção do pH entre 4,5 e 5,5 resultará em filmes com boa resistência e baixa degradação [13][114].

2.1.1.3 Grau de desacetilação da quitosana

A escolha do grau de desacetilação (GD) da quitosana é importante para obter características físicas e químicas desejáveis [34][116]. Segundo Santos et al. (2011), o grau de desacetilação varia entre 40 e 95%, a partir de 70% de GD a quitosana torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas resultado da liberação dos grupamentos aminos [117].

As propriedades mecânicas de filmes variam a depender do GD da quitosana, Moura et al. (2011) notaram que o grau de desacetelização da quitosana utilizada em filmes, interferia na resistência a tração e permeabilidade ao vapor de água, os filmes com maior GD apresentaram valores maiores dos atributos citados [118].

O grau de desacetilação causa alterações na atividade antimicrobiana da quitosana, quanto maior o GD melhor será a atividade antimicrobiana, em fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum* e *Candida albicans*); bactérias Gram-positivas (*S. áureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativas (*E. coli*, *Samonella tiphymurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecailis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*), há aumento da atividade ao diminuir o grau de desacetilação, consequência da elevação de grupamento aminos livres [119].

2.1.1.4 Temperatura de secagem

A temperatura de secagem dos filmes influencia profundamente suas características morfofuncionais, propriedades como umidade, solubilidade e resistência são diretamente afetadas, sendo, portanto, importante a observância dessa etapa para permitir uma melhor reprodutibilidade no processo de formulação dos filmes [120][121].

As mudanças observadas em diferentes tempos de secagem devem-se as características apresentadas pelo polímero, a evaporação acelerada do solvente em temperaturas elevadas, resultará em filmes mais desordenados. As interações

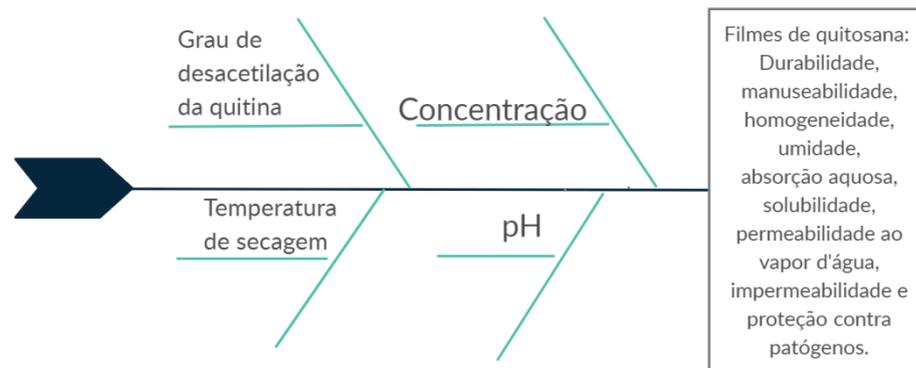
intramoleculares da quitosana com a água e a formação de agregados e géis são intensificadas em menores temperaturas, a evaporação lenta resulta numa reorganização das ligações dos agregados e maior homogeneidade na matriz polimérica. A distribuição dos espaços vazios onde antes estavam os solventes é melhor distribuída em menores temperaturas [120].

A temperatura de secagem está inversamente proporcional ao teor de umidade presente nos filmes, sendo assim, filmes mais úmidos serão obtidos em baixas temperaturas. Homezjara et al. (2018) observou uma variação em de 10,8 a 31,3% ao manipular a temperatura de secagem (2, 25 e 40° C), atribuiu-se essa alteração a menor capacidade de formar géis ao evaporar-se rapidamente o solvente em temperaturas altas [120][121].

A temperatura também interfere na ligação com plastificante, é comum o uso de glicerol ou outros agentes plastificantes na formulação de filmes e membranas, esses por sua vez apresentam afinidade com a água. A ligação do plastificante com a matriz polimérica irá influir em várias propriedades como solubilidade, intumescimento e umidade [40][120][121].

Sabe-se que a presença de umidade e capacidade de ligação com a água altera profundamente a duração e degradabilidade da membrana, esses fatores associados a presença de plastificante e a concentração de polímero podem incrementar ainda mais essas mudanças. Sendo assim é importante observar como a temperatura de secagem irá afetar o tempo de evaporação e a remodelação do biopolímero e consequentemente o produto final [40][122].

Figura 8 - Diagrama causa e efeito dos filmes de quitosana



Fonte: autor (2020).

2.2 MÉTODOS DE SÍNTESE DO ÓXIDO DE ZINCO NANOESTRUTURADO

Via co-precipitação: Reação de precipitação o qual ocorre em sistemas complexos com múltiplas espécies precipitando simultaneamente. Inicialmente os primeiros precipitados formam numerosos cristalitos (nucleação) que começam a agregar-se formando partículas maiores, nesse método podem ocorrer processos secundários interferindo no tamanho, morfologia e propriedades das moléculas. A precipitação pode ocorrer por reações de redução, fotorredução, oxidação ou hidrólise [47].

Via deposição física e química: Métodos a base de vapor, o material é colocado no centro de um tubo e inserido em um forno elétrico, o aquecimento é a uma taxa específica, um gás inerte (argônio ou nitrogênio) serve como gás de arraste. Pressão e temperatura são mantidas por um período de tempo até a vaporização do material, o vapor é carregado a regiões com temperaturas mais baixas, onde se torna supersaturado e condensa-se, ao atingir o substrato ocorrem nucleação e crescimento das nanoestruturas. No método de deposição química o gás inerte é substituído por gases reativos. Catalisadores metálicos podem ser utilizados em ambos os métodos para orientar e alinhar o crescimento [47].

Via Hidrotérmica: são reações em fase aquosa (água/vapor) a pressão e temperaturas mais elevadas como forma de acelerar as reações entre sólidos. Este tipo de síntese, requer uma camada semente de ZnO para inicializar o crescimento uniforme de nanoestruturas orientadas [47].

Síntese via sol-gel: Nesse método, ocorre a transição de sistemas de sol para gel, formando então agregados esféricos. O sol é constituído de suspensão de

partículas coloidais (entre 1 e 1000 nm) em um líquido o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais ou poliméricas que imobilizam a fase líquida em seus interstícios, os géis são depositados formando uma espessura controlada, seguida de aquecimento que resulta na formação de uma camada do revestimento desejado [47].

O método de síntese do nanoZnO distribuído pelo LDN é baseado na via sol-gel, tal qual a descrita por Santos e Santos (2008), como indicado pelos autores é uma técnica com baixo custo além de permitir controle no tamanho dos grãos [63].

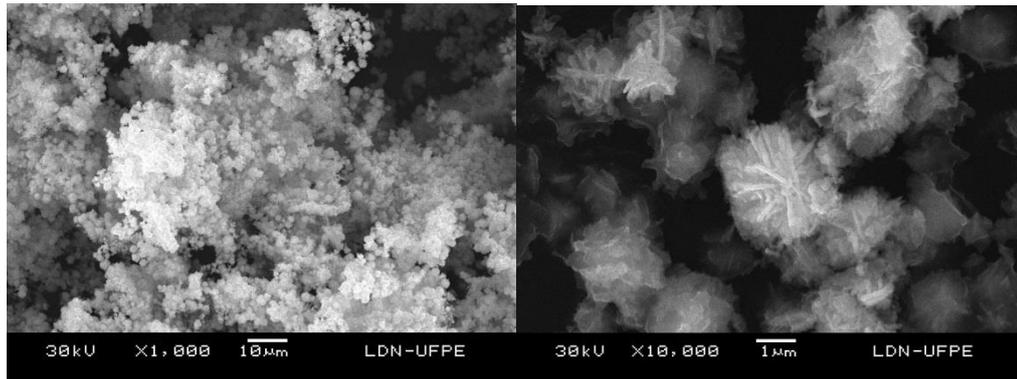
Como indicado na Subseção 1.1.3 do capítulo 1 o ZnO nanoestruturado sintetizado pelo LDN (Figuras 9 e 10) já foi amplamente utilizado em trabalhos prévios na formulação de compósitos com polímeros, com eficácia antibacteriana e antifúngica comprovada sem inviabilizar as propriedades de manuseabilidade dos filmes [64][67].

Figura 9 - Pó de nanoZnO sintetizado no LDN



Fonte: o autor (2020).

Figura 10 - Micrografia eletrônica do pó de nanoZnO sintetizado no LDN



Fonte: Cedido gentilmente por SANTOS, ANDRELINA M.P. (2020).

2.2.1 Fatores de influência na preparação do nanoZnO

Diversos fatores podem interferir no tamanho e homogeneidade na preparação do nanoZnO (Figura 11). O tamanho da superfície no nosso óxido de zinco é a principal característica a ser observada, que será nanoestruturada. Visto que há elevação da área superficial em nanomateriais, maior área superficial significa mais sítios para interação no combate aos patógenos.

2.2.1.1 Temperatura do meio reacional

A temperatura pode ser um fator importante no tamanho e em outras características do óxido de zinco [48][123][124], Maia et al. (2016) ao elaborarem um método de otimização para produção de nanoZnO para células solares, avaliaram a temperatura (60, 80, 100° C) do meio reacional, a concentração (0,05; 0,10 e 0,15 mol) do precursor e o tempo da reação (8, 20 e 24 h) como possíveis fatores que podem alterar o tamanho da nanopartícula. O processo foi otimizado com um delineamento por Box-Bekhein (fatorial incompleto). Como resultado houve diferença significativa entre os fatores experimentados, o menor tamanho particular foi obtido na concentração 0,05 mol, temperatura 80° C e tempo de reação 20 horas.

Diversas técnicas de síntese das nanopartículas de zinco, contam com uma fase subsequente de recozimento, visando aperfeiçoar algumas características do material como morfologia e cristalinidade, Natpasiti et al. (2017) pesquisaram os efeitos da temperatura do recozimento do óxido de zinco nas propriedades estruturais. O método utilizado na síntese das nanopartículas foi o de precipitação, como

precursores foram utilizados nitrato de zinco e hidróxido de potássio, as nanopartículas sintetizadas foram recozidas em ar ambiente com as seguintes temperaturas 600, 700 e 800° C, posteriormente as nanopartículas foram caracterizadas para avaliação, como resultado foi verificado que o tamanho dos cristais de zinco aumentou com o aumento da temperatura, a cristalização também foi melhorada [49].

A temperatura pode ser um fator interessante para manipulação do tamanho das partículas, visto que pode ser econômica e aplicada a várias técnicas, Lee et al. (2014) também escolheram a temperatura de recozimento como parâmetro de estudo em seu trabalho, a síntese foi pela técnica sol-gel e o precursor do óxido de zinco foi o ácido cítrico, as temperaturas de recozimento utilizadas no estudo foram de 500, 600 e 700° C, o estudo corroborou com o de 2017 e mostrou aumento dos cristais e das nanopartículas com o aumento da temperatura de recozimento [123].

Já o trabalho desenvolvido por Koutu et al. (2017) segue em outra direção, em sua pesquisa foi utilizado o método de co-precipitação em gradiente de temperatura com aumento decimal (70 - 110° C), como resultado houve uma diminuição dos tamanhos dos cristais com o aumento da temperatura, isto se deve a uma rápida nucleação e diminuição da taxa de crescimento relacionada ao aumento da temperatura [124].

2.2.1.2 Tempo de reação

O tempo de reação em etapas distintas do processo de síntese pode ser um fator importante nas propriedades físicas e morfológicas das partículas de óxido de zinco, sobretudo quando o aumento do tempo interfere em processos chave como a nucleação e cristalização das nanopartículas, os estudos associam geralmente esse parâmetro a outro como o pH o tipo de precursor e temperaturas dos meios reacionais [126][127][128][129].

O aumento no tempo de reação pode aumentar o tamanho das nanopartículas e alterar a morfologia dos cristais e conseqüentemente alterar algumas propriedades físicas e químicas [127][128][129]. Shai et al. (2018) avaliaram os efeitos do tempo de reação na síntese via sol-gel, o acetato de zinco e o hidróxido de sódio foram os precursores da reação em vários tempos (2, 4, 6 e 8 horas) logo após o material obtido foi caracterizado, o tamanho e a morfologia variaram bastante, em relação ao tempo

de reação, o cristalito de ZnO saltou de 33,32 nm em duas horas para 42,63 em oito horas de reação [128].

Os achados de shai corroboram com os de Flor et al. (2004) que pesquisaram os efeitos do tempo de reação no tamanho das nanopartículas de zinco, suspensões de óxido de zinco foram preparadas e caracterizadas os cristais a partir dos resultados obtidos, foi possível observar um aumento linear no tamanho médio das partículas com o aumento do tempo, a variação de tamanho dos nanocristais foi de 33-56 nm [127].

2.2.1.3 Precursores do ZnO

O óxido de zinco conta com os precursores (acetato de zinco, nitrato de zinco, cloreto de zinco e brometo de zinco), agentes redutores (hidróxidos de amônio, de sódio e de potássio), além das diversas técnicas já citadas anteriormente (Sol-gel, hidrotermal, precipitação, deposição, dentre outras); oferecendo diversas variáveis passíveis de manipulação que conseqüentemente resultam em materiais com propriedades físicas, químicas e morfológicas distintas [47][129][131].

Hassam et al. (2013) avaliaram diversos parâmetros (tempo de reação, redutores e precursores) na tentativa de aperfeiçoar a síntese do óxido de zinco pelo método sol-gel, como resultado foi possível observar que para os objetivos esperados o tempo de 24 quatro horas apresentou-se ideal resultado em um material altamente cristalizado com estruturas em nanobastões, o precursor e o redutor ideal para obtenção do alto grau de cristalinidade e homogeneidade no tamanho e morfologia foi respectivamente o nitrato de zinco e o NH₃ [129].

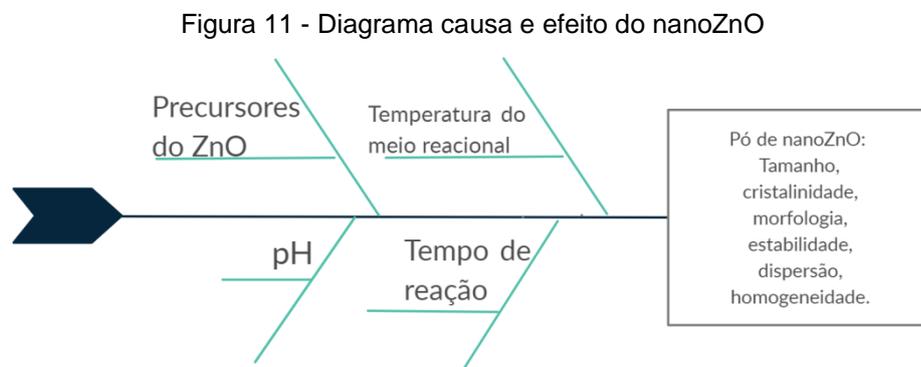
Arani et al. (2018) compararam dentre outros parâmetros a influência do precursor no resultado final na síntese de filmes de óxido de zinco nanoestruturado pela via hidrotermal, os precursores comparados no trabalho foram o acetato de zinco dihidratado e o nitrato de zinco dihidratado, o acetato de zinco resultou em particular com tamanhos mais uniformes em todas as diferentes concentrações testadas em relação ao nitrato [130]. Como observado por Rani e colaboradores e em outros presentes na literatura a concentração do precursor também altera diversas propriedades apresentadas pelo óxido de zinco, sobretudo afetando a cristalização, pH do meio, ligações intermoleculares, tamanho, morfologia e dispersão das nanopartículas [132][133].

Saidani et al. (2017) pesquisaram diversas propriedades dos filmes de óxido de zinco, sintetizados pelo método sol-gel, avaliando como parâmetro três precursores (acetato de zinco, nitrato de zinco e cloreto de zinco), foi observado que o precursor afeta profundamente as características dos filmes, o cloreto de zinco apresentou filmes com melhor cristalinidade, contudo o tamanho dos cristalitos foram menores com o acetato de zinco 20,5 nm, para o nitrato e cloreto de zinco foram respectivamente, 29,6 e 41,7 nm [134].

2.2.1.4 pH

Os precursores sofrem a influência direta do pH, sobretudo no processo de cristalização, nucleação e crescimento das nanopartículas e de filmes de óxido de zinco, a observância do pH é bastante importante visto que o óxido de zinco é insolúvel em água e solúvel em ácido e os diversos precursores e técnicas utilizadas podem apresentar variações no pH necessário [129][131][134][135].

Jim et al. (2014) variaram pH no método sol-gel tendo como objetivo variar a morfologia das nanopartículas, eles observaram a variação no tamanho e identificaram no pH 8,5 dispersão e tamanho uniformes [136]. Swaroop e Kumar (2015) também obtiveram diferentes formas de nanopartículas ao sintetizá-las no método de co-precipitação com dois valores de pH e precursores, o pH teve papel importante na mudança da morfologia dos cristais que apresentaram formato hexagonal nos pHs de 7 e 9, e em placas nos pHs 10,5 e 12,5 [137].



Fonte: autor (2020).

2.3 FATORES DE INFLUÊNCIA NA PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO

Na formulação do compósito é preciso observar como nanoZnO ficara disperso no filme de quitosana e como as etapas da preparação do filme interferirá na associação. Os principais pontos a serem avaliados é como a concentração do óxido no gel e a dispersão interferirão no resultado final (Figura 12).

A eficácia final do substitutivo vai estar relacionada com sua capacidade de ocluir e proteger o leito da lesão contra infecções, sendo assim os dois fatores selecionados são essenciais para a compreensão e obtenção de um resultado satisfatório, e associados aos fatores inerentes dos componentes individuais, do compósito, são bem eficazes para aprimoramento do substitutivo.

A concentração de nanoZnO suficiente para proteger contra os patógenos e o quanto essa quantidade altera a funcionalidade e as propriedades do compósito e a dispersão que irá definir a distribuição desse óxido e a interação na trama, uma má dispersão ocasionará diferenças estruturais em um mesmo filme e também uma má distribuição do óxido no local aplicado.

2.3.1 Concentração do óxido no filme

A concentração é o principal ponto a ser observado, visto que as ligações entre o polímero e o nanoZnO irão alterar a matriz dos filmes. A cristalinidade do polímero pode ser alterada com a presença do reforço do óxido de zinco, sendo assim pode ocorrer nucleação em torno dessas partículas com risco de aglomerados poliméricos, o óxido de zinco então deve estar disperso homogeneamente em toda a superfície. Altas concentração de nanoZnO podem tornar os filmes quebradiços e alterar fortemente a maleabilidade [120][138].

A presença do óxido de zinco pode afetar a estabilidade térmica do polímero, Sidiq et al. (2018) observaram maior estabilidade de filmes com a presença de óxido de zinco, a análise foi feita por termogravimetria, em filmes puros a temperatura de início da degradação térmica foi de 223°C nos compósitos o início se deu em 243°C [52].

O óxido de zinco também apresenta efeito nas propriedades mecânicas dos filmes, as interações próximas aos sítios de ligações entre a matriz polimérica e as nanopartículas pode ocasionar uma reticulação com interligações entre o polímero e

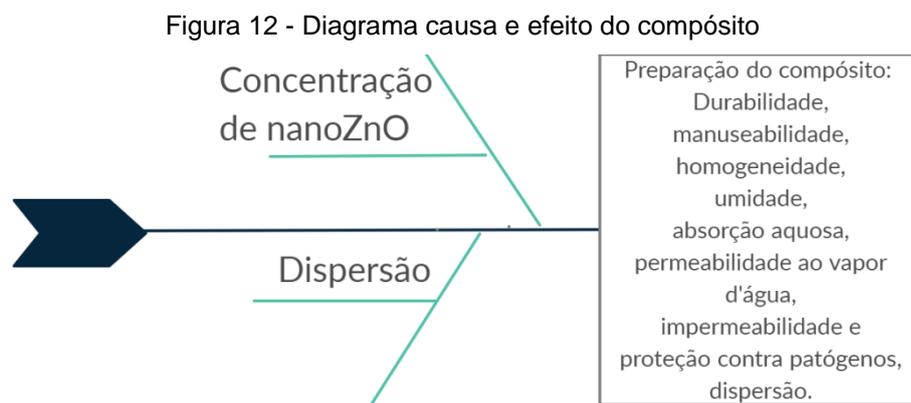
o nanoZnO. Rahman et al. (2016) observou um aumento na resistência dos filmes compósitos e uma diminuição do alongamento antes da ruptura [138].

Por último a concentração de nanoZnO do compósito também irá afetar sua ligação com moléculas de água, conseqüentemente os cristais do óxido irão diminuir a formação de poros e espaços livres após evaporação do solvente, como também irão afetar a presença de umidade e a degradação da membrana [120][138].

2.3.2 Dispersão

O nanoZnO deve ser bem disperso na matriz polimérica, propriedades físicas como cor [67] e espessura [120] são alteradas pelas partículas, deve-se então tomar o cuidado para evitar bolhas, aglomerados de partículas de nanoZnO e solubilização ineficiente das nanopartículas no gel.

Como observado no decorrer do primeiro e do segundo capítulo o óxido de zinco altera propriedades morfológicas, além de alterar significativamente a interação com moléculas de água nos filmes [138], sendo assim é de importância que a dispersão seja a mais homogênea possível para que parâmetros como maleabilidade e degradabilidade não se apresentem de formas distintas em um mesmo filme.



Fonte: autor (2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as etapas para formulação dos filmes de quitosana (controle) e dos compósitos de quitosana aditivados com óxido de zinco nanoestruturado. Os filmes foram preparados pela técnica de *casting*, onde o filme é obtido por secagem e evaporação do solvente. Também neste capítulo é apresentado o preparo das soluções utilizadas e os ensaios experimentais. No fim do capítulo é brevemente explicada a ferramenta estatística aplicada para análise dos resultados.

Os ensaios necessários para avaliação completa dos compósitos como substitutivos de pele são os seguintes:

- Ensaios de caracterização sensoriais: **testes de continuidade, manuseabilidade, homogeneidade e retirada da placa**. São ensaios subjetivos dependentes do pesquisador, sendo assim carecem de precisão. Essas medidas auxiliam a avaliação dos parâmetros de resistência e elasticidade.
- Ensaios mecânicos: **teste de tração** para obtenção da resistência a tração, tensão de ruptura, alongamento máximo o modulo de elasticidade; teste de **peel** (adesão). Os ensaios mecânicos são realizados em maquina universal de ensaios (resolução 0,1 mm e 0,05 kgf). Infere-se com essas medidas a capacidade de resistência, flexibilidade e elasticidade, também é possível inferir indiretamente sobre os parâmetros sensoriais de continuidade, manuseabilidade e homogeneidade.
- Ensaios de adesão: **grau de molhabilidade** (por angulo de contato), **adesão** em cultura celular.
- Ensaios de caracterização por espectroscopia: **espectroscopia UV/visível, espectroscopia infravermelho por transformada de fourier (FTIR) e espectroscopia de raios-x por dispersão de energia (EDS)**. Para a caracterização química utiliza-se comumente a associação de técnicas de espectrofotometria como FTIR (principalmente filmes finos com alta presença de carbono), UV/vis e Raman. o EDS apresenta como vantagem a precisão, alta resolução (2 a 5 nm) e sensibilidade com limite de detecção de 0,1-0,5% em peso, é uma técnica que necessita de pequena quantidade de amostra, mas não é muito sensível para quantificar traços. Quando o material é orgânico o FTIR é mais indicado, ele possui resolução de 5 a 0,2 cm^{-1} e precisão

fotométrica de 0,1% de T (transmitância). São técnicas usualmente complementares para identificação de filmes, seus padrões de apresentação e interação das fases integrantes.

- Ensaio de caracterização física: **espessura, opacidade, conteúdo de umidade e capacidade máxima de absorção em soluções aquosas.** A medida da espessura em filmes finos é geralmente feita em micrômetros digitais ou manuais, apesar da precisão ser geralmente a mesma em ambos 0,01 mm, os digitais costumam ser mais sensíveis, pois apresentam a leitura exata do resultado no mostrador digital. Para características como opacidade, cor e transparência a avaliação é por Colorimetria ou espectrofotometria. Colorímetros costumam ser mais precisos e sensíveis para esse objetivo, contudo na ausência, a leitura por espectrofotometria conta com alta precisão e exatidão, é realizada em cubeta de maneira perpendicular a luz incidente do aparelho e o resultado é a razão entre a absorvância, no comprimento de 600 nm, e a espessura (x). A obtenção do conteúdo de umidade por secagem em estufa é o método termogravimétrico mais utilizado para essa medida, o método em si é bastante preciso quanto a perda da umidade na amostra. É uma técnica barata e simples de ser executada, os erros encontrados geralmente estão associados ao controle inadequado da temperatura, absorção da umidade ambiente no momento da pesagem, amostras com tamanhos disformes e pontos com temperatura diferentes dentro da estufa. As técnicas para medição da capacidade de absorção geralmente envolvem a imersão das amostras em água e outras soluções aquosas, podendo ou não alterar a temperatura. A precisão da técnica pode ser afetada pela concentração iônica que mesmo em soluções provenientes de mesmo lote podem diferir, a interação com a superfície da amostra pode afetar o enchimento do material e a presença residual de umidade ou sais na amostra, além disso o controle inadequado da temperatura da estufa e do tamanho das amostras podem interferir no resultado final.
- Permeabilidade ao vapor d'água: Ensaio necessário para medir a transmissão do vapor d'água pelos filmes.
- Ensaio de degradação: **solubilidade, degradação enzimática e perda de massa em soluções aquosas.** As técnicas para medição da solubilidade geralmente envolvem a imersão do soluto em diferentes solventes, podendo ou

não utilizar agitação mecânica. Apesar de simples e fácil de executar a precisão da técnica pode ser afetada pela concentração iônica que mesmo em soluções provenientes de mesmo lote podem diferir, a interação com a superfície da amostra pode afetar o enchimento do material e a presença residual de umidade ou sais na amostra. Os testes de degradação podem ser feitos com o uso de enzimas que é o mais próximo a realidade e os de imersão em soluções aquosas por prolongados períodos de tempo. Os erros associados a técnica de perda de massa em soluções aquosas são os mesmos recorrentes nos testes de umidade, solubilidade e absorção.

- Ensaio bacteriológico: **disco-difusão, microdiluição em caldo e permeabilidade bacteriana**. Ensaio necessário para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) e à permeabilidade dos compósitos a passagem de microrganismos.
- Ensaio de biocompatibilidade: *in vitro* avaliação da viabilidade direta por **contato em poço e pela redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)** e *in vivo* modelos animais e humanos.
- Ensaio de hemocompatibilidade: **testes de Hemólise, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)**.
- Peso e pH: para as medidas de peso utilizadas em alguns ensaios foi utilizada balança analítica bel M214Ai (resolução de 0,0001 g) e o para o pH MB10, com faixa de medição até pH 14, precisão relativa de 0.01%, faixa de temperatura até 100° C (precisão de 0.1°C).

Dentre os testes citados os seguintes foram **realizados**:

- Ensaio de caracterização sensoriais.
- Ensaio de caracterização por espectroscopia: espectroscopia de raios-x por dispersão de energia (EDS).
- Ensaio de caracterização física: espessura, opacidade, conteúdo de umidade, capacidade máxima de absorção em soluções aquosas.
- Ensaio de degradação: solubilidade e perda de massa em soluções aquosas.
- Peso e pH.

3.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES

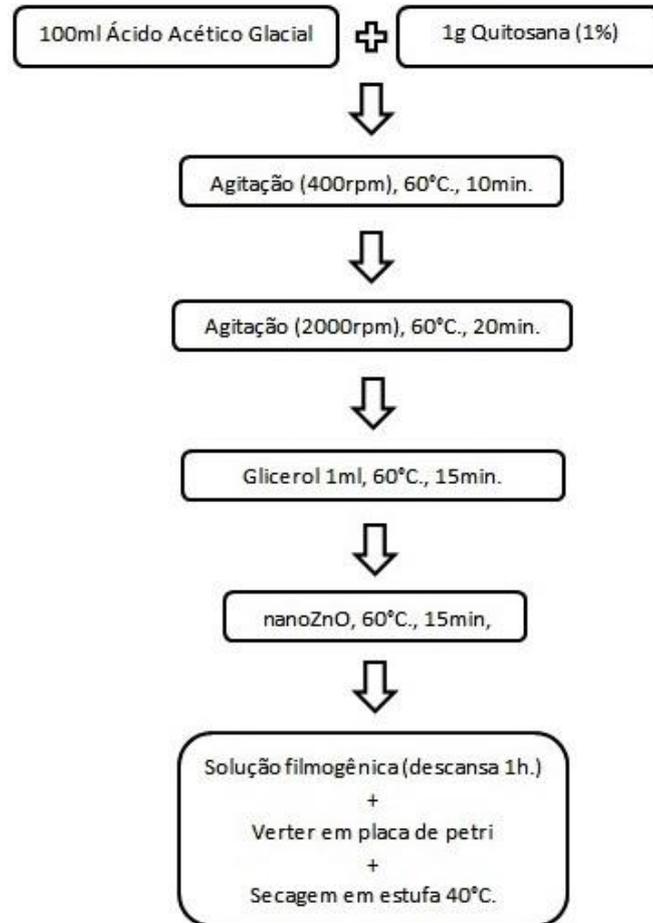
Os filmes foram preparados segundo condições previamente estabelecidas em ensaios preliminares, demonstrado na Figura 13. Foram utilizados os seguintes materiais: Quitosana 1g de médio peso molecular (Sigma-Aldrich®), 100 ml de solução de ácido acético glacial (0,5% v/v Água destilada), 1 ml de glicerol e nanoZnO (0,2, 0,3, 0,5 e 0,7% m/m da quitosana).

Os filmes de quitosana foram obtidos pela técnica de *solution casting*, seguindo as seguintes especificações:

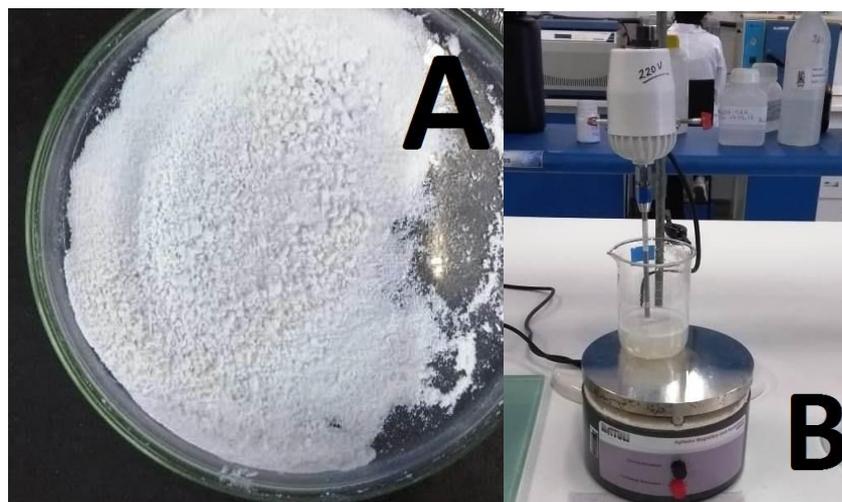
Uma solução inicial de 100 ml de ácido acético glacial foi preparada e depois aquecida a 60° C (temperatura mantida durante todo o processo), 1% (m/v) de quitosana foi adicionada e homogeneizada (Figura 14-B) com auxílio de agitador mecânico (fisatom), a princípio lentamente em baixa rotação (400 rpm) por 10 minutos até dissolução parcial, terminada esta etapa a rotação foi gradualmente elevada até 2000 rpm. Na metade do processo (30 minutos) 1 ml de glicerol foi gotejado na solução. Para os compósitos o nanoZnO (Figura 14-A) foi adicionado nos 15 minutos finais, perfazendo um total de 60 minutos.

A solução foi armazenada em temperatura ambiente por no mínimo 60 min até dissolução das bolhas, por último o gel foi vertido em placa de Petri de vidro (115 mm x 20 mm) e armazenada em estufa de secagem (40° C) por 72 h. Para análises posteriores todos os filmes foram envoltos em papel alumínio e armazenados em dessecador com sílica em gel.

Figura 13 - Fluxograma apresentado as etapas para obtenção da solução filmogênica



Fonte: o autor (2020).

Figura 14 – **A:** Pó de Óxido de zinco nanoestruturado gentilmente cedido pelo LDN; **B:** Sistema preparado para formulação da solução fimogênica

Fonte: o autor (2020).

3.1.1 Tratamentos

Para este trabalho foram preparados, pela técnica de casting, filmes de quitosana (1 %), com glicerol (1 %) e óxido de zinco nanoestruturado, cada tratamento foi realizado em triplicata, foram cinco tratamentos sendo eles:

- **FQ** - Filme de Quitosana (Controle)
- **FQ02** - Filme de Quitosana com 0,2% de nanoZnO
- **FQ03** - Filme de Quitosana com 0,3% de nanoZnO
- **FQ05** - Filme de Quitosana com 0,5% de nanoZnO
- **FQ07** - Filme de Quitosana com 0,7% de nanoZnO

3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS ANÁLISES

Para os seguintes ensaios aplicados aos filmes:

- Solubilidade.
- Capacidade máxima de absorção de soluções aquosas.
- Perda de massa.

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Tampão fosfato salino (PBS) - Para um litro de solução em água destilada foram utilizados os reagentes NaCl (8,77 g), Na₂HPO₄ (1,02 g) e NaH₂PO₄ (0,34 g), os reagentes foram dissolvidos em agitador magnético e filtrados. O pH utilizado foi de 7,4, para o ajuste do pH foram utilizados HCl ou NaOH.
- Solução de Ringer - Para um litro de solução em água destilada foram utilizados os reagentes NaCl (8,6 g), KCl (0,3 g) e CaCl₂ (0,33 g) os reagentes foram dissolvidos em agitador magnético e filtrados. O pH utilizado foi de 7.4, para o ajuste foram utilizados HCl ou NaOH.
- Solução salina de NaCl - Para um litro de solução em água destilada foi utilizado NaCl a 0,9% os reagentes foram dissolvidos em agitador magnético e filtrados.

As soluções salinas foram escolhidas por sua ampla utilização em análises bioquímicas e uso em cultura celular como o PBS, por sua utilização em pesquisas biomédicas por apresentarem composição próxima dos líquidos extracelulares como a solução de Ringer e pelo constante uso hospitalar como a solução de NaCl a 0,9%.

O pH das soluções aquosas utilizadas nos ensaios e das soluções filmogênicas foram medidas em pHmetro (pH MB10), que conta com medição de pH e controle de temperatura, com faixa de medição até pH 14, precisão relativa de 0,01%, a faixa de temperatura até 100° C (precisão de 0,1° C). O medidor é preciso com sensibilidade do eletrodo de 60-100%, nos ensaios neste trabalho a sensibilidade do eletrodo variou de 94-98%.

3.3 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL

Nas análises sensoriais dos filmes (Tabela 4) foram levados em consideração filmes secos e armazenados por no mínimo 48 horas em dessecador com sílica em gel. São análises subjetivas dependentes dos sentidos do pesquisador, verificou-se as seguintes características: retirada da placa, continuidade, manuseabilidade e homogeneidade.

Tabela 4 - Critérios avaliados na caracterização sensorial

Teste	Critério	Avaliação
Retirada da placa	Facilidade em retirar	Sim ou Não
Continuidade	Ausência de grandes rupturas	Aceitável ou Inaceitável
Manuseabilidade	Possibilidade de manuseio sem risco de romper	Sim ou Não
Homogeneidade	Ausência de bolhas, muitas partículas insolúveis e grandes zonas de opacidade	Aceitável ou Inaceitável

Fonte: autor (2020).

Retirada da placa: nesse ensaio avaliou-se a remoção do filme aderido a placa de Petri. Filmes avaliados como difíceis de retirar não foram impedidos de seguir análises posteriores.

Continuidade: nesse ensaio levou-se em conta presença de grandes rupturas nas seguintes situações: Filmes secos em placa; após o período (48 h) em dessecador; após condicionamento/retirada em papel alumínio. Ausência de rupturas nas situações descritas qualificavam o filme como contínuo.

Esse critério é qualitativo e subjetivo ao observador, sendo assim não possui boa precisão. Filmes com pequenas rupturas na borda, causadas pela retirada da placa, não foram impedidos de seguir análises posteriores.

Para outras análises indiretas da continuidade é possível utilizar técnicas de microscopia para observação da superfície e a presença de nucleações ou microrrupturas. Análises espectrofotométricas também poderiam nos dar algumas respostas como cristalinidade e interação entre os componentes.

Manuseabilidade: nesse ensaio avaliou-se a manuseabilidade, para o filme ser considerado aceitável deveria cumprir alguns critérios como não se romper facilmente ao ser manuseado ou ao ser retirado da placa e de outras superfícies de armazenamento.

Esse critério é qualitativo e subjetivo ao observador, sendo assim não possui boa precisão. Para outras análises indiretas da manuseabilidade podemos associar os resultados de análises mecânicas com a manuseabilidade apresentada nos filmes.

Homogeneidade: nesse ensaio levou-se em conta presença de bolhas, grande quantidade de partículas insolúveis e zonas de opacidade. Na avaliação foi considerado que normalmente o filme apresenta diferença de opacidade entre suas áreas, sobretudo do centro em relação a borda.

Zonas intensamente opacas com variações elevadas na espessura e transparência tornavam o filme inaceitável (heterogêneo). A presença de microbolhas não acumuladas em uma região, raras e espaçadas não tornavam o filme inaceitável.

Partículas insolúveis são possíveis em ínfimas quantidades no filme, para esse critério considerou-se inaceitável grumos, áreas descontínuas, filmes que não se distribua em todo diâmetro da placa (incompleto) e filmes que mostraram variações elevadas na transmitância em áreas distintas do mesmo. Esse critério é qualitativo e subjetivo ao observador, sendo assim não possui boa precisão.

Para outras análises indiretas da continuidade é possível utilizar técnicas de microscopia para observação da superfície e a presença de nucleações, fases distintas. Análises espectrofotométricas também poderiam nos dar algumas respostas como cristalinidade e interação entre os componentes. Análises da espessura e opacidade para observar a concentração de massa, mudanças de coloração e presença de partículas insolúveis.

3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A caracterização química foi feita por EDS (Espectroscopia por raios X por dispersão de energia) o espectrômetro é acoplado a um sistema de microscopia eletrônica de varredura.

O EDS é uma técnica analítica, com alta precisão consegue identificar a composição química de partículas a partir de 5 micrômetros. A técnica consiste na excitação do material por um feixe de elétrons e posterior captação da energia dispersiva (raios-x) do mesmo. Cada elemento apresenta fótons com comprimentos de ondas característicos que permitem a sua identificação [140].

As análises foram feitas no Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas - LDN da UFPE com equipamento da marca JEOL modelo JSM 6460 com EDS acoplado.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Neste tópico foram descritas as análises físicas dos filmes, são elas, espessura, opacidade, umidade, capacidade máxima de absorção de soluções aquosas, solubilidade e degradação em soluções aquosas.

Para essas análises foram levados em consideração filmes secos e armazenados por no mínimo 72 horas em dessecador com sílica em gel.

3.5.1 Espessura

A medida da espessura foi feita por meio de micrômetro externo mitutoyo (103-129) com 0,01 mm de precisão. Foram realizadas em triplicata, cinco medidas, os filmes foram divididos em quatro quadrantes, sendo uma medida por quadrante e uma no centro do filme. O resultado foi expresso pela média das medidas.

3.5.2 Opacidade

A transparência do filme foi determinada pela sua transmitância interna, ou seja, a razão entre luz incidida e que atravessa o meio. A opacidade é inversamente proporcional a transparência.

Alguns fatores tem a capacidade de alterar a transparência como a massa dos insumos utilizados e a heterogeneidade da amostra. Quando os filmes não se

apresentam homogêneos e possuem estruturas não solubilizadas, acarretará em diferentes índices de refração e espalhamento da luz incidida [41].

Para determinação da opacidade foi utilizada a metodologia conforme proposto por Fang et al. (2002), em Espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda de 600 nm, onde para cada tratamento uma amostra de aproximadamente 4,7 x 0,9 cm de comprimento foi inserida em uma cubeta, de maneira perpendicular a luz incidente do aparelho, a leitura é feita em triplicata e o resultado é a razão entre a absorbância, no comprimento de 600 nm, e a espessura (x). Conforme a seguinte equação:

$$T = \frac{-\log A_{600}}{X}$$

3.5.3 Conteúdo de umidade

O conteúdo de umidade foi analisado pela perda de peso, até obtenção de uma massa seca. Para isso amostras de 2,5 cm de diâmetro foram inicialmente pesadas em balança analítica bel M214Ai (resolução de 0,0001 g), o peso obtido nessa primeira pesagem é definido como massa seca inicial, logo após a amostra é levada a estufa de secagem a 105° +/- 1 C, em intervalos regulares de tempo (a cada 2 h), o filme é retirado e armazenado em dessecador contendo sílica em gel até alcançar a temperatura ambiente para então ser pesado, o processo é repetido até a amostra alcançar de peso constante. O conteúdo de umidade é expresso em função da perda de peso inicial:

$$U \% = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Em que: U é a umidade do filme [%];

m_i é a massa seca inicial da amostra [g];

m_f é a massa seca final da amostra [g].

3.5.4 Solubilidade

Segundo Turbiani, et al. (2011) Polímeros hidrofílicos costumam ser suscetíveis a ação da água. A solubilidade pode ser descrita como a massa seca resultante após 24 horas de imersão em um líquido.

Para essa análise amostras secas de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro com umidade previamente determinada, foram imersas em um sistema de agitação por 24 horas em 40ml de diferentes soluções aquosas: Água destilada, NaCl (pH 7,4) e solução de Ringer (pH 7,4), após esse período as amostras foram secas em estufa de secagem a 105° C por 24 h e então pesadas para determinação peso seco.

A solubilidade do filme (S) foi expressa em função da massa seca inicial do filme através da Equação:

$$S \% = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Em que: S é a solubilidade do filme [%];

m_i é a massa seca inicial da amostra [g];

m_f é a massa seca final da amostra [g].

3.5.5 Capacidade máxima de absorção em soluções aquosas

A capacidade máxima das amostras secas absorver diferentes soluções aquosas, foi realizada pela metodologia proposta por Rodrigues (2008) em corpos de prova de 6x1 cm² em triplicata.

Inicialmente as amostras foram pesadas em balança analítica, bel M214Ai (resolução de 0,0001 g), para definição do peso seco, posteriormente foram inseridas em tubos falcon (15 ml) contendo diferentes soluções aquosas: água, NaCl, solução de Ringer e tampão PBS. Os tubos contendo as amostras foram armazenados em estufa a 37° C por 24 horas, após esse período o excesso de solução foi removido com papel filtro e as amostras foram pesadas novamente (peso úmido).

Para todas as análises o pH do PBS e da solução de Ringer foi de 7,4. A capacidade máxima de absorção (C_w), foi determinada através da Equação:

$$Cw \% = \frac{(mu - ms)}{ms} \times 100$$

Em que: Cw é a capacidade de absorção [%];

mu é a massa úmida da amostra [g];

ms é a massa seca da amostra [g].

3.5.6 Perda de massa em soluções aquosas

O ensaio de perda de massa tem como objetivo avaliar a estabilidade estrutural do filme em soluções aquosas, para as análises foram usadas as seguintes soluções água, NaCl, solução de Ringer e tampão PBS, tendo em vista do caráter salino do plasma humano e das soluções fisiológicas utilizadas para limpeza e armazenamento em ambientes fármacos hospitalares, deste modo é possível avaliar como os filmes irão se comportar frente a estas soluções. Para todas as análises o pH do PBS e da solução de Ringer foi de 7,4.

A metodologia utilizada foi a proposta por Girata (2015), para isto corpos de prova de aproximadamente 6x1 de cm², foram inicialmente pesadas em balança analítica (peso inicial) e posteriormente foram inseridas em tubos falcon (15 ml) contendo diferentes soluções aquosas: água, NaCl, solução de Ringer e tampão PBS. As amostras seguiram para estufa a 37° C por 14 dias, após esse período os corpos de prova foram submetidos a cinco lavagens de cinco minutos cada em água destilada, para remoção de qualquer partícula de sal que possa interferir no peso, as amostras após lavagens foram armazenadas em dessecador com sílica em gel por 24 horas e foram pesadas para determinação do peso seco final.

A perda de massa foi determinada por meio da seguinte equação:

$$Mp \% = \frac{(mi - mf)}{mi} \times 100$$

Em que: Mp é a perda de massa [%];

mi é a massa inicial [g];

mf é a massa seca final [g].

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA POR ANOVA

O ANOVA avaliou em (%) a contribuição de cada parâmetro, é utilizada quando deseja identificar se existe diferenças entre as médias de uma variável em relação a experimentos com um ou mais níveis, sendo assim uma análise multivariada [143].

3.6.1 ANOVA

A análise de variâncias (ANOVA) é uma ferramenta estatística que possibilita testar a hipótese que duas populações ou mais são iguais. A técnica permite avaliar os efeitos de fatores distintos e seus diferentes níveis, analisando comparativamente as médias das respostas apresentadas em cada nível [144].

A ANOVA é um teste de hipóteses, ou seja, possibilita tomar a decisão entre hipóteses distintas, para isso utiliza-se dos dados apresentados no problema, à decisão a ser tomada em um teste de hipótese é rejeitar ou não a hipótese nula H_0 , a H_0 afirma que todas as médias testadas para os níveis de determinado fator são iguais, sendo assim fazem parte da mesma população, caso uma média apresente-se diferente das demais se rejeita a hipótese nula para aquele conjunto e aceita a alternativa (Uma ou todas as médias podem ser diferentes) [144][145].

A técnica consiste em analisar a variação total dos resultados adquiridos pelo observador frente à média calculada desses fatores, além disso, estabelece a divisão do total de variação em componentes, a cada componente é atribuída uma causa à fonte de variação a partir dessas informações é possível observar a influência desses fatores nas características que estão sendo estudadas pelo observador [145][146].

Sendo assim é ANOVA é uma técnica que pode, sobretudo nos auxiliar na tomada de decisão acerca das características desejadas ao avaliar o resultado obtido pela variação dos níveis nos fatores estudados. O primeiro passo na utilização da técnica é escolher a variável resposta a ser estudada, logo após definisse os fatores de influência, e os números limitado de valores que eles podem apresentar que são os níveis dos fatores [147][148].

A ferramenta estatística compara a média quadrada dos fatores e suas interações contra estimativa dos erros experimentais a certo nível de confiança, a equação a seguir representa a soma total dos quadrados (SQ) [147][148].

$$SQ_{Total} = SQ_{Fator} + SQ_{Erro}$$

É possível decompor os quadrados para obtenção da variação dos fatores,

$$SQ_{FatorX} = \text{réplicas} \times (\text{efeito do FatorX}^2)$$

os efeitos dos fatores são obtidos a partir da diferença entre as médias de cada nível do fator na variável resposta [148][149].

Após a decomposição dos quadrados é preciso obter a média dos quadrados (QM) que é, a soma do quadrado (SQ) do fator dividido pelo grau de liberdade (GL):

$$QM \text{ do fator} = \frac{SQ_{FatorX}}{GL}$$

o grau de liberdade é dado pela quantidade de níveis - 1 [147].

A seguinte etapa é a aplicação da estatística F, para efetuar o teste F pegasse o quadrado médio (QM) do fator e o divide pelo quadrado médio do erro, o quadrado médio do erro é:

$$SQ \text{ do erro} = \frac{QM_{Erro}}{GL_{Erro}}$$

o grau de liberdade do erro é determinado da seguinte forma:

$$GL_{Erro} = \text{níveis (réplicas -1)}$$

O resultado de F pode então ser comparado com o p-valor de acordo com o nível de confiança do teste [148][149]. Para os resultados que mostraram diferenças significativas no ANOVA, foi aplicado o teste de Tukey para comparações de médias. O nível de significância foi determinado com $p < 0,05$.

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apresentou-se neste capítulo a formulação do compósito e os ensaios aplicados para avaliação do material. Contudo algumas grandezas planejadas para

serem avaliadas nessas etapas iniciais não o foram, seja por falta de equipamento ou de tempo hábil para aplicação dos ensaios. Esses dados serão obtidos em etapas e experimentos futuros, são eles:

- Composição química: Embora os ensaios de EDS tenham sido aplicados, no planejamento inicial estava também a aplicação do FTIR para auxílio e maior abrangência sobre a composição.
- Os parâmetros mecânicos de Resistência a tração, tração de ruptura e alongamento máximo.
- Ângulo de contato.
- Transmissão do vapor d'água.
- Permeabilidade e atividade antimicrobiana e antifúngica.
- Adesão e citotoxicidade *in vitro*.

4 RESULTADOS E ANÁLISES

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados dos ensaios aplicados aos filmes de quitosana e aos compósitos formulados a base de uma matriz de quitosana aditivada com óxido de zinco nanoestruturado.

Os resultados são apresentados em gráficos e tabelas e expressos por meios da média e desvio padrão. O tratamento estatístico se deu pela aplicação da técnica da análise de variância (ANOVA) para otimização das propriedades e a comparação de médias pelo teste de Tukey. Os resultados também foram discutidos e comparados a outros trabalhos presentes na literatura.

4.1 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL

Neste tópico são descritos os resultados e análises da caracterização sensorial dos filmes. Os ensaios sensoriais levaram em consideração os critérios expostos anteriormente na seção **3.3 Material e métodos**. Recordando que, para essas avaliações, as amostras foram armazenadas por no mínimo 48 horas em dessecador com sílica em gel. Os ensaios sensoriais são subjetivos dependentes dos sentidos do pesquisador.

4.1.1 Retirada de placa, continuidade e manuseabilidade

A retirada dos filmes (Figura 15-B) foi efetuada com auxílio de espátula, cuidadosamente no sentido das bordas ao centro. Os filmes apresentaram aderência à placa com risco de ruptura se retirado abruptamente, sobretudo nas bordas. A remoção foi avaliada como difícil, levando em média de 10-15 minutos por filme. Vale ressaltar que esse critério não era impeditivo para o seguimento das análises.

Esse critério é de interesse por indicar que filmes finos (menos massa) podem se tornar descontínuos em placas com mesmo diâmetro usado nas condições aplicadas neste trabalho. Placas de acrílico podem ser uma opção com menor aderência.

Figura 15 – A: Solução filmogênica; B: Placa com o filme aderido



Fonte: o autor (2020).

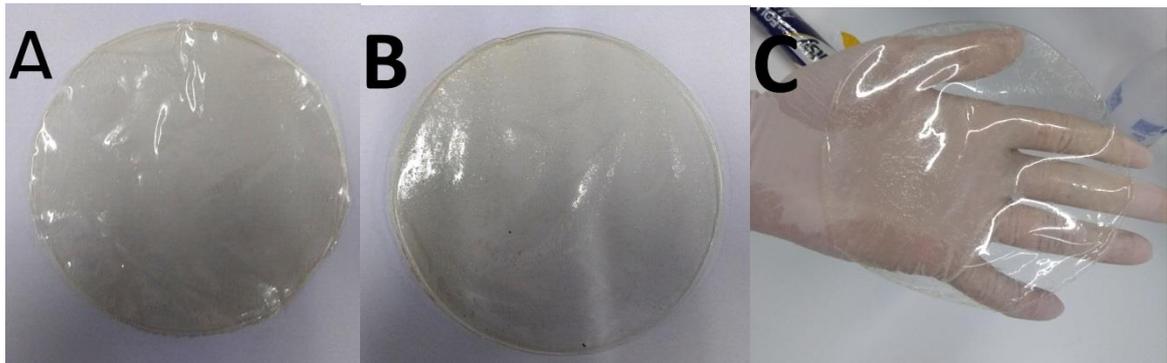
Todos os tratamentos (Figuras 16 e 17) resultaram em filmes contínuos em todas situações avaliadas no critério (em placa, após armazenamento em dissecador e após serem envoltos em papel alumínio). Alguns filmes apresentaram pequenas rupturas na borda ao serem removidos da placa, contudo essas rupturas milimétricas e espaçadas não foram suficientes para considera-los inaceitáveis.

Figura 16 - Tratamentos FQ, FQ02 e FQ03



Fonte: o autor (2020).

Figura 17 - A (FQ05), B (FQ07), C (FQ07) logo após ser retirado da placa



Fonte: o autor (2020).

Todos os tratamentos foram considerados aceitáveis no critério manuseabilidade. Uma vez retirados, os filmes apresentavam facilidade em ser realocados e retirados em placa ou papel alumínio. Os filmes também apresentavam tendência de aderência em si mesmos, contudo sem risco de ruptura.

O nanoZnO gentilmente disponibilizado pelo LDN foi utilizado por Vasconcelos (2016), onde avaliou-se filmes e blendas de quitosana e alginato aditivados com o óxido, Vasconcelos observou mudanças sensoriais em filmes com menores concentrações de nanoZnO, estes foram mais maleáveis e apresentaram dispersão mais homogênea.

4.1.2 Homogeneidade

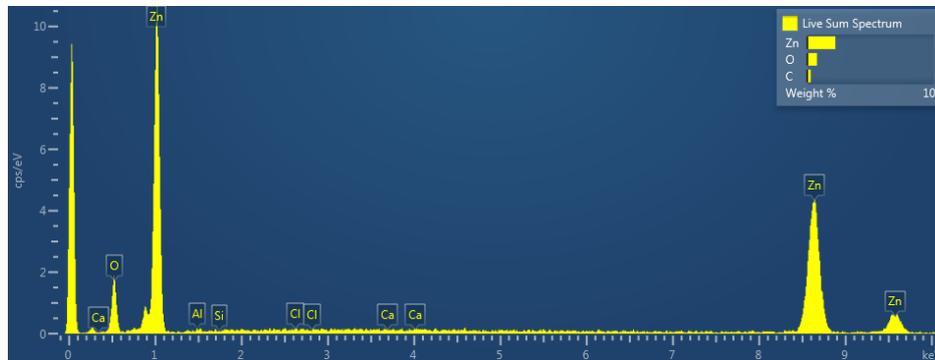
Os filmes não apresentaram bolhas e microbolhas, exibiram poucas e espessas partículas insolúveis que não alteraram a transmitância e continuidade do filme. Observou-se em algumas amostras pequenas zonas de opacidade no centro, contudo a variação da espessura e transparência não foram elevadas. Sendo assim todos os tratamentos foram aceitáveis.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Neste tópico são descritos os resultados e análises da caracterização química dos filmes, feitas no Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas - LDN da UFPE com equipamento da marca JEOL modelo JSM 6460 com EDS acoplado.

4.1.1 Análise química do nanoZnO

Figura 18 - EDS do pó de óxido de zinco nanoestruturado

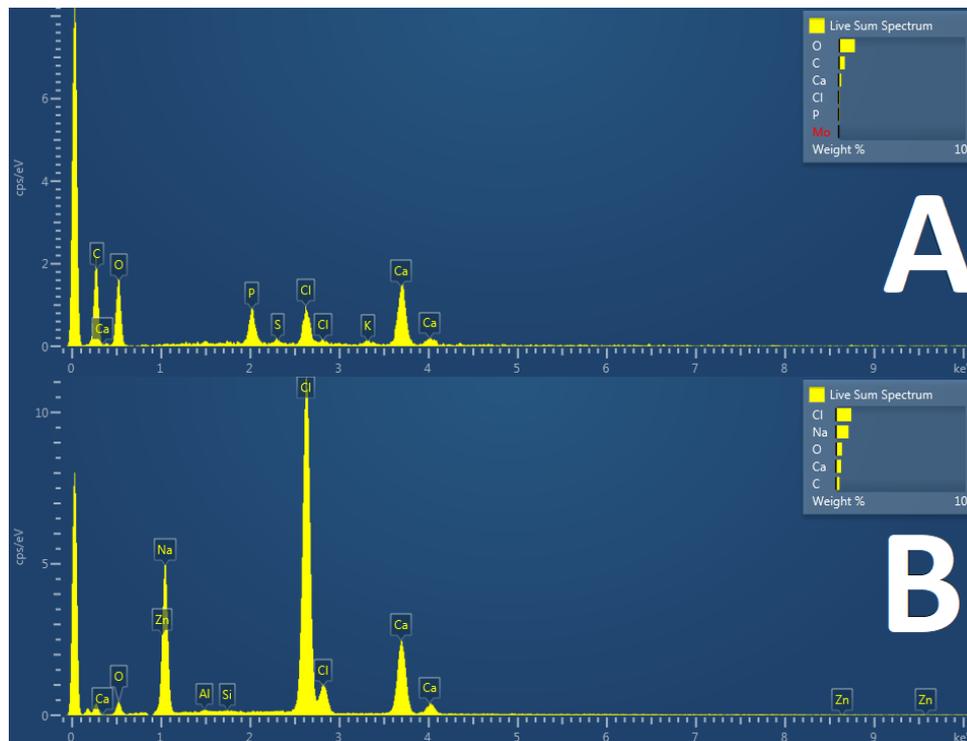


Fonte: o autor (2020).

A Figura 18 exibe o resultado da Eletroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (EDS). É possível notar maior presença do elemento Zinco (Zn), o que era esperado, além da presença do oxigênio, carbono e outros elementos traços (Cl e Ca).

4.1.2 Análise química dos filmes

Figura 19 - EDS dos filmes de quitosana e compósitos com nanoZnO.



Fonte: autor (2020).

A Figura 19 apresenta o resultado das eletroscopias dos filmes de quitosana sem nanoZnO (A) e aditivado com o nanoZnO (B), é possível observar uma predominância do oxigênio (O), do carbono (C) e cálcio (Ca) além de traços de outros elementos na Figura (A), na Figura (B) é identificada a presença do Zinco (Zn) proveniente do nanoZnO que foi aditivada a matriz polimérica.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Neste tópico foram descritas os resultados e análises das caracterizações físicas dos filmes. Relembrando que para essas análises foram levados em consideração filmes secos e armazenados por no mínimo 72 horas em dessecador com sílica em gel.

4.3.1 Espessura

Tabela 5 - Espessura dos filmes produzidos à base de quitosana pura (FQ) e quitosana aditivada com nanoZnO (0,2% - FQ02; 0,3% - FQ03; 0,5% - FQ05; 0,7% - FQ07).

Tratamento	FQ	FQ02	FQ03	FQ05	FQ07
Espessura (mm)	0,15 ±	0,18 ±	0,19 ±	0,18 ±	0,17 ±
	0,01 ^c	0,01 ^{ab}	0,009 ^a	0,01 ^{ab}	0,01 ^b

Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02 (Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07 (Filme de quitosana 1%; 0,7%; nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média ± desvio padrão.

***Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As espessuras dos filmes variaram entre 0,15 - 0,19 mm (Tabela 4.1), o tratamento FQ foi o que apresentou menor espessura 0,15mm, todos os filmes apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle (FQ) ($p < 0,05$), o que indica que o nanoZnO alterou essa propriedade. Entre os tratamentos aditivados com nanoZnO não foi observada diferença significativa na maioria deles, com exceção dos tratamentos FQ03 (0,19 mm) e FQ07 (0,17 mm) ($p < 0,05$).

O nanoZnO é capaz de alterar a espessura de filmes, como atestado por SHAHMOHAMMADI et al. (2016) que obteve um aumento da espessura de filmes baseadas em celulose bacteriana aditivados com nanoZnO. Amjadi (2019) também observou um aumento da espessura ao adicionar nanofibras de quitosana e nanopartículas do óxido de zinco em filmes de gelatina.

Dy yi (2018) não obteve diferenças significativas na espessura ao trabalhar com compósitos de gelatina/quitosana com nanoZnO em diferentes proporções.

Gomes (2016), define a espessura como a distância entre duas superfícies do material, a partir desse parâmetro é possível obter outras informações do analito. A espessura da pele depende de vários fatores (área, idade, sexo, peso) ela varia entre 1,4 - 5 milímetros. Os substitutivos, costumam apresentar menor espessura quando comparados a pele [141][142].

4.3.2 Opacidade

Tabela 6 - Transmitância (%) e Opacidade dos filmes produzidos à base de quitosana pura (FQ) e quitosana aditivada com nanoZnO (0,2% - FQ02; 0,3% - FQ03; 0,5% - FQ05; 0,7% - FQ07).

Teste	FQ	FQ02	FQ03	FQ05	FQ07
Transmitância	90 ±	83,66 ±	86 ±	76,33 ±	74,66 ±
	1,73	4,04	1,73	1,52	2,88
Opacidade	0,273 ±	0,434±	0,415 ±	0,629 ±	0,789 ±
	0,022 ^c	0,139 ^{bc}	0,149 ^{bc}	0,032 ^{ab}	0,067 ^a

Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02 (Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07 (Filme de quitosana 1%; 0,7%; nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média ± desvio padrão.

***Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O tratamento controle foi o que teve menor opacidade, 0,273, o nanoZnO interferiu na opacidade dos filmes aumentando-a (Tabela 4.2) e, conseqüentemente, diminuindo a transparência.

Os filmes aditivados com 0,5% (FQ05) e 0,7% (FQ07) apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (FQ) p<0,05. Quando comparados ao controle (FQ) os filmes aditivados com 0,2% (FQ02) e 0,3% (FQ03) não apresentam diferenças

significativas. Os filmes 0,2% (FQ02) e 0,3% (FQ03) também não diferiram entre si mas apresentaram diferenças com $p < 0,05$ em relação ao tratamento 0,7% (FQ07).

Dy yi et al. (2018) ao avaliarem filmes de gelatina/quitosana em diferentes proporções e aditivados com 0,1 e 10 mg de nanoZnO, observaram um aumento da opacidade em relação ao controle sem nanoZnO. Arfat et al. (2016) notaram o aumento da opacidade em matriz de gelatina de peixe com nanoZnO, segundo ele, essa diferença é provavelmente devida as partículas dispersas na matriz que agem como barreiras contra a luz.

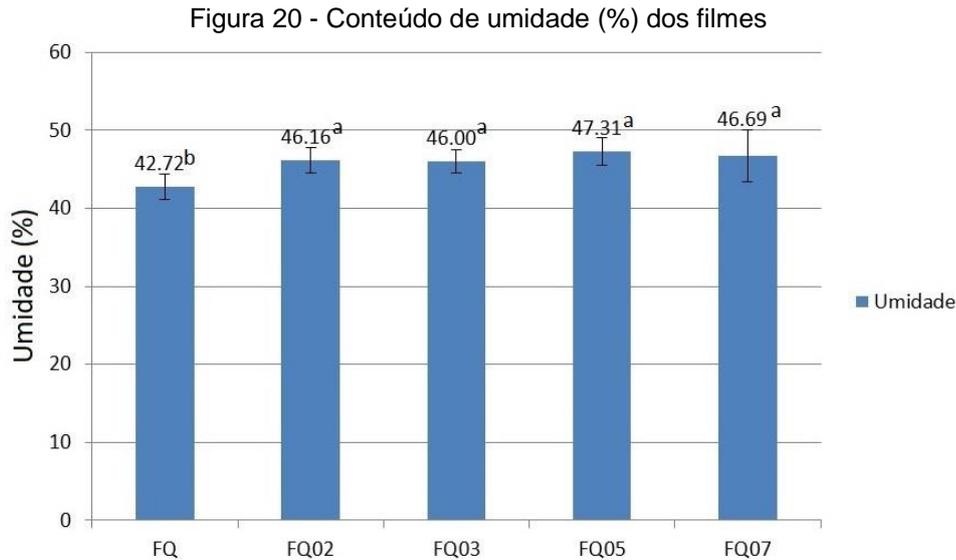
O nanoZnO disponibilizado pelo LDN foi utilizado por Vasconcelos (2016), neste estudo avaliou-se filmes e blendas de quitosana e alginato aditivados com o óxido, foi possível observar mudanças na coloração como resultado as blendas aditivadas apresentaram maior opacidade.

A transparência do filme não é um dos aspectos mais importantes para uso em substitutivos, contudo filmes transparentes facilitam o acompanhamento da lesão e o avanço do processo cicatrizante.

4.3.3 Conteúdo de umidade

Conforme é possível observar na Figura 20 o conteúdo de umidade foi maior nos filmes aditivados com o nanoZnO (FQ02, FQ03, FQ05 e FQ07), estatisticamente essa diferença foi significativa com $p < 0,05$ entre FQ/FQ02, FQ/FQ05, FQ/FQ03 e FQ/FQ07. O teor de umidade dos filmes puros (FQ) foi de 42,72%, entre os tratamentos com nanoZnO essa taxa variou entre 46 - 47,31%, não houve diferenças estatisticamente significativas entre elas.

Foi observado um alto teor de umidade nos filmes, o que não é bom, já que pode limitar a estabilidade e tempo de uso do material. A quitosana é um polímero bastante hidrofílico, o que contribui para a ligação entre a matriz com moléculas de água quando em contato. A afinidade a água é devido a alta polaridade de seus agrupamentos aminos [120][153].



Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02 (Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07 (Filme de quitosana 1%; 0,7% nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média \pm desvio padrão.

***Letras iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao ligar-se a água a estrutura do polímero sofre alteração formando uma rede de moléculas de água ao redor de sítios aminos. A rede formada pode aos poucos desestruturar a matriz polimérica e afetar a sua estabilidade física, contudo essa mesma alteração pode ser utilizada na hidratação de tecidos lesados e na capacidade de intumescer feridas com elevado teor de exsudato [112][153].

Sabe-se que os plastificantes também são agentes que afetam a hidrofiliabilidade dos materiais poliméricos, o glicerol em alta concentração tem a capacidade de atrair moléculas de água, além de mudar o rearranjo matricial da quitosana, ao ligar-se ao polímero os sítios próximos a essas ligações tornam-se ainda mais propícios a ligações com moléculas de água [40][122].

A literatura apresenta valores bem inferiores aos observados neste trabalho; Singh e colaboradores (2015) encontraram em filmes de quitosana em diferentes concentrações do polímero e do glicerol valores que variavam de 13 - 19% [40]. Homez-Jara e colaboradores (2018), observaram valores entre 11 - 31% [120].

O alto valor de umidade pode ser justificado por diversos motivos, desde a presença de partículas de quitosana não solubilizadas que costumam ter alta afinidade a água absorvendo-a, como também a variação de parâmetros ambientais como temperatura e umidade relativa do ambiente. Aguirre-Loredo et al. (2016),

obteve valores de conteúdo de umidade acima de 40% ao manipular esses dois parâmetros.

A presença do nanoZnO neste trabalho, foi capaz de aumentar o teor de umidade dos filmes, provavelmente essa mudança se relaciona a sua dispersão no material e interação com a quitosana, resultando em rearranjo da matriz nessas áreas e expondo o material a moléculas de água. A quitosana tem a capacidade de formação de complexos com íons metálicos, dependente do grau de desacetilação e grupos aminos disponíveis aos quais esses íons ligam-se. É um polímero quelante com capacidade de adsorção iônica consequentemente alterando sua estrutura [154][155].

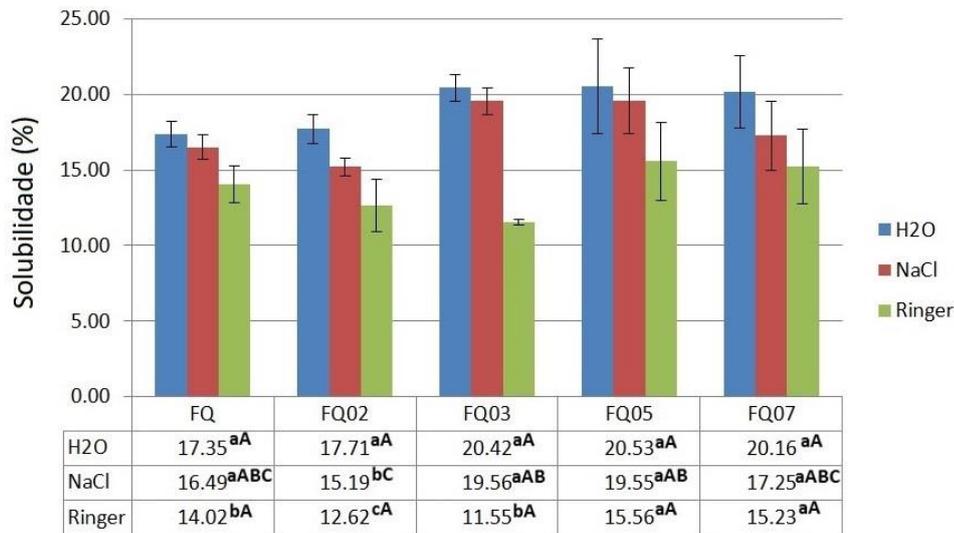
A umidade pode ser um impeditivo para o uso dos filmes em feridas de cicatrização longas com alto teor de exsudato, pois tendem a desestabilizar a matriz. O teor de umidade também indica a capacidade de manter a hidratação tecidual e a manutenção de um ambiente saudável e úmido para a recuperação tecidual. A umidade conferida permite que, caso seja necessária a troca do curativo, não haja nova ação traumática por remoção no leito em cicatrização.

A análise desse parâmetro é essencial para o entendimento da solubilidade, da capacidade máxima de absorção e da perda de massa e é um bom indicativo da eficácia dos filmes confeccionados. Tendo como objetivo feridas com exsudato ou não, feridas de primeiro ou segundo grau com cicatrização de até três semanas o teor de umidade apresentado indica bom potencial de uso do filme.

4.3.4 Solubilidade

A solubilidade (Figura 21) difere bastante a depender do meio aquoso ao qual o filme está inserido. É possível observar no gráfico abaixo que os filmes apresentaram maior solubilidade em água, seguido de solução salina (NaCl pH 7,4) e solução de Ringer (pH 7,4). Quando avaliadas a variação da solubilidade em soluções em um mesmo tratamento houve diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos FQ, FQ02 e FQ03 ($p < 0,05$).

Figura 21 - Solubilidade (%) em 24h dos filmes em diferentes soluções aquosas (H₂O, NaCl e Ringer).



Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02(Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07(Filme de quitosana 1%; 0,7%; nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média.

***Letras minúsculas (abc) iguais na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ABC) iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A diminuição da solubilidade em NaCl e solução de Ringer pode ser explicada pela presença de sais dispersos, a solução de Ringer contém maior concentração salina em consequência foi a que menos solubilizou. A hidrofiliabilidade da quitosana pode ser afetado pelos íons dos sais e diferença dielétricas resultante. Os sais também diminuem os sítios disponíveis para ligações com a água, ocupando os espaços vazios, deixados pela evaporação do solvente na matriz polimérica [110][156][157].

A solubilidade em água demonstrou aumento nos tratamentos com o nanoZnO indo de 17,35% (FQ) a 20,53% (FQ05), contudo não houve diferenças estatisticamente significativas.

Quando imersos em NaCl a tendência se repetiu, com exceção do tratamento FQ02 (15,19%) que foi menor do que FQ (16,49%), a maior solubilidade em NaCl foi encontrada no tratamento FQ03 - 19,56%. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre FQ02/FQ03 e FQ02/FQ05 ($p < 0,05$).

Para a solução de Ringer as médias primeiramente apresentaram tendência de queda quando comparado o controle (FQ - 14,02%) e as menores concentrações do

nanoZnO FQ>FQ-02>FQ03 seguida de leve aumento nas maiores concentrações FQ<FQ07<FQ05. A solubilidade variou entre 11,55%(FQ03) a 15,56% (FQ05).

Homez-Jara et al. (2018) desenvolveram filmes de quitosana em diferentes concentrações (0,5%; 0,1% e 1,5%) e secados em diferentes temperaturas (2, 25 e 40° C), com uso de glicerol. As solubilidades em água apresentaram um decréscimo ao elevar-se a temperatura, os valores variaram de 18.4 - 32.3%, a menor solubilidade correspondendo a filmes de 1% com secagem a 40° C.

Lima et al. (2017) observaram em seu trabalho com filmes de quitosana puros (1,5%) e com xantana, secados a 38° C, valores que variaram entre 21,5 - 22,5%, o filme puro apresentou 21,9% de solubilidade.

Vasconcelos (2016) também testou a solubilidade do nanoZnO desenvolvido no LDN, para os filmes puros de quitosana (1,5%) a solubilidade foi de 11,59%, os filmes aditivados com 0,1% e 0,2% de nanoZnO apresentaram respectivamente 3,04 e 28,73% de solubilidade. No presente trabalho os valores variaram de 11,5 a 20,5% os valores variaram próximo aos descritos nos trabalhos citados anteriormente.

Os resultados do teste, demonstram que os filmes apresentam uma baixa taxa de solubilidade mesmo em agitação, bom indicativo da estabilidade e integridade do filme, sobretudo nas soluções salinas, o que para filmes destinados para curativos oclusivos em queimados é um resultado satisfatório.

A estabilidade apresentada nas soluções salinas em pH 7,4 é um bom indicativo, pois o exsudato e os fluídos corpóreos também são soluções salinas, e o valor do pH é próximo ao fisiológico do sangue. Os valores demonstram que o teor de umidade não afetou negativamente a taxa de solubilidade do filme, mesmo em agitação, o que indica que caso utilizado em feridos de 1-2 graus manteria um ritmo de degradação que acompanhasse o processo de cicatrização.

Em água onde foi observada as maiores taxas solubilidade, os valores ficaram em uma taxa considerada baixa, junto em seguida com o NaCl o que não alteraria profundamente o filme caso passasse por etapas de limpeza por essas soluções.

Não foi estabelecido o percentual específico de solubilidade correspondente para cada um dos constituintes dos filmes e filmes compósitos (quitosana, glicerol e nanoZnO).

Os valores demonstrados indicam que o uso de óxido de zinco não afeta negativamente a estabilidade do filme, embora apresente um aumento nos filmes com nanoZnO, essas diferenças não se mostraram estatisticamente significativa.

Quando comparados os resultados da solubilidade e teor de umidade observa-se que, embora o nanoZnO tenha afetado expressivamente na retenção de umidade do filme o efeito observado do óxido na solubilidade, sobretudo na solução mais salina (Ringer), não foi significativo. Resultado satisfatório para o objetivo proposto no trabalho e que possibilita o seguimento dos testes com concentrações maiores do óxido.

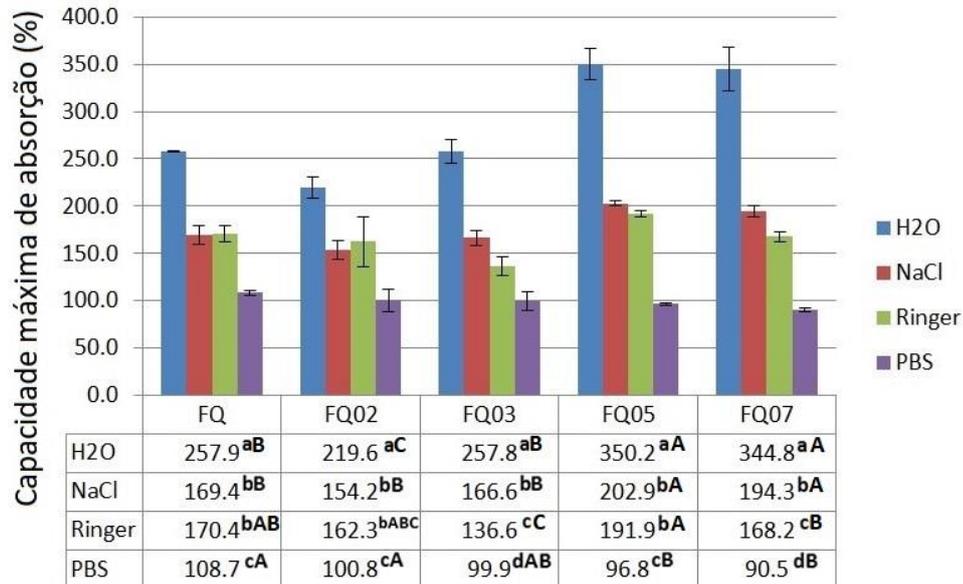
4.3.5 Capacidade máxima de absorção em soluções aquosas

É possível observar (Figura 22) que as maiorias das amostras nos tratamentos seguem uma tendência de maior capacidade para a menor a depender da solução aquosa. Da mesma forma que no teste de solubilidade foi identificada tendência de diminuição do percentual na solução salina mais concentrada o PBS. Indicando que a solubilidade está diretamente relacionada com a capacidade de intumescer.

A relação entre solubilidade e capacidade máxima de absorção, nos remete mais uma vez ao que a literatura descreve acerca da hidrofília do polímero quitosana, como também do uso do agente plastificante glicerol.

As soluções salinas como já dito, interferem na matriz polimérica diminuindo os sítios de ligação entre a água e a quitosana e a ocupação por moléculas de sais dos vácuos presentes nos filmes secos que poderiam vir a serem preenchidos com água [12][110][157][158].

Figura 22 - Capacidade máxima de absorção (%) em 24h dos filmes em diferentes soluções aquosas (H₂O, NaCl, Ringer e PBS).



Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02 (Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07 (Filme de quitosana 1%; 0,7% nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média.

***Letras minúsculas (abc) iguais na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ABC) iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As amostras apresentaram-se estatisticamente significativas quando comparadas às soluções de um mesmo tratamento. Em todos os tratamentos H₂O obteve significância ($p < 0,05$) comparado as soluções salinas. NaCl e Ringer diferiram da água e do PBS ($p < 0,05$). Nos tratamentos FQ03 e FQ07 todos as amostras diferiram entre si com $p < 0,05$.

A capacidade de absorção em água teve seu menor e maior valor respectivamente em FQ02 (219,6%) e FQ05 (350,2%). Houve diferenças estatisticamente significativas entre os filmes com maior concentração de nanoZnO (FQ05 e FQ07) em relação ao controle (FQ) e as duas menores concentrações (FQ02 e FQ03), FQ02 também mostrou diferença $p < 0,05$ em relação a FQ e FQ03.

A maior taxa encontrada no NaCl foi no tratamento FQ05 (202,9%), junto com FQ07 (194,3%) obtiveram as maiores capacidades de absorção do NaCl, ambos diferiram com $p < 0,05$ do controle FQ e das duas menores soluções, FQ02 e FQ03. O controle e os tratamentos com as duas menores concentrações FQ02 e FQ03, não

diferiram significativamente entre si, ambas apresentaram valores menores e próximos do controle (FQ), respectivamente para 154,2% e 166,6%.

A solução de Ringer teve sua maior capacidade de absorção em FQ05 (191,9%) e a menor em FQ03 (136,6%). FQ05 diferiu significativamente com $p < 0,05$ de FQ03 e FQ07, FQ03 também diferiu com $p < 0,05$ de FQ07. FQ, FQ02 e FQ07 não diferiram significativamente entre si e apresentaram percentuais de intumescimento com valores próximos (170,4, 162,3 e 168,2%).

O tampão PBS foi o que apresentou menor capacidade de absorção e menor variação dos valores de 90,5 - 108,7% FQ e FQ07 respectivamente, foi observada uma tendência de queda na absorção ao aumentar a concentração de nanoZnO nos filmes. Houve diferença estatisticamente significativas com $p < 0,05$ entre os tratamentos FQ05 e FQ07 com FQ e FQ02. Segundo Assis et al. (2003) a menor capacidade de absorção dos filmes em PBS, pode ser justificada pelas diferenças iônicas entre as soluções. A quitosana apresenta afinidade por moléculas polares, facilitando sua interação com as moléculas da água, por sua vez o tampão fosfato (pH: 7,4) apresenta constante dielétrica inferior à da água destilada o que explica suas moléculas menos polarizadas [112].

Bhuvaneshwari et al. (2011) observaram que filmes puros de quitosana de concentrações (1,2%) dissolubilizados em ácido acético (1, 2 e 3%) demonstraram em água uma variação de 10 - 49% na capacidade de absorção após 6 horas.

Já os valores observados por Homez-Jara et al. (2018) em filmes de quitosana em diferentes concentrações (0,5%; 0,1% e 1,5%) e secados em diferentes temperaturas (2, 25 e 40° C), com uso de glicerol imersos em água destilada, por 24 horas variaram de 113 - 236%. A maior capacidade de absorção corresponde aos filmes de 1,5% com secagem a 40° C, na concentração de 1% secado a 40° C a taxa foi de 214%. Homez-Jara argumenta que o aumento da capacidade aliada ao aumento da temperatura pode estar associado ao melhoramento da interação do plastificante com o polímero nessa condição, resultado numa maior mobilidade da matriz e incrementando a capacidade de interação com moléculas de água.

Rodrigues (2008) avaliou blendas de quitosana e alginato em diversos parâmetros de rotação e vazão do gel, em seu trabalho ele também utilizou filmes puros de quitosana para comparação. As membranas puras de quitosana em

concentração de 2%, mostraram uma capacidade máxima de 115% de absorção de água em 24 horas a 40° C.

Llanos et al. (2015) ao avaliar o uso de filmes de quitosana neutralizadas, observou nos filmes puros de quitosana 1% (v/m) uma queda na absorção do PBS, para o teste ele acompanhou por até 72 horas o intumescimento dos filmes em dois pHs distintos da solução (5,0 e 9,0), em 24 horas de imersão ele observou que para o pH 5,0 a taxa de absorção foi de aproximadamente 275% e em pH 9,0 175%.

Dallan (2005) em seus estudos observou capacidade de absorção do tampão PBS 107,6% para filmes com 1% de quitosana sem glicerol e de 112,9% com a adição de 0,5 ml de glicerol, o leve aumento pode ser devido a presença do glicerol como já comentado anteriormente no trabalho.

Sabe-se que lesões cutâneas sobretudo as causadas por queimaduras apresentam bastante exsudato, curativos com boa capacidade de intumescer são essenciais para o tratamento dessas feridas e a manutenção da umidade do meio. Sendo assim a capacidade máxima de absorção de soluções aquosas, apresentadas neste trabalho foram satisfatórias.

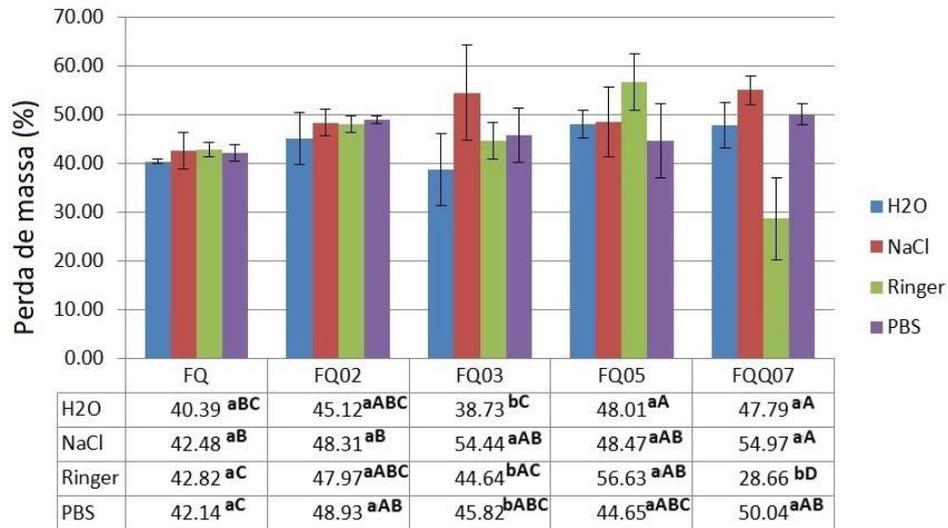
O intumescimento observado diminui bastante quanto mais sais presentes tiver a solução, contudo a capacidade ainda é bastante elevada acima de 90%, sendo possível seu uso em feridas com exsudato. A influência do NanoZnO se faz mais presente nesse parâmetro que na solubilidade, é possível observar uma tendência de aumento na capacidade de absorção nas maiores concentrações do óxido (FQ05 - 0,5%; FQ07 - 0,7%), a única exceção é a solução PBS (mais salina) que também apresenta a menor variação entre seus valores.

Quando comparado esse resultado com a solubilidade é possível correlacionar a quantidade de intumescimento com a solubilidade dos filmes tendo em vista que a água mais absorvida em todos os tratamentos pode ter interferido na trama do polímero resultado numa taxa de solubilidade maior. Já os sais presentes no NaCl e na solução de Ringer diminuíram a taxa de absorção e conseqüentemente a desestabilização e solubilidade das amostras. Dados que também afetam feridas *in vivo* devido a constituição salina dos fluidos fisiológicos.

Os resultados observados nesse parâmetro possibilitam a condução de mais testes em maiores concentrações de nanoZnO como também a eficácia e estabilidade do material ao entrar em contato com soluções salinas, como os fluidos corpóreos.

4.3.6 Perda de massa em soluções aquosas

Figura 23 - Perda de massa (%) em 7 dias dos filmes, em diferentes soluções aquosas (H₂O, NaCl, Ringer e PBS)



Fonte: autor (2020).

*Descrição das condições analisadas: FQ - controle (Filme de quitosana 1%; 1% glicerol); FQ02 (Filme de quitosana 1%; 0,2% nanoZnO; 1% glicerol); FQ03 (Filme de quitosana 1%; 0,3% nanoZnO; 1% glicerol); FQ05 (Filme de quitosana 1%; 0,5% nanoZnO; 1% glicerol); FQ07 (Filme de quitosana 1%; 0,7% nanoZnO; 1% glicerol).

**Resultados estão expressos por média.

***Letras minúsculas (abc) iguais na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas (ABC) iguais na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conforme demonstrado na Figura 23 a perda de massa foi bastante elevada para a maioria dos tratamentos nas diversas soluções, visto que, a quitosana é um polímero bastante insolúvel em soluções que não sejam ácidas [12][110]. Os fatores elencados para o alto teor de umidade também podem ser aplicados aqui, uso de plastificante, presença de moléculas não solúveis, e níveis de intumescimento elevado podem com o passar do tempo causar ruptura na estrutura da matriz polimérica.

A taxa de perda de massa em 14 dias variou de 28,66 a 56,63 % em ambos os casos foram para a solução de Ringer (FQ07 e FQ05). A maior variação entre soluções testadas em um mesmo tratamento foi no FQ07 onde a amostra imersa em Ringer mostrou diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ com H₂O, NaCl e PBS.

Em água os filmes Quitosana/nanoZnO (FQ02, FQ05 e FQ07) perderam mais massa ao serem comparados ao filme de quitosana puro (FQ) 40,38% a exceção foi o tratamento FQ03 que apresentou 38,73%.

Nos tratamentos com NaCl a mesma tendência se repetiu, o tratamento FQ - 42,48% foi onde menos houve degradação, a maior taxa entre as amostras aditivadas foi observada em FQ07 - 54,97%. Houveram diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ entre FQ e FQ05 e FQ e FQ07.

Para a solução de Ringer a taxa de perda em FQ07 - 28,66% foi a menor entre todos os tratamentos. Todos os outros tratamentos mostraram maior perda de massa quando comparados ao filme puro FQ - 42,81%. Houve diferenças estatisticamente significativas entre FQ e FQ05 $p < 0,05$, FQ e FQ07 $p < 0,05$, FQ02 e FQ07 $p < 0,05$, FQ03 e FQ07 $p < 0,05$ e FQ05 e FQ07 $p < 0,05$.

Nos filmes imersos em PBS todos o tratamento FQ apresentou taxa de 42,14% todos os outros perderam mais massa o maior valor encontrado foi no FQ07 - 50,04%. Entre as amostras imersas em PBS $p < 0,05$ entre FQ e FQ02 e FQ e FQ07.

A perda de massa foi bastante elevada se comparada a literatura, Girata (2018) obteve perda de massa em água variando entre 8,0 - 27% de 5,8 a 7,5% em solução salina e de 5,0 a 9,7% em PBS. Fernandes (2009) teve uma taxa que variou de 13,92 a 20,83% em 14 dias de imersão em água a 37° C, já Rodrigues (2009) apresentou o valor de 4%.

Melin (2013) analisou filmes e blendas que continham Quitosana, no seu trabalho foi observada uma perda maior de massa da quitosana (2,2% m/v) / glicerol (1% m/m), que ficou em torno de 27,2 % no 15 dia do experimento em PBS, já o filme puro teve sua dissolução total no 9º dia.

Veiga et al. também encontrou valores abaixo dos 30% de perda de massa de quitosana associada a outros polímeros.

Não foi estabelecido o percentual específico de perda de massa correspondente para cada um dos constituintes dos filmes e filmes compósitos (quitosana, glicerol e nanoZnO).

Quando comparamos os atributos perda de massa (14 dias) e solubilidade (24h), podemos observar que no primeiro a perda de massa costuma ser menor em água, já no segundo nas soluções salinas. Essa diferença pode ser devida alguns fatores, mecânicas (agitação no de solubilidade), temperatura de 37° C no teste de perda de massa e de 25° C no de solubilidade, o pH em 7,4 nas soluções salinas e principalmente o tempo. Apesar de a presença dos sais e o pH básico possam diminuir a protonação a entrada de água no teste de solubilidade, com o tempo esses íons dos

sais podem causar maior desarranjo e troca iônica com a quitosana e consequente aumentar o desarranjo da matriz polimérica.

Embora a perda de massa seja um pouco elevada com média de perda de massa em 46,05%, essa taxa é viável para uso clínico, visto que outros polímeros apresentam taxa de perda maior. Feridas de segundo grau levam em média 7 - 20 dias para cicatrização as taxas encontradas no trabalho mostram-se boas para diminuição de trocas dentro dessa margem de tempo.

A taxa da perda de massa também indica que a degradação do polímero, tanto em agitação mecânica em 24 horas (solubilidade) como no 14^o dia em 37° C (temperatura próxima a do corpo) mostra-se de acordo com os objetivos presentes no trabalho, permitindo uma boa cicatrização, mantendo a umidade e degradando-se a uma taxa aceitável além de diminuir a chance de traumas pela necessidade de troca de curativos.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugerem que o compósito desenvolvido pode atender o objetivo do trabalho. O nanoZnO presente nos filmes não inviabiliza a matriz de quitosana. Como apresentando na revisão bibliográfica do presente trabalho as nanopartículas de ZnO podem ser aplicadas a matrizes para diversos fins, sobretudo na indústria alimentar e na produção de curativos. Sendo a finalidade principal do reforço com nanopartículas de ZnO o efeito contra microrganismos.

Os resultados anteriores do nanoZnO sintetizado no LDN corroboram com a capacidade do nanoZnO ser utilizado como um reforço, como demonstrado por Lima Junior (2016), o polímero PHB reforçado com o nanoZnO não foi afetado negativamente, embora o nanoZnO tenha sido capaz de alterar a cristalização nos compósitos.

Vasconcelos (2016) também atestou a viabilidade dos compósitos reforçados com o nanoZnO do LDN, sua análise sensorial indicou aumento da opacidade e mudanças da coloração em filmes com o nanoZnO, também se notou melhor maleabilidade ao diminuir a concentração do nanoZnO.

No presente trabalho os compósitos de quitosana e nanoZnO foram considerados aceitáveis para os critérios sensoriais, houve alterações na opacidade

evidenciadas nas duas maiores concentrações utilizadas, como também um aumento na espessura dos filmes aditivados.

Alguns trabalhos presentes na literatura com nanopartículas de ZnO também podem ter alguns dos seus resultados comparados aos nossos. Abbsipour et al. (2014) ao revestir gaze comum com uma solução de quitosana e nanopartículas de ZnO/Ag notou algumas alterações na gaze, entre elas, o aumento da capacidade de combater agente infecciosos, efeito sinérgico entre as nanopartículas e aumento da absorção de água pela presença da quitosana, embora não tenha avaliado se as nanopartículas interferiram nessa absorção. Nos resultados do presente trabalho observou-se um aumento da absorção da água e da solução salina NaCl nos compósitos com maiores concentrações de nanoZnO (0,5 e 0,7%) e diminuição quando a solução salina era o PBS.

Yi et al. (2019) observou em compósitos de quitosana e gelatina, reforçados com nanopartículas de ZnO, aumento da opacidade dos filmes aditivados devido a presença das nanopartículas.

Já Lu et al. (2017) observou que esponjas porosas de quitosana, aditivadas com nanopartículas de ZnO/Ag, obtidas por liofilização, apresentavam menor taxa de intumescimento comparadas a esponjas pura de quitosana, isso deve-se a diminuição da porosidade causada pela adição das nanopartículas, diferindo dos resultados demonstrados na presente pesquisa, contudo, o tratamento da matriz foi diferente esponja porosa em Lu et al. e filmes neste trabalho.

As análises bacteriológicas com os filmes compósitos, inicialmente planejadas para serem concluídas antes da defesa da dissertação do mestrado, foram iniciadas, contudo alguns ensaios ainda seriam iniciados e os já iniciados devieram ser repetidos para sua conclusão, o que não foi possível devido as normas excepcionais de distanciamento e pausa das atividades de ensino e pesquisa, estabelecidas a comunidade acadêmica devido a pandemia do coronavírus.

5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Observou-se nos filmes compósitos bons resultados de opacidade e espessura, os valores de opacidade elevaram-se ao adicionar nanoZnO com o valor máximo apresentado de 0,789 indicando diminuição da transparência dos compósitos, contudo mesmo nos filmes mais opacos os valores não ultrapassaram 1,0 o que indicaria filmes sem passagem de luz, os filmes apresentaram boa transparência todos acima de 70% sem muita alteração na cor. A espessura variou entre 0,15 - 0,19 mm, valores abaixo da espessura total da pele que varia de 1,5 a 4 mm, permitindo melhor acomodação e aderência ao leito da ferida. obteve-se espessuras mais elevadas em presença do óxido.

O conteúdo de umidade apresentou-se elevado quando comparado aos valores consultados na literatura para a quitosana (11 - 31%), obteve-se valor máximo de 47%. A presença das nanopartículas influenciou no aumento da umidade, visto que o filme puro de quitosana apresentou menor teor de umidade (42,72%), diferindo significativamente dos filmes compósitos.

Observou-se maior solubilização em água, seguido de NaCl e solução de Ringer, indicando que os íons e o pH (7,4) das soluções salinas podem ter interferido no processo. Demonstrou-se variação nos percentuais com o uso do nanoZnO, contudo na maioria dos tratamentos não houve diferenças estatisticamente significativas. Os valores foram próximos aos encontrados na literatura consultada para quitosana (11,5% a 22,5%).

Obteve-se ótimas taxas, todas acima de 60% e com valores próximos ou superiores aos encontrados na literatura consultada, e de absorção em soluções aquosas, semelhante ao teste de solubilidade, alcançou-se taxas mais elevadas em tratamentos imersos em água (219,6 - 350,2%), o PBS (solução salina com maior quantidade de sais) contou com as menores taxas (90,5 - 108,7%) corroborando com os resultados observados no teste de solubilidade.

O uso de nanoZnO foi capaz de aumentar com diferenças significativas a absorção nos tratamentos de maior concentração (FQ05 e FQ07) em pelo menos duas soluções H₂O e NaCl, esses tratamentos também diferiram na solução PBS, contudo para esta solução houve diminuição da absorção ao utilizarmos o nanoZnO.

A perda de massa durante 14 dias foi elevada, variando de 28,36 a 56,63%, a quitosana é um polímero estável, a degradação em soluções aquosas encontradas na

literatura consultada variou de 4,0% a 27,2%. Os valores elevados encontrados corroboraram com o conteúdo de umidade encontrado, já que a presença de umidade em filmes tende a desestabilizá-los. A perda de massa também foi afetada pelo nanoZnO, como no teste de umidade e solubilidade as amostras sem aditivação tenderam taxas menores.

Baseado nos resultados obtidos, observa-se que o compósito investigado tem potencial para uso como substitutivo de pele. Os altos valores apresentados de teor de umidade são insuficientes para desestabilizar totalmente o filme. De acordo com os resultados de perda de massa, os compósitos podem manter-se estáveis por tempo considerável.

Visto que o tempo de cicatrização de feridas de primeiro e segundo grau variaram de 1 a 3 semanas, os filmes poderiam ser utilizados nessas situações.

Demonstra-se boa estabilidade nos tratamentos, já que a solubilidade em agitação mecânica foi baixa. Apresenta-se alta capacidade de absorção nos filmes, capacitando-os para absorção do exsudato de feridas úmidas.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se as seguintes etapas para serem desenvolvidas a partir deste trabalho:

- Testes de susceptibilidade a bactérias (Gram +/-) e fungos de interesse clínico. Para esta etapa os testes a serem realizados são os de disco-difusão em ágar e o de microdiluição em caldo. Será possível além de observar se o material apresenta efeito contra microrganismos a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).
- Aumento das concentrações do nanoZnO nos filmes caso as atuais sejam insuficientes para obter efeito contra os microrganismos testados.
- Ensaio mecânicos dos filmes puros e compósitos, para obter os dados sobre resistência e módulo de elasticidade dos filmes e compósitos de quitosana, sobretudo para saber se as características mecânicas são adequadas para uso como substitutivos de pele.
- Aplicação do teste de permeabilidade ao vapor d'água

- A caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) para complementar a de EDS.
- Formulação de blendas em diferentes proporções com o alginato, para comparação das características morfofuncionais entre os compósitos com quitosana e quitosana/alginato. O alginato é um biopolímero, utilizado como revestimentos em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, apresenta-se como um material adequado na formulação de filmes.

Realizadas as etapas acima elencadas, os compósitos que se mostrarem mais adequados poderão seguir para ensaios *in vitro* e *in vivo* com as etapas seguintes:

- Os testes de citotoxicidade poderão ser implementados pelos métodos diretos (MTT e contato em poço). O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT por mitocôndrias de células viáveis, já o teste de contato direto em poço, é baseado na aplicação direta de microamostras em poços de cultura. Os testes serão realizados tanto para os compósitos quanto para o pó de óxido puro.
- Ensaios de hemocompatibilidade poderão ser realizados pelos testes de Hemólise, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).
- Ensaios *in vitro* são essenciais para seguimento do trabalho, ensaios com modelos animais só poderão ser realizados após os resultados *in vitro* mostrarem-se seguros.
- Caso os ensaios *in vitro* revelem-se seguros o material poderá ser testado em ratos, com lesões infligidas, para acompanhamento da cicatrização e proteção contra infecções. Só após todas essas etapas os compósitos seguirão para modelos humanos.
- Para o acompanhamento da cicatrização das lesões *in vivo* (ratos e humanos) é necessária uma população de pelo menos 36 indivíduos, divididos em 6 grupos sendo 3 controles (7, 14 e 21 dias) tratados apenas com soro fisiológico e 3 tratados (7, 14 e 21 dias) com o compósito que apresentou melhor resultado nos testes anteriores, o acompanhamento será pelo tempo de cicatrização em 7, 14 e 21 dias. Para teste em humanos a avaliação irá comparar o tratamento padrão empregado (grupo controle) com a aplicação do substitutivo.

REFERÊNCIAS

- [1] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. **Histologia básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- [2] TORRES, F. S.; BLANES, L.; GALVÃO, T. F.; FERREIRA, L. M. **Manual de prevenção e tratamento de lesões por fricção**. Frank da Silva Torres. São Paulo: 2016.
- [3] THIODEAU, A. G., PATTON, T. Tissues. **Structure and function of the body**. 15^o. ed. ELSEVIER. 2015. C. 4, p. 66.
- [4] MOSER, H.; PEREIRA, R. R.; PEREIRA, M. J. L. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Rev. Bras. Queimaduras**. v. 12, n. 2, p. 60-67, 2013.
- [5] NORBURY, W.; HERNDON, D. N.; TANKSLEY, J.; JESCHKE, M. G.; FINNERTY, C. C. Infection in burns. **Surgical infections**. v.17, n. 2, p. 250-255, 2016.
- [6] SCHAEFER, T. J.; SZYMANSKI, K.D. **Burn evaluation and management**. in: Stat - Pearls publishing. Treasure Island (FL), 2020.
- [7] YE, H.; DE, S. Thermal injury of skin and subcutaneous tissues: A review of experimental approaches and numerical models. **Burns and trauma**. v. 43, n. 5, p. 909-932, 2016.
- [8] KALLIS, P. j.; FRIEDMAN, A. J.; LEV-TOV, H. A guide tissue engineered skin substitutes. **J. Drugs Dermatol**. v. 17, n. 1, p. 57-64, 2018.
- [9] KARTAL, S. P.; ALTUNEL, C. T. **Hot topics in burn injuries**. IntechOpen. 2018.
- [10] VILLANUEVA, E. M.; DIEZ, R. M. A; GONZÁLES, A. J.; PÉREZ, C. J.; ORREGO, M.; PIEHL, L.; TEVES, S.; COPELLO, G. J. Antimicrobial activity of starch hydrogel incorporated with copper nanoparticles. **ACS Appl. Mater. Interfaces**. v. 8, n. 25, p. 16280-16288, 2016.
- [11] HADISI, Z.; NOURMOHAMMADI, J.; NASSIRI, S. M. The antibacterial and anti-inflammatory investigation of lawsonia inermis gelatin starch nano-brous dressing in burn wound. **Int. J. Biol. Macromol**. v. 107, p. 2008-209, 2018.
- [12] PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **Eur. J. Pharm. Biopharma**.v. 97, p. 417-426, 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.08.004.
- [13] PARK, J.; SONG, E.; JEONG, S.; SONG, J.; KIM, H.; KIM, S. Chitosan -based dressing materials for problematic wound management. **Adv. Exp. Med. Biol**.v. 1077, p. 527-537, 2018. DOI:10.1007/978 - 981 - 13 - 0947 - 228.
- [14] STOJKOVSKA, J.; DJURDJEVIC, D.; JANCIC, I.; BUFAN, B.; MILENKOVIC, M.; JANKOVIC, R.; STANKOVIC, V. M. Comparative in vivo evaluation of novel

formulations based on alginate and silver nanoparticles for wound treatments. **J. Biomater. Appl.** v. 39, n. 9, p. 1197-1211, 2018.

[15] STUBBE, B.; MIGNON, A.; DECLERCQ, H.; VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P. Development of gelatin-alginate hydrogels for burn wound treatment. **Macromol. Biosci.** V. 19, n. 18, 2019. DOI: 110.1002/mabi.201900123.

[16] INAL, M.; MULAZIMOGLU, G. Production and characterization of bactericidal wound based on gelatin nano ber. **Int. J. Biol. Macromol.** V. 137, p. 392-404, 2019.

[17] JANG, H.; KIM, Y.; YOO, B.; SEO, Y. wound-healing effects of human dermal components with gelatin dressing. **J. Biomater. appl.** v. 32, n. 6, p. 716-724, 2018. DOI:10.1177/08853282177411758

[18] RAO, M. G.; Akila, P. B. R. A comprehensive review on biopolymers. **Sci. Revs. Chem. Commun.** V.4, n.2, p.61-68, 2014.

[19] ASGHARI, F.; SAMIEI, M.; ADIBKIA, K.; AKBARZADEH, A.; DAVARAN, S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **An international journal.** v. 45, n. 2, p. 185-192, 2016.

[20] TANASE, E. E.; RAPA, M. Biopolymers based on renewable resources - a review. **Sci. Bul. Ser. F. Biotec.** V.18, p.188-195, 2014.

[21] BANO, I.; ASHARD, M.; YASIN, T.; GHOURI, A. M.; YOUNUS, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 102, p.380-383, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>.

[22] Brasil. Ministério da Saúde (DATASUS). **Morbidade por Queimadura**, 2018 [texto na Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/datasus/datasus.php> Acesso em 25 ago. 2018.

[23] PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n.7, p.957-971, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

[24] OLIVEIRA, F. L., SERRA, M. C. V. F. Infecções em queimaduras: revisão. **Rev. Bras. Queimaduras**, v.10, n.3, p.96-99, 2011.

[25] CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress In Polymer Science**, v. 38, n. 3-4, p.584-671, mar. 2013.

[26] NAGEM, H. F.; CAMPI, L. J.; NAGEM, H. D.; FRANCISCONE, P. A. S. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations Implant Journal: Biomaterials And Esthetics**, v. 2, n. 3, p.54-62, jun. 2007

[27] MANO, E. B; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 187 p.

[28] SMITH, P. Past performance of composite pavements. **Highway Research Record**, v. 37, p. 14-30, 1963.

[29] YUNUS, B. R.; SAMPATH, K. T. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Materials science and engineering*. **C. Materials for biological applications**. v. 57, p. 452-463.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>

[30] XIE, H.; CHEN, X.; SHEN, X.; HE, Y.; CHEN, W.; LUO, Q.; GE, W.; YUAN, W.; TANG, X.; HOU, D.; JIANG, D.; WANG, Q.; LIU, Y.; LIU, Q.; LI, K. Preparation of chitosan collagen alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. **International journal of biological macromolecules**. v. 107, p. 93-104, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.142>

[31] CITRON, I.; AMUNDSON, J.; SALUJA, S.; GUILLOUX, A.; JENNY, A.; SCHEFFER, M.; SHRIME, M.; ALONSO, N. Assessing burn care in brazil: Na epidemiologic, cross-sectional, nationwide study. **Surgery**. v. 163, n. 5, p. 115-1172, 2018.

[32] FELIPE, O. L.; RABELLO, A. L.; JÚNIOR, E. N. O.; SANTOS, I. J. B. Quitosana: da Química Básica à Bioengenharia. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 4, p.312-320, 2017.

[33] COLPAS, P. T. **Terapia celular com culturas de fibroblastos associadas ao uso de membranas constituídas de quitosana complexada com polissacarídeos aniônicos em paciente com úlceras cutâneas**. 2015. 1 recurso online (132 p.). Dissertação (Mestrado) - Curso de Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2015.

[34] FOSTER, L. J. R.; HO, S.; HOOK, J.; BASUKI, M.; MARÇAL, H. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. **Plos One**. v. 10, n. 8, 25 ago. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135153>.

[35] HU, Z.; ZHANG, D. Y.; LU, S. T.; LI, P. W.; LI, S. D. Chitosan based composite materials for prospective hemostatic applications. **Mar. Drugs**. v. 16, n. 8, p. 2018

[36] CASTRO, K. C. **Desenvolvimento e Caracterização de um dispositivo à base de Quitosana e Colágeno para potencial aplicação como substituto ósseo**. 2015. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas Instituto de Ciência e Tecnologia Campus Avançado de Poços de Caldas.

[37] KUMAR, P. T. S.; LAKKSHMANAN, V. K.; ANILKUMAR, T. V.; RAMYA, C.; RESHMI, P. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.2618-2629, 23 abr. 2012.

[38] GBENEBOR, O. P.; ADEOSUN, S. O.; LAWAL, G. I.; JUN, S.; OLALEYE, S. A. Acetylation, crystalline and morphological properties of structural polysaccharide

from shrimp exoskeleton. **Engineering Science and Technology, an International Journal**. v. 20, n. 3, p. 1155-1165, 2017. doi: 10.1016/j.jestch.2017.05.002

[39] GATTO, M.; OCHI, D.; PEDROSO, Y. C. M.; SILVA, C. F. Study of chitosan with different degrees of acetylation as cardboard paper coating.

Carbohydrate Polymers. 2019. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.053

[40] SINGH T. P.; CHATLI, M. K.; SAHOO, J. Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology. **J. Food Sci. Technol**. v. 52, n. 5, p. 2530-2543, 2015. doi:10.1007/s13197-014-1318-6

[41] SANMUGAM A. One-Pot Facile Methodology to Synthesize Chitosan-ZnO-Graphene Oxide Hybrid Composites for Better Dye Adsorption and Antibacterial Activity. **Nanomaterials (Basel)**. V. 7, N. 11, 2017.

[42] GOKARNESHAN, N. Review article- Role of Chitosan in Wound Healing - a Review of the Recent Advances. **Juniper journals**. v. 4, n. 3, 2017. DOI:10.19080/GJARM.2017.03.555637.

[43] ZULFIQAR, A. K.; SHAHRIN, J.; AMNA, A.; MUHAMMAD, M. B.; MUHAMMAD, Y. Chitosan based hybrid materials used for wound healing applications - A short review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. v. 69, n. 7, p. 419-436, 2020.

[44] BURKATOVSKAYA, M.; TEGOS, G. P.; SWIETLIK, E.; DEMIDOVA, T. N. P.; CASTANO, A.; HAMBLIN, M. R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. **Biomaterials**. v. 27, n. 22, p. 4157-4164, 2006.

[45] ZHANG, Y. J.; GAO, B.; LIU, X. W. Medicamentos hemostáticos tópicos e eficazes no campo de batalha. **Int J Clin Exp Med**. v. 8, n. 1, p. 10-19, 2015.

[46] BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**. v. 25, n. 1, 2019.

[47] MAYRINCK, C.; RAPHAEL, E.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. A. Síntese, propriedades e aplicações de óxido de zinco nanoestruturado. **Rev. Virtual Quim**, v. 6, n. 5, p.1185-1204, 2014.

[48] HADIA, N. M. A.; GARCÍA-GRANDA, S.; GARCÍA, J. R. Effect of the Temperature on Structural and Optical Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**. v. 14, n. 7, p.5443-5448, 2014. American Scientific Publishers. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.8861>.

[49] CHAITHANATKUN, N.; ONLAOR, K.; TUNHOO, B. The Influence of Annealing Temperature on Structural Properties of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized by Precipitation Method. **Key Engineering Materials**. v. 728, p.215-220, jan. 2017. Trans Tech Publications. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.728.215>.

- [50] SILVA, R. F. **Filmes de óxido de zinco dopado com alumínio ou európio: preparação e caracterização**. 2001. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2001. doi:10.11606/T. 59.2001.tde-01022002-114630. Acesso em: 2018-12-01.
- [51] DA SILVA, B.; CAETANO, B.; CHIARI, A. O. B.; PIETRO, R.; CHIAVACCI, L. Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 1, n. 177, p. 440-447, 2019. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.013.
- [52] SIDIQ, K. S. S.; RAHMAN, A.; TAJUDDIN, HUSEN, A. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. **nanoscale res lett.** v. 13, n. 141, p.643-646, 2018.
- [53] ESPITIA, P.; SOARES, N.; COIMBRA, J.; ANDRADE, N.; CRUZ, R.; MEDEIROS, E. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, 2012. doi.10.1007/s11947-012-0797-6.
- [54] YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **International Journal Of Inorganic Materials**. v. 3, n. 7, p. 643-646, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1466-6049\(01\)00197-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1466-6049(01)00197-0).
- [55] RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Langmuir**. v. 27, n. 7, p.4020 - 4028, 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la104825u>.
- [56] SILVA, L. S.; MONTEIRO, M. S. S. B. Avaliação da Segurança de Nanopartículas de Dióxido de Titânio e Óxido de Zinco em Formulações Antissolares Silva. **Rev. Virtual Quim**. v. 8, n. 6, p. 1963-1977, 2016.
- [57] MONTEIRO-RIVIERE N.A.; WIENCH, K.; LANDSIEDEL, R.; SCHULTE, S.; IN MAN, A. O.; RIVIERE, J. E.; Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. **Toxicol Sci**. v. 123, n. 1, p. 264-280, 2011.
- [58] VANDEBRIEL, R. J.; DE JONG, W. H. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. **Nanotechnology, science and applications**. v. 5, p. 61-71, 2012. <https://doi.org/10.2147/NSA.S23932> Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 177, 2019. doi.10.1016/j.colsurfb.2019.02.013.
- [59] SAHU, D.; KANNAN, G. M.; VIJAYARAGHAVAN, R.; ANAND, T.; KHANUM, F. Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. **ISRN Toxicol**. V. 2013, n. 316075, 2013. doi:10.1155/2013/316075
- [60] SRUTHI, S.; ASHTAMI, J.; MOHANAN, P.V. Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. **Materials Today Chemistry**. v. 10, p. 175-186, 2018. Doi.10.1016/j.mtchem.2018.09.008.

- [61] LIU, J.; KANG, Y.; YIN, S.; SONG, B.; WEI, L.; CHEN, L.; SHAO, L. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. **Int J Nanomedicine**. v. 12:8085-8099, 2017. <https://doi.org/10.2147/IJN.S149070>
- [62] VALDIGLESIAS, V.; COSTA, C.; KILIÇ, G.; COSTA, S.; PÁSARO, E.; LAFFON, B.; TEIXEIRA, J. P. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. **Environment international**. v. 55, p. 92-100, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.02.013>
- [63] SANTOS, A. M. P.; SANTOS, E. J. P. Pre-heating temperature dependence of the c-axis orientation of ZnO thin films. **Thin Solid Films**. v. 516, n. 18, p. 6210-6214, 2008.
- [64] LIMA JUNIOR, R. G.; VINHAS, G. V.; SOUTO-MAIOR, R. M.; SANTOS, A. M. P.; SANTOS, E. J. P.; ALMEIDA, Y. M. B. Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de Poli(3-hidroxibutirato) aditivado com ZnOnano, **Brazilian journal of food technology**. v. 19, 2016.
- [65] Arroyo, B. J.; Bezerra, A. C.; Oliveira, L.L.; Arroyo, S. J.; Melo, E. A. d.; Santos, M. P. Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.), **Food Chemistry** (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125566>
- [66] VASCONCELOS, M. O. P. **Filmes bioativos de quitosana e suas blendas aditivadas com nanoZnO: Produção e caracterização 2016. (66 p.)**. Dissertação (Mestrado)- Curso de ciência de tecnologia de alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- [67] CARNAVAL, L. S. C. **Potencial aplicação do extrato de resíduo de seringueira (*Spondias purpurea* L.)/nanoZnO em filmes ativos à base de resíduo de mandioca**. 2019.(145 p.). Dissertação (Mestrado) - Curso de ciência de tecnologia de alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.
- [68] GOODARZI, P.; FALAHZADEH, K.; NEMATIZADEH, M.; FARAZANDEH, P.; PAYAB, M.; LARIJANI, B.; TAYANLOO, B. A.; ARJMAND, B. Tissue Engineered Skin Substitutes. **Adv Exp Med Biol**. v. 1107, p. 143-188, 2018. doi:10.1007/5584-2018-226
- [69] HALIM, A. S.; KHOO, T. L.; MOHD, Y. S. J. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. **Indian J Plast Surg**. **43**, p. 23-S28, 2010. doi:10.4103/0970-0358.70712
- [70] FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA, N. N.; SANTOS, G. B. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 26, n. 4, p. 696-702. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752011000400028>
- [71] REIS, A. C.; ABRANTES, M. G.; DINO, T. S.; SOARES, V. S.; GAMA, A. C. A as- sepsia no controle das infecções hospitalares: uma responsabilidade dos profissionais de saúde. **Rev. interdisc. Pens. Cint**. v. 4, n.1, p. 2018.

[72] JESCHKE, M. G.; KAMOLZ, L. P.; SHAHROKHI, S. **Burn care and treatment: a practice guide**. Ed. 2, international publishing. 2020.

[73] ONOFRE, N. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

[74] GOODARZI, P.; FALAHZADEH, K. NEMATIZADEH, M.; FARAZANDEH, P.; PAYAB, M. LARIJANI, B.; ARJMAND, B. Tissue Engineering skin substitutes. **Adv Exp Med Biol**. V. 1107, n.2, p. 143-188, 2018.

[75] ERASMUS, M. E., JONKMAN, M. F. Water vapour permeance: a meaningful measure for water vapour permeability of wound coverings. **Burns**. v. 15, n. 6, p. 371- 375, 1989 doi:10.1016/0305-4179(89)90101-0

[76] NANGIA, A., GAMBHIR, R., MAIBACH, H. Factors influencing the performance of temporary skin substitutes. **Clinical Materials**. v. 7, n. 1, p. 3 - 13, 1991. doi:10.1016/0267- 6605(91)90050-p

[77] SANTOS, S. N. C., GONCALVES, D. Variations in wettability on heat-treated wood surfaces: Contact angles and surface free energy. **Maderas, Cienc.Tecnol**. v. 18, n. 2, pp.383 - 394, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000035>.

[78] SPIELMANN, H., HOFFMANN, S., LIEBSCH, M., BOTHAM, P., FENTEM, J. H., ESKES, C., ROGUET, R., COTOVIO, J., COLE, T., WORTH, A., HEYLINGS, J., JONES, P., ROBLES, C., KANDÁROVÁ, H., GAMER, A., REMMELE, M., CURREN, R., RAABE, H., COCKSHOT, A., GERNER, I., ZUANG, V. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPI-SKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. **Altern Lab Anim**. v. 35, n. 6, p. 559-601, 2007

[79] SHEIKHOLESLAM, M.; WRIGHT, M. E. E.; JESCHKE, M. G.; AMININIK, S. Biomaterials for Skin Substitutes. **Adv Healthc Mater**. v. 7, n. 5, 2018. doi:10.1002/adhm.201700897

[80] Amer, A. M.; Maksoud A. A. E. I.; Abdeen, M. A.; Hamdy, A.; M. H. A.; Amer, M. M.; El-Sanousi, A. A. Potency Of Titanium Dioxide Nanoparticles On Skin Wound Healing In Rats. **RJPBCS**. V. 9, n. 6, p.909-923, 2018)

[81] HANSA, I.; SCHOENBRUNNER, A. R.; KRAFT, C. T.; JANIS, J. E. Silver in Wound Care - Friend or Foe: A Comprehensive Review. *Plastic and reconstructive surgery*. **Global open**. v. 7, n. 8, 2019 doi.org/10.1097/GOX.0000000000002390

[82] SANTOS, P. C. **Nanopartículas: toxicidade biológica**. 2015. (55 p.). TCC (Graduação) - Curso de graduação em farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

[83] INTEGRA SKINS GRASS USE Disponível em: <http://www.ilstraining.com/idrt/idrt/brs:it04.html> Acesso em: 08 mar. 2018.

- [84] Biobrane, Woundsource. Disponível em: <https://www.woundsource.com/product/biobrane> Acesso em: 05 set. 2018.
- [85] FARROHA, A.; FREW, Q. The Use of Biobrane® to Dress Split-Thickness Skin Graft in Paediatric Burns. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v.26, n.2, p.94 - 97, 2013.
- [86] BARNEA, Y., WEISS, J., GUR, E. Uma revisão das aplicações do curativo de hidrofibra com prata (Aquacel Ag) no cuidado de feridas. **Terapêutica e gestão de risco clínico**. v. 6, p. 21-27, 2010.
- [87] ABBASIPOUR, M., MIRJALILI, M., KHAJAVI, R., MAJIDI, M. M. Coated Cotton Gauze with Ag/ZnO/chitosan Nanocomposite as a Modern Wound Dressing. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**. 2014. <https://doi.org/10.1177/155892501400900114>
- [88] QIU, B., XU, X., DENG, R., XIA, G., SHANG, X., ZHOU, P. Construction of chitosan/ZnO nanocomposite Im by in situ precipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2018 doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.084
- [89] LU, Z., GAO, J., HE, Q., WU, J., LIANG, D., YANG, H., CHEN, R. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing. **Carbohydrate Polymers**. v. 156, p. 460 - 469, 2017. doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.051
- [90] BALAURE, P. C.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds. **Int J Pharm**.v. 557, p. 199-207, 2019. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.063
- [91] NARAYANAN, P. M.; WILSON, W. S.; ABRAHAM, A. T.; SEVANAN, M. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against Human Pathogens. **Bionanoscience**. v. 2, n. 4, p.329-335, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12668-012-0061-6>.
- [92] SILVA J. A. C.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B.; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES-FILHO, M. O. Perfil dos pacientes atendidos por queimaduras em um hospital de referência no norte do Brasil. **Rev. Bras. Queimaduras**, v.14, n.3, p. 198-202,2015
- [93] CRUZ, B. F., CORDOVIL, P. B. L., BATISTA, K. N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Rev. Bras. Queimaduras**. v 11, n.4, p. 246-250, 2012.
- [94] GOMES, D. R., SERRA, M. C; GUIMARÃES, L. M. **Condutas na internação**. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.
- [95] SAAVEDRA, P.; BRITO, E. S.; AREDA, C. A.; ESCALDA, P. M. F.; GALATO, D. W. Burns in the brazilian unni ed health system: a review of hospitalization from 2008 to 2017. **Burns and trauma**. v. 9, n. 5, p. 88-98, 2019.

- [96] JAEGER, M. R. O.; FERREIRA, L. M.; FALCÃO, P. T.; ELY, B. P.; CHEM, E. Alostroplante de pele como alternativa para o tratamento da queimadura dolorosa da criança. **Rev. Bras. Queimaduras**, v. 14, n.1, p. 54-58, 2015.
- [97] FALEIROS, T. **Análise crítica do uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos em pacientes queimados internados no hospital das clínicas de Uberlândia**. 2016. 115f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2018.
- [98] HENRIQUE, D. M.; SILVA, L. D.; COSTA, A. C. R.; REZENDE, A. P. M. B.; MENEZES, M. M.; MAURER, T. C. Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura. **Rev. Bras. Queimaduras**, v.12, n.4, p. 230-234, 2013.
- [99] World Health Organization. Facts about injuries: burn. Disponível em: www.who.int/mipfiles/2014/burns1.pdf, Acesso em: 30/08/2010
- [100] CHAVES, S. C. S. Ações da enfermagem para reduzir os riscos de infecção em grande queimado no CTI. **Rev. Bras. Queimaduras**, v. 12, n.3,p.140-144, 2013.
- [101] SIMÕES, L. R. N. V. **Infecção fúngica em doentes queimados**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biologia Aplicada, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.
- [102] HODLE, A. E.; RICHTER, K. P.; THOMPSON, R. M. Infection Control Practices in U.S. Burn Units. **Journal Of Burn Care & Research**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.142-151, mar. 2006.
- [103] VICKERS, M. L.; DULHUNTY, J. M.; BALLARD, E.; CHAMPMAN, P.; MULLER, M. Risk factors for multidrug-resistant Gram-negative infection in burn patients. **AZN J. surg**. v. 88, n. 5, 2017.
- [104] MATTHAIU, K. D. Candida burns wound sepsis: the holy trinity of management. **intensive and critical care nursing**, 2018.
- [105] MUXIKA, A.; ETXEBERRIA, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. n. 105, 2017. 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.
- [106] WANG, HO.; QIAN, J.; DING, F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 66, 2017. 10.1021/acs.jafc.7b04528.
- [107] WU, J.; ZHANG, L. Dissolution behavior and conformation change of chitosan in concentrated chitosan hydrochloric acid solution and comparison with dilute and semi dilute solutions. **int j. bio. Macrol**. v. 121, p.1101-1108, 2019.
- [108] ROLIM, A. E. H.; CARVALHO, F. A. A.; COSTA, R. C. C.; ROSA, F. P. **Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo**. Revista Virtual de Química, v. 10, n. 2, p.211-228, abr. 2018.

[109] FIAMINGO, A. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de carboximetil quitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em engenharia de tecidos**. 2016. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

[110] RODRIGUES, Ana Paula. **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E ALGINATO PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA DE LESÕES**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

[111] Fernandes, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana qui tosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. Dissertação (Mestrado em ciências). Rio de Janeiro, julho de 2009.

[112] ASSIS, O. B. G.; VALMIR, L. D. S. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes nos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**. 2003, vol.13, n.4, pp.223-228.

[113] CORRELO, V. M.; PINHO, E. D.; IVA, P.; MRINAL, B.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. Water Absorption and Degradation Characteristics of Chitosan-Based Polyesters and Hydroxyapatite Composites. **Macromolecular Bioscience**. v. 7, n. 3, p.354-363, 8 mar. 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200600233>.

[114] KIM, K. M.; SON, J. H.; KIM, S. K.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. **Journal Of Food Science**. v. 71, n. 3, p.119-124, 30 jun. 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.13652621.2006.tb15624.x>.

[115] WANG, X.; LOU, T.; ZHAO, W.; SONG, G. Preparation of pure chitosan film using ternary solvents and its super absorbency. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p.253-257, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.081>.

[116] SANTOS, M.C.; CIRILO, A.T.O.; NUNES, M.L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão "Saburica" (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**. v.7, n.9, p.1-4, 2011.

[117] ABREU, F. O. M. S.; CAVALCANTI, L. G.; DOUDEMANT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO, A. P. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exo-esqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. **Polímeros**. v. 23, n. 5, p.630-635, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2013.042>.

[118] MOURA, C. M.; MOURA, J. M.; SOARES, L. N.; PINTO, L. A. A. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**. v. 50, n. 4, p.351-355, abr. 2011.

[119] YOUNES, I.; SELLIME, S.; RINAUDO, M.; JELLOULLI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on

antibacterial and antifungal activities. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 185, p.57-63, ago. 2014.

[120] Homez-Jara, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUNOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International journal of biological macromolecules**. v. 113, p. 1233-1240, 2018.

[121] CUI, L.; GAO, S. S.; XIAOMING, H. L.; DONG, H.; LIU, J.; CHEN, F.; YU, S. Preparation and characterization of chitosan membranes. **RSC Advances**. v. 8, p. 28433- 28439, 2018.

[122] PINTO, E. P.; TAVARES, W. S.; MATOS, R. S.; FERREIRA, A. M.; MANEZES, P. R.; COSTA, M. E.; SOUZA, T. M.; FERREIRA, I. M.; SOUZA, F. B. O.; ZAMORA, R. R. M. Influence of low and high glycerol concentrations on wettability and exibility of chitosans bio films. **quim. nova**. v. 41, n. 10, 2018.

[123] LEE, KEANCHUAN, L.; GUAN, B. H.; ZAID, H. M.; SOLEIMANI, H. Impact of temperature on zinc oxide particle size by using sol-gel process. **Aip Conference Proceedings**. 2014. AIP Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4898521>.

[124] KOUTU, V.; SHASTRI, L.; MALIK, M. M. Effect of temperature gradient on zinc oxide nanoparticles synthesized at low reaction temperatures. **Materials Research Express**. v. 4, n. 3, p.035011-0, 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/2053-1591/aa5855>.

[125] MAIA, G. A. R.; LARSSON, L. F. G.; VIOMAR, A.; MAIA, E. C. R.; SANTANA, H.; RODRIGUES, P. R. P. Aperfeiçoamento da produção de partículas de óxido de zinco para aplicação em células solares. **Cerâmica**. vol. 62, n.361, p.91-97, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0366-69132016623611949>.

[126] PHOLNAK, C.; SIRISATHITKUL, C.; SUWANBOON, S.; HARDING, J. D. Effects of precursor concentration and reaction time on sonochemically synthesized ZnO nanoparticles. **Materials Research**. v. 17, n. 2, p.405-411, 3 dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-14392013005000192>.

[127] WASLY, H. S.; SADEK, M. S. A.; HENINI, M.; Influence of reaction time and synthesis temperature on the physical properties of ZnO nanoparticles synthesized by the hydrothermal method. **Applied physics**. V. 124, n. 76, 2018.

[128] SHAIKH, R. S.; RAVANGAVE, L. S. Effect of Reaction Time on Some characterization of ZnO Nanoparticles. **Res. J. Of Science and Engineering**. p. 187-191, ago. 2018.

[129] HASSAM, S. H.; KASHYOUT, A. B.; SOLIMAN, H. M. A.; UOSIF, M. A.; AFIFY, N. Influence of Reaction Time, Reducing Agent and Zinc Precursors on the morphological Structures of Zinc Oxide. **Int. j. of the Assoc. for Anglo-American Stud.** v. 1, n. 1, 2013.

[130] RANI, A. R.; ZOOLFAKAR, A. S.; SABRI, W. S. W. M.; ALROKAYAN, S. KHAN, H. A. RUSOP, M. Influence of the precursor and annealing temperature on the hydrothermal growth of ZnO nanostructures. **Iop Conference Series: Materials**

Science and Engineering. v. 380, 2018. IOP Publishing.
<http://dx.doi.org/10.1088/1757-899x/380/1/012018>.

[131] GUSATTI, M.; BARROSO, G. S.; CAMPOS, C. E. M.; SOUZA, D. A. R.; ROSÁRIO, J. A.; LIMA, R. B.; MILIOLI, C. C.; SILVA, L. A.; RIELLA, H. G.; KUHNEN, N, C. Effect of different precursors in the chemical synthesis of ZnO nanocrystals. **Materials Research**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.264-267, 27 maio 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-14392011005000035>.

[132] SINDHU, H. S.; JOISHY, S.; RAJENDRA, B. V.; BABU, P. D. Influence of Precursor Solution Concentration on Structure and Magnetic Properties of Zinc Oxide Thin Films. **Key Engineering Materials**. v. 724, p.43-47, 2016. Trans Tech Publications. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.724.43>.

[133] HUANG, Z. B.; ZOU, X. P.; YANG, G. Q.; LV, X. M.; WEI, C. L.; SUN, Z.; ZHOU, H. Q.; ZHANG, B. L. Influence of Precursor Solution Concentration on Zinc Oxide Nanostructures by Hydrothermal Growth. **Advanced Materials Research**. v. 875-877, p.562-566, 2014. Trans Tech Publications.
<http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.875-877.562>

[134] SAIDANI, T.; ZAABAT, M.; AIDA, M. S.; BARILLE, R.; RASHEED, M.; ALMOHA-MED, Y. Influence of precursor source on sol-gel deposited ZnO thin films properties. **Journal Of Materials Science: Materials in Electronics**. v. 28, n. 13, p.9252-9257, 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10854-017-6660-9>.

[135] AVRAMESCU, M. L.; RASMUSSEN, P. E.; CHENIER, M.; GARDNER, H. D. Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 24, n. 2, p.1553-1564, 26 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7932-2>

[136] JIANFENG, J.; HAO, A.; WANG, G.; HE, X.; ZHANG, W.; CHEN, Q. The study of different pH values on morphology of ZnO nanoparticles via sol-gel technology. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 6, n. 6, p.1676-1680, 2014.

[137] SWAROOP, K.; SOMASHEKARAPPA, H. M. Effect of pH values on surface Morphology and Particle size variation in ZnO Nanoparticles Synthesised by co-precipitation Method. **Res. J. Recent Sci**. V. 4, P. 197-201, 2015.

[138] Rahman, P.; Mujeeb, V. M.; Muraleedharan, K.; Thomas, S. Chitosan/nano ZnO composite films: Enhanced mechanical, antimicrobial and dielectric properties. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 11, 2016.

[139] TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G. Propriedades mecânicas e de barreira de filmes de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio e/ou cloreto de cálcio. **Braz. J. Food Technol**. Campinas, v. 14, n. 2, p. 82-90, 2011.

[140] CHINAGLIA, C. R.; CORREA, C. A. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FALHAS EM MATERIAIS ATRAVÉS DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE MICROSCOPIA. **Polímeros**. São Carlos, v. 7, n. 3, p. 19-23, 1997.

- [141] GOMES, D. N. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE ALGINATO INCORPORADOS COM EXTRATOS DE ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE SUBSTITUTO TEMPORÁRIO DE PELE**. 2016. 104 f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Biomédica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- [142] KARIME, N.; ALIZADEH, A.; ALMASI, H.; HANIFIAN, S. Preparation and characterization of whey protein isolate/polydextrose-based nanocomposite film incorporated with cellulose nano ber and *L. plantarum*: A new probiotic active packaging system. **LWT**. V. 121, 2019.
- [143] FERREIRA, RITA C. R.; SIQUEIRA, JOÃO R. C. **PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS VIA MÉTODO TAGUCHI: UMA APLICAÇÃO NO PROCESSO DE CROMAÇÃO DE ANÉIS**. 2011. 9 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia da Produção, Escola Federal de Engenharia de Itajubá, Itajubá, 2011.
- [144] MINITAB INC. (Org.). O que é ANOVA? 2017. Disponível em:<<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.
- [145] FERNANDES, E. M. G. P. **Testes às médias das distribuições**. In: FERNANDES, E. M. G. P. **ESTATÍSTICA APLICADA**. Braga: Universidade do Minho, 1999. Cap. 7. p. 111-153
- [146] PORTAL ACTION. ANOVA. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/anova>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- [147] MINITAB INC. (Org.). Somas de quadrados 2017. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/anova-statistics/understanding-sums-of-squares/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.
- [148] RAO, R. G.; PADMANABHAN, G. Application of Taguchi methods and ANOVA in optimization of process parameters for metal removal rate in electrochemical machining of Al/5%SiC composites. **Int. J. of Eng. Res. and App.** v. 2, n. 3, p. 192 – 197, 2012.
- [149] PORTAL ACTION. Anova dois fatores. Disponível em:<<http://www.portalaction.com.br/anova/anova-dois-fatores>> Acesso em: 14 jan. 2019.
- [150] SHAHMOHAMMADI, J. F., ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**.v. 149, p. 8 - 19, 2016. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.089
- [151] YI, DY et al. development of biopolymer film with different ratios of gelatine to chitosan reinforced with zinc oxid nanoparticles for food covering. **J IOP Mater sci and engineer**, 429. Nov, 2018.
- [152] AMJADI, S., EMAMINIA, S., DAVUDIAN, S. H., POURMOHAMMAD, S., HAMISHEHKAR, H., ROUFEGARINEJAD, L. Preparation and characterization of

gelatin-based nanocomposite containing chitosan nano ber and ZnO nanoparticles. **J. Carbo. Polymers**. v. 216, p. 376-384, 2019.

[153] SALEVIC, A.; PRIETO, C.; CABEDO, L.; NEDOVIC, V.; LAGARON, J. M. physico-chemical, antioxidant and antimicrobial properties of electrospun poly (ε-caprolactone) fillms containing a solid dispersion of sage (salvia o cinalis l.) Extract. **Nanomaterials (Basel)**. V. 9, N. 2, 2019. doi:10.3390/nano9020270.

[154] LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, G. C.; JEAN, C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripofosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim nova**. v. 29, P. 34-39. 2005.

[155] CUI, J.; YU, Z.; LAU, D. Effect of Acetyl Group on Mechanical Properties of Chi- tin/Chitosan Nanocrystal: A Molecular Dynamics Study. **Int. J. Mol. Sci**. 2016, v.17, n.61.

[156] FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. 63 p. TCC. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2010.

[157] VEIGA, I. G. **Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios**. 2012. 145 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

[158] BRIANEZI, S. F. S.; CASTRO, K. C.; PIAZZA, R. D.; MELO, M. S. F.; PEREIRA, R. M.; MARQUES, R. F. C.; CAMPOS, M. G. N. Preparation and Characterization of Chitosan/mPEG PCL Blended Membranes for Wound Dressing and Controlled Gentamicin Release. **Mat. Res**. vol.21, n. 6, 2018.

[159] LIMA, M. M.; CARNEIRO, L. C.; BIANCHINI, D.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE, C.; MOREIRA, A. S. Structural, thermal, physical, mechanical, and barrier properties of chitosan films with the addition of xanthan gum. **J. of food. Science** vol.82, n.3, p. 698-705, 2017.

[160] LLANOS, J. R.; VERCİK, L. C. O.; VERCİK, A. Physical properties of chitosan films obtained after neutralization of polycation by slow drip method. **J. of biomater. and nanobiotec**. v. 6, p. 27-291, 2015.

[161] Dallan, P. R. M. **Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele**. 2005. 212f. Tese (Doutorado em Engenharia Química).

[162] Melin, G. R. **Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**. 2013. Projeto de graduação (Graduação em engenharia de materiais). São Paulo, 2013.

[163] WANG, Y. et al. Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nanoZnO composite nano brous membranes. *Food Chemistry*, v. 132, n. 1, p.419-427, maio 2016.

[164] XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, P.; JIN, T. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 7, p.2325-2331, 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02149-10>.

[165] ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-Mechanical Characterization and Antimicrobial Properties of Fish Protein Isolate/Fish Skin Gelatin-Zinc Oxide (ZnO) Nanocomposite Films. **Food Bioprocess Technol.** v. 9, p. 101-112, 2016.

[166] SHAHMOHAMMADI, J. F.; ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers.** v. 149, p. 8-19. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.089

[167] TOLKINE, J. R. R. **O senhor dos anéis**. Brasil: Editora Harper Collins Brasil; 1ª edição (25 novembro 2019).