



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS (*P²CEM*)

P²CEM

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS BIOATIVAS BASEADAS EM
QUITOSANA E HÍBRIDOS DE ZnO/Ag OU ZnO/Ag₂O.

MÁRIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2024

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS BIOATIVAS BASEADAS EM
QUITOSANA E HÍBRIDOS DE ZnO/Ag OU ZnO/Ag₂O.

MÁRIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS EDUARDO ALMEIDA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GEORGE RICARDO SANTANA ANDRADE

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586p Silva, Mário Rodrigues da

Produção e caracterização de membranas bioativas baseadas em quitosana e híbridos de ZnO/Ag ou ZnO/Ag₂O / Mário Rodrigues da Silva; orientador Luís Eduardo Almeida. - São Cristóvão, 2024.
155 f. : il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Biocompatibilidade. 2. Cicatrização de ferimentos. 3. Materiais biomédicos. I. Almeida, Luís Eduardo orient. II. Título.

CDU 66.017:61

Mário Rodrigues Pereira da Silva

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

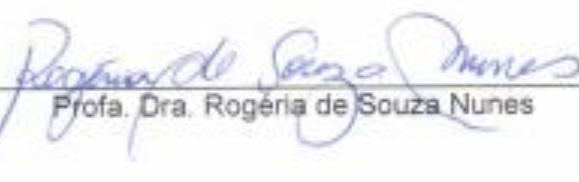
Aprovada por:



Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida



Profa. Dra. Patrícia Severino



Profa. Dra. Rogéria de Souza Nunes



Profa. Dra. Iara de Fátima Gimenez



Prof. Dr. Marcelo Massayoshi Ueki

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL.

Fevereiro/2024

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Nam-Myoho-Rengue-Kyo

Nitiren Daishonin

DEDICATORIA

Dedico essa tese

Ao meu avô Antônio Ferreira Rodrigues pela força e pelo aprendizado, aos meus queridos pais Amaro José da Silva e Leonice Pereira Rodrigues da Silva pelo amor, carinho, apoio e incentivo.

Ao povo forte do sertão.

AGRADECIMENTO

Agradeço,

- *À primeiramente à Deus e ao mestre amado Jesus, pelo sopro divino de vida, o qual me permite viver diversas experiências e conceder está cercado por pessoas tão especiais e amorosas. Agradeço toda proteção, amparo, apoio, carinho e pelas lições constantes que recebo.*
- *Aos meus queridos pais Amaro José da Silva e Leonice Pereira Rodrigues da Silva pelo amor, carinho, apoio e incentivo. A minha irmã Maryelli Rodrigues por ser essa pessoa forte e por todo carinho. Aos meus avôs e avós, tios e tias, primos e primas em nome toda a minha família pelo companheirismo e apoio.*
- *Ao meu Orientador e amigo Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida, expresso minha profunda gratidão por sua orientação incansável ao longo deste período. Sua sabedoria, paciência e apoio foram fundamentais para o sucesso desta jornada acadêmica. Sou imensamente grato por ter um orientador tão dedicado e inspirador. Obrigado por ser uma fonte constante de orientação e motivação.*
- *Ao meu Co-orientador e amigo Prof. Dr. George Ricardo Santana Andrade, gostaria de expressar minha sincera gratidão pela valiosa contribuição que você trouxe ao meu trabalho de pesquisa. Sua orientação complementar, insights perspicazes e apoio constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Estou extremamente grato por ter um coorientador tão dedicado e colaborativo. Obrigado por sua influência positiva e orientação ao longo desta jornada acadêmica.*
- *Caros Professores do P²CEM, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos vocês que, de maneira direta e indireta, contribuíram para o desenvolvimento da minha tese. Seus ensinamentos, orientações e apoio foram cruciais para moldar meu trabalho e enriquecer meu conhecimento. Agradeço sinceramente por compartilharem sua expertise e dedicarem seu tempo ao meu crescimento acadêmico. Cada um de vocês desempenhou um papel valioso, e estou extremamente grato por fazer parte desta comunidade acadêmica excepcional. Em*

especial, agradeço ao Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos, Prof. Dra. Rosane Maria Pessoa Betanio Oliveira, Prof. Dra. Cristiane Xavier Resende, Prof. Dr. Carlos Otavio Damas Martins, Prof. Dr. Sandro Griza, Prof. Dr. Marcelo Massayoshi Ueki, Prof. Dr. Eduardo Kirinus Tentardini, Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Junior, Prof. Dr. Wilton Walter Batista e Prof. Dra. Iara de Fátima Gimenez.

- *Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica – UFS, gostaria de expressar minha profunda gratidão pelos ensaios biológicos realizados em colaboração com o laboratório. A contribuição valiosa desse grupo, sob a liderança dos Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam, Prof. Dra. Brancilene Araújo Santos e Prof. Dr. Samuel Bruno dos Santos, foi essencial para enriquecer a qualidade e a relevância do meu trabalho. Agradeço sinceramente pelo comprometimento, expertise e dedicação de cada membro do grupo, que desempenhou um papel crucial no sucesso deste projeto.*
- *Ao Prof. Dr. Robbert Saraiva Matos e ao doutorando Michael D. S. Monteiro, gostaria de expressar minha sincera gratidão por todas as contribuições acadêmicas, amizade e parceria ao longo deste percurso. Suas orientações e insights foram fundamentais para o enriquecimento do meu trabalho, e a amizade compartilhada tornou essa jornada ainda mais significativa. Agradeço pelo comprometimento, sabedoria e colaboração que ambos trouxeram ao nosso convívio acadêmico. Estou verdadeiramente grato por contar com mentores tão dedicados e parceiros tão inspiradores.*
- *Aos meus amigos do P²CEM e laboratório QUIBIOM com Paulo Henrique (Ph), Diego (Irmão), Lucas Santana (Galeguinho da Parnaíba), Raimundo (pai veio), Franciely da Paz, Rogerio de Jesus, João Barros, Hericles, Gabriela (Gabi), Micheline, Euler, Reinam Thiago e Marcos (Marcão) e aos alunos de ICs que contribuíram bastante neste trabalho.*
- *Aos amigos do Instituto Palmas Ana Cristina, Claumir Araújo, Juan Priegui e Everardo Aguiar, Rodrigo Lucio e Brenda, Professor Adriano Reis, Alex Diego, Tia Jack, Adeilson (risadinha), minha prima irmã Daniele Atalaia e ao meu irmão Moabes irmão por todos esses anos de conselhos, amizade e iluminação para o meu caminho.*

- *Ao CNPq, CAPES e FAPITEC por todo o apoio e financiamento.*
- *À Prefeitura Municipal de Delmiro Gouveia por todo incentivo enquanto funcionário público da respectiva.*

• **A todos e todas muito obrigado!!!**

RESUMO

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.).

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS BIOATIVAS BASEADAS EM QUITOSANA E HÍBRIDOS DE ZnO/Ag OU ZnO/Ag₂O.

Mário Rodrigues Pereira Da Silva

Fevereiro/2024

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Co-Orientador: Dr. George Ricardo Santana Andrade

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

A pesquisa aborda a problemática global do gerenciamento de feridas, concentrando-se no desenvolvimento de membranas poliméricas eficazes, com ênfase na quitosana (CHI), um polissacarídeo derivado da quitina conhecido por sua não toxicidade e atividade antimicrobiana. A inclusão de glicerol (GLI) como plastificante visa superar a rigidez da CHI. O estudo visa caracterizar e explorar a avaliação biológica *in vitro* de nanopartículas (NPs) de óxido de zinco (ZnO) conjugadas com NPs de prata (Ag) ou óxido de prata (Ag₂O) em membranas de CHI, com e sem GLI. A síntese sustentável de NPsZnO pelo método sol-gel mediado por amido, seguida pela eficiente conjugação com NPs de Ag ou Ag₂O através de fotorredução e tratamento térmico, resultou em nanohíbridos integrados com sucesso nas membranas CHI/GLI, evidenciando promissoras aplicações. A análise de difratometria de raios X (DRX) sugere as fases dos nanohíbridos e membranas conjugadas com nanomateriais, enquanto as análises morfológicas indicam tamanhos médios de diâmetro de 34 nm para NPsZnO, 8 nm para NPsAg e 6 nm para NPsAg₂O, com formatos predominantemente esféricos. Os resultados das medidas de taxa de transmissão de vapor d'água (TVA, medida em $\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) nas membranas de CHI (67 ± 1), (CHI com 20% de GLI) CHI20 (70 ± 1), (CHI com 20% de GLI com NPsZnO) CHI20ZnO (66 ± 2), (CHI com 20% de GLI com NPsZnOAg) CHI20Ag (78 ± 7) e (CHI com 20% de GLI com NPsZnOAg₂O) CHI20Ag₂O (72 ± 4) mostram valores similares aos de curativos comerciais. Para os nanohíbridos os ensaios biológicos revelam atividade de biocompatibilidade em células macrófagos *J774*, a atividade antidiabética demonstrou inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase, sugerindo propriedades benéficas no controle da diabetes. No que diz respeito à atividade antioxidante, o método do radical livre *2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)* foi empregado, e o nanohíbridos ZnO/Ag₂O se destaca pela maior atividade antioxidante, com valor de IC₅₀ de 183,5 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, foi avaliada a atividade antimicrobiana *in vitro* dos nanohíbridos e das membranas produzidas, revelando potencial eficácia contra cepas gram-positivas e gram-negativas, com destaque para as amostras de membrana CHI/GLI/Ag₂O e o nanohíbrido de ZnO/Ag₂O com maiores halos de inibição contra as cepas testadas, respectivamente. Esses resultados indicam um potencial no auxílio ao processo de cicatrização da pele humana e como biomaterial.

Palavras-chave: biocompatibilidade, cicatrização de feridas, biomateriais, atividade biológica e ecológico.

ABSTRACT

Abstract of Thesis presented to P2CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE MEMBRANES BASED ON CHITOSAN AND ZnO/Ag OR ZnO/Ag₂O HYBRIDS.

Mário Rodrigues Pereira Da Silva

February/2024

Advisor: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Co-advisor: Dr. George Ricardo Santana Andrade

Department: Materials Science and Engineering

The research addresses the global issue of wound management, focusing on the development of effective polymeric membranes with an emphasis on chitosan (CHI), a polysaccharide derived from chitin known for its non-toxicity and antimicrobial activity. The inclusion of glycerol (GLI) as a plasticizer aims to overcome the rigidity of CHI. The study aims to characterize and explore the *in vitro* biological evaluation of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) conjugated with silver nanoparticles (Ag NPs) or silver oxide nanoparticles (Ag₂O NPs) in CHI membranes, with and without GLI. The sustainable synthesis of ZnO NPs by the starch-mediated sol-gel method, followed by efficient conjugation with Ag or Ag₂O NPs through photoreduction and thermal treatment, resulted in successful integration of nanohybrids into CHI/GLI membranes, indicating promising applications. X-ray diffraction (XRD) analysis suggests the phases of nanohybrids and membranes conjugated with nanomaterials, while morphological analyses indicate average diameter sizes of 34 nm for ZnO NPs, 8 nm for Ag NPs, and 6 nm for Ag₂O NPs, predominantly exhibiting spherical shapes. The results of water vapor transmission rate (WVTR, gm⁻²d⁻¹) measurements in CHI membranes (67 ± 1), CHI20 (70 ± 1), CHI20ZnO (66 ± 2), CHI20Ag (78 ± 7), and CHI20Ag₂O (72 ± 4) show values similar to commercial dressings. For the nanohybrids, biological assays have revealed biocompatibility activity in J774 macrophage cells. The antidiabetic activity demonstrated inhibition of α-glucosidase and α-amylase enzymes, suggesting beneficial properties in diabetes control. Regarding antioxidant activity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method was employed, and the ZnO/Ag₂O nanohybrids stand out for their higher antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 183.5 µg/mL. Subsequently, the *in vitro* antimicrobial activity of the nanohybrids and produced membranes was assessed, revealing potential efficacy against both gram-positive and gram-negative strains. Notably, the CHI/GLI/Ag₂O membrane samples and the ZnO/Ag₂O nanohybrid exhibited larger inhibition zones against the tested strains, respectively. These findings suggest potential assistance in the human skin healing process and highlight their suitability as biomaterials.

Keywords: biocompatibility, wound healing, biomaterials, biological activity, ecological.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01.** Diagrama esquemático mostrando as diferenças entre os cuidados 11
convencionais de feridas disponíveis em qualquer clínica e os cuidados
avançados de feridas.
- Figura 02.** Representação da estrutura geral da CHI. 13
- Figura 03.** Espectro de FTIR do xerogel e do amido puro. 51
- Figura 04.** Espectros de FTIR de nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. 52
- Figura 05.** Espectro de UV-Vis das NPsZnO a), ZnO/Ag b), ZnO/Ag₂O c) e a energia 54
de *gap* óptico (E_g) d).
- Figura 06.** O padrão de difração de DRX do xerogel. 55
- Figura 07.** a) A análise de DRX (Difração de Raios-X) das amostras NPsZnO, NPs 56
ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag₂O, b) A análise de refinamento de *Rietveld* das
ZnONPs, c) NPs ZnO/Ag e d) NPs ZnO/Ag₂O.
- Figura 08.** a) Imagens de MEV b) Imagem do EDS c) Imagem do EDS da amostra do 59
spectro de Zn e d) EDS dos picos de elementos presentes nas NPsZnO.
- Figura 09.** As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET e d) o gráfico do diâmetro das 60
NPsZnO.
- Figura 10.** a) Imagens de MEV e b) Imagem do EDS c) Imagem do EDS do *spectro* de 61
O, d) Zn, e) Ag e f) EDS dos picos de elementos presentes nas NPs ZnO/Ag.
- Figura 11.** a) Imagens de MEV, b) Imagem do EDS, c) Imagem do EDS do *spectro* de 62
O, d)Zn, e)Ag e f) EDS dos picos de elementos presentes nas NPs
ZnO/Ag₂O.
- Figura 12.** As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET das NPsZnO e d) o gráfico do 64
diâmetro médio das NPs ZnO/Ag.

- Figura 13.** As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET e d) o gráfico do diâmetro médio das NPs ZnO/Ag₂O. 65
- Figura 14.** a) MET com sinalizações da estrutura de NPs conjugadas, b) ampliação da imagem a) e c) MET das partículas em dispersão e d) cálculo do diâmetro médio das NPs Ag. 66
- Figura 15.** a) MET com sinalizações da estrutura de NPs conjugadas, b) ampliação da imagem a) e c) MET das partículas em dispersão e d) cálculo do diâmetro médio das NPs Ag₂O. 67
- Figura 16.** a) Análise termogravimétrica TGA/DTG do amido e b) do xerogel produzido. 69
- Figura 17.** Demonstração dos resultados da atividade antimicrobiana das NPs ZnO, NPs ZnO/Ag, NPs ZnO/Ag₂O e a gentamicina controle positivo contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foram identificadas, indicadas por asteriscos (* e ***) que representam níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. 72
- Figura 18.** a) Atividade da amilase, b) Redução da α -amilase, c) Atividade da glucosidase e d) Redução da α -glucose de nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. 75
- Figura 19.** a) Atividade de eliminação de radicais livres e b) Valores de IC₅₀ dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O obtidos pela análise DPPH. 78
- Figura 20.** Aplicação biológica de amostras produzidas a partir dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O com o respectivo teste *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774. 80
- Figura 21.** Apresentação dos valores de IC₅₀ dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O obtidos pela análise de teste *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774. 80

- Figura 22.** Apresentação do ângulo de contato representa como uma gota de líquido interage com a superfície do material nas amostras de CHI a), CHI5 b), CHI10 c) e CHI20 d). 86
- Figura 23.** a) Imagem de MEV, b) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI, c) Imagem em 10 μ m de MEV e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20. 88
- Figura 24.** a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI. 88
- Figura 25.** a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20. 89
- Figura 26.** a) Imagens de MEV em 2500x, b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do *cluster* das NPsZnO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20ZnO. 90
- Figura 27.** a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20ZnO. 90
- Figura 28.** a) Imagens de MEV em 2500x, b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do *cluster* das NPsZnO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20Ag. 91
- Figura 29.** a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20Ag. 91
- Figura 30.** a) Imagens de MEV em 2500x a), b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do cluster das NPsZnO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20Ag₂O. 92
- Figura 31.** a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20Ag₂O. 92
- Figura 32.** Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI. 94

Figura 33.	Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20.	95
Figura 34.	Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20ZnO.	96
Figura 35.	Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20Ag.	97
Figura 36.	Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20Ag ₂ O.	98
Figura 37.	Ângulos de contato representativos de a) CHI20ZnO, b) CHI20Ag e c) CHI20Ag ₂ O.	99
Figura 38.	Os padrões de DRX das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag ₂ O.	101
Figura 39.	PVA das amostras nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag ₂ O. As amostras de membranas possuem simbologia (*) para maior significância pelo teste ANOVA com ($p < 0,05$) ou variação de PVA e (#) para nenhuma significância pelo teste ANOVA com ($p < 0,05$) ou variação (PVA).	103
Figura 40.	Demonstração dos resultados da atividade antimicrobiana das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag ₂ O e a gentamicina controle positivo contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foram identificadas, indicadas por asteriscos (* e ***) que representam níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.	105

LISTA DE TABELA

Tabela 01.	Detalhamento das diferentes amostras de nanohíbridos desenvolvidas neste estudo e suas respectivas nomenclaturas adotadas.	35
Tabela 02.	Detalhamento das amostras de CHI/GLI em variação de porcentagem do plastificante em 0%, 5%, 10% e 20%..	36
Tabela 03.	Detalhamento das amostras de CHI/GLI com e sem os nanohíbridos e sua nomenclatura adotada.	37
Tabela 04.	Informações cristalográficas e parâmetros refinados relevantes dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag ₂ O.	58
Tabela 05.	Apresenta os valores de inibição antimicrobiana específicos para cada cepa testada de CIM ($\mu\text{g/mL}$) nas NPsZnO, NPs ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag ₂ O.	73
Tabela 06.	Detalhando os valores das amostras de CHI, CHI5, CHI10 e CHI20 dos testes mecânicos de tração com o módulo de <i>Young</i> (MPa), tensão (MPa) e deformação de ruptura (%).	84
Tabela 07.	Valores detalhados de ângulo de contato com água das amostras de membranas de CHI, CHI5, CHI10 e CHI20.	85
Tabela 08.	Valores detalhados de ângulo de contato com água das amostras de membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag ₂ O.	99
Tabela 09.	Demonstração dos valores da TVA das amostras nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag, CHI20Ag ₂ O e o TVA de alguns curativos comerciais.	103
Tabela 10.	Apresenta os valores de inibição antimicrobiana específicos para cada cepa testada de CIM nas amostras das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag ₂ O.	106

LISTA DE SIGLAS, NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS

Ag	Prata
Ag ₂ O	Óxido de prata
AgNO ₃	Nitrato de Prata
ALG-e	Alginato de sódio esterificado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Au	Ouro
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute -</i>
CHI	Quitosana
CHI/GLI	Quitosana com glicerol
CuO	Óxido de cobre
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Elétrons
EO	Estresse oxidativo
FDA	<i>Food e Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i>
GLI	Glicerol
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPs	Nanopartículas
NPsAg	Nanopartículas de prata
NPsAg ₂ O	Nanopartículas de óxido de prata
NPsCuO	Nanopartículas óxido de cobre
NPsZnO	Nanopartículas de óxido de zinco

PEG	Polietileno glicol
PEO	Óxido de polietileno
PHB	Poli(3-hidroxiбутирато)
PVA	Permeação a vapor de água
PVP	Polivinilpirrolidona
Rh-B	Rodamina B
ROS	Do inglês <i>reactive oxygen species</i> (com tradução literal, espécies oxigenadas reativas)
TGA	Análise termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato de sódio
TVA	Taxa de transmissão de vapor d'água
UV-vis	Espectroscopia de absorção no UV-visível
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	02
2.	OBJETIVOS	06
2.1.	OBJETIVO GERAL	06
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	06
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
3.1.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	08
3.1.1.	TRATAMENTO PARA QUEIMADURA DO TECIDO EPITELIAL HUMANO	08
3.1.2.	MEMBRANA POLIMÉRICA DE QUITOSANA COMO BIOMATERIAL	12
3.1.3.	NANOMATERIAIS APLICADOS EM BIOMATERIAIS	15
3.2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.2.1.	USO DE ZnO EM APLICAÇÕES BIOLÓGICAS	21
3.2.2.	APLICAÇÕES COMBINADAS DE Ag EM CONTEXTOS BIOLÓGICOS	25
3.2.3.	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS DE CHI	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1.	MATERIAIS	34
4.2.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	34
4.2.1.	PRODUÇÃO DE NPsZnO	34
4.2.2.	PRODUÇÃO DE NANOHÍBRIDOS DE ZnO CONJUGADOS DE Ag OU Ag₂O	34
4.2.3.	PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM CHI, GLI, PVP COM NANOHÍBRIDOS DE ZnO CONJUGADOS DE Ag OU Ag₂O	35

4.3.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	38
4.3.1.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-Vis	38
4.3.2.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTRÔMETRO DE DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)	38
4.3.3.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (FESEM) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	38
4.3.4.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)	39
4.3.5.	PROPRIEDADES MECÂNICAS DE TRAÇÃO	39
4.3.6.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	40
4.3.7.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	40
4.3.8.	ÂNGULO DE CONTATO	40
4.3.9.	PERMEAÇÃO AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)	41
4.4.	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS	42
4.4.1.	SCREENING DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
4.4.2.	TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR	42
4.4.3.	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	43
4.4.4.	TESTE ANTIDIABÉTICO	44
4.4.5.	TESTE ANTIOXIDANTE	45
4.4.6.	CITOTOXICIDADE	46
4.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	SUBCAPÍTULO - CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHÍBRIDOS DE ZnO/Ag OU ZnO/Ag₂O	50
5.1.1.	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS NANOHÍBRIDOS	70
5.1.1.1.	PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DOS NANOHÍBRIDOS	70

5.1.1.2.	TESTE ANTIDIABÉTICO DOS NANOHÍBRIDOS	73
5.1.1.3.	DETERMINAÇÃO PELO MÉTODO DO RADICAL LIVRE 2,2 <i>DIFENIL-1-PRICRIL HIDRAZILA (DPPH)</i> DOS NANOHÍBRIDOS	76
5.1.1.4.	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DOS NANOHÍBRIDOS	78
5.2.	SUBCAPÍTULO - CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CHI COM E SEM NANOHÍBRIDO	82
5.2.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CHI COM PLASTIFICANTE	82
5.2.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM OS NANOHÍBRIDOS	87
5.2.3.	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O	104
5.2.3.1.	PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA NAS AMOSTRAS DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM OS NANOHÍBRIDOS	104
6.	CONCLUSÕES	108
7.	TRABALHOS FUTUROS	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A incidência expressiva de queimaduras na população em geral destaca a complexidade no tratamento de feridas no âmbito da engenharia tecidual. Nesse contexto, evidencia-se uma demanda global constante para o cuidado tanto de feridas agudas quanto crônicas. No momento atual, as feridas representam um obstáculo significativo para a saúde pública devido aos perigos de infecção, complicações e cicatrização insatisfatória. Além disso, as alterações fisiológicas relacionadas à idade e condições como diabetes podem prejudicar os processos de reparação tecidual. Desse modo, os gastos anuais com o tratamento de feridas crônicas estão aumentando devido aos custos com saúde, ao envelhecimento da população e a um aumento significativo na incidência de diabetes e obesidade em todo o mundo. Conseqüentemente, a questão persistente da resistência antimicrobiana e a necessidade de materiais mais eficazes são preocupações críticas a serem abordadas para atender a essa demanda. [1–3].

A engenharia tecidual tem se concentrado no desenvolvimento e estudo de materiais baseados em polímeros naturais, que apresentam características adequadas para a concepção de curativos altamente eficientes. Dentre as características desejáveis, destacam-se a biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta capacidade de absorção de água e oxigênio, propriedades mecânicas de tração (elasticidade), baixa toxicidade e natureza não alergênica. Além disso, os curativos devem apresentar atividade bactericida e antifúngica no local de aplicação, porosidade e, em alguns casos, capacidade de liberar fármacos de forma controlada, a fim de proporcionar condições adequadas para a cicatrização completa [4].

Entre os polímeros utilizados como biocurativos de pele, destaca-se a CHI, um polissacarídeo obtido por meio da desacetilação alcalina da quitina, um polímero abundante encontrado no exoesqueleto de insetos e crustáceos. A CHI possui propriedades como não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, bioatividade e influência na formação de colágeno, que auxilia na reconstrução da pele humana [5,6]. Devido a essas características, a CHI está presente nas farmacopeias de diversos países e é utilizada na

produção de cosméticos, sistemas de liberação de medicamentos, como agente quelante para aumentar a estabilidade de formulações e também como curativo, promovendo o crescimento do tecido e inibindo a formação de fibroses [7,8]. No entanto, o principal desafio envolvendo o uso de membranas de CHI pura para regeneração de tecidos é sua natureza rígida e quebradiça, associada a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares formadas entre suas cadeias. Para superar a rigidez dos materiais à base de CHI, o processo de plastificação é uma ferramenta poderosa. Por exemplo, o uso de GLI como plastificante tem sido amplamente utilizado para melhorar a elasticidade e a estabilidade das membranas de CHI, sendo também interessante devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. No desenvolvimento de materiais para aplicação em cicatrização de feridas, todas essas características são essenciais [9].

A atividade antimicrobiana presente em alguns biopolímeros, como a CHI, exibe um efeito contra uma variedade de agentes patogênicos, abrangendo bactérias e fungos [9,10]. Uma maneira de aumentar essa propriedade é a adição de nanomateriais, como NPs de metais nobres ou de semicondutores, ao polímero desejado. Nanoestruturas híbridas, que combinam um semicondutor de óxido de metal com NPs de metais nobres, têm sido extensivamente estudadas devido ao aprimoramento da atividade antimicrobiana [11–13].

Na busca por tratamentos eficazes, NPs metálicas e de óxido de metal, como Au, Ag e ZnO, têm demonstrado atividade antimicrobiana contra vários agentes infecciosos em baixas concentrações [14,15]. As propriedades físicas e químicas específicas das NPs metálicas são essenciais para sua atividade antimicrobiana [16]. Além disso, a liberação de íons metálicos, como íons Ag^+ , pode promover alterações na permeabilidade da membrana celular através da fixação direta nas superfícies celulares, auxiliando na atividade bactericida [17]. Quanto à produção desses nanomateriais, que se apresentam como uma alternativa para a regeneração epitelial, configuram-se como uma estratégia no contexto do reparo de feridas [18].

A produção de nanomateriais por meio de rotas ambientalmente amigáveis é uma proposta altamente relevante no contexto atual [19,20]. Nesse sentido, a síntese de nanomateriais por rota

verde permite a produção com impacto ambiental reduzido [21]. Essa abordagem contribui para o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente viáveis e abre caminho para a utilização desses nanomateriais em diversos campos, incluindo medicina [22] e energia [17].

Diante do exposto, a presente pesquisa desenvolvida em duas etapas, abordou na primeira, uma rota de síntese verde de híbridos de NPs de óxido zinco com Ag ou Ag₂O utilizando o amido como agente quelante e, na segunda etapa, a incorporação desses híbridos em membranas de CHI a fim de se testar as potencialidades desse material como curativo de pele. A escolha desse tema é justificada pela necessidade de desenvolver novos métodos de síntese que sejam eficientes e sustentáveis para a produção de nanomateriais com propriedades aprimoradas. A síntese das NPs sólidas foi realizada por meio de dois métodos principais: síntese hidrotérmica e fotorredução. Essas abordagens foram selecionadas devido à sua eficácia na obtenção de nanomateriais com características desejadas, como tamanho controlado e distribuição homogênea. Além disso, a pesquisa aborda a influência de parâmetros de síntese nas propriedades físicas e químicas dos nanohíbridos e membranas produzidas. Essa análise sistemática permite um maior entendimento das relações estrutura-propriedade e contribui para o avanço do conhecimento nessa área. Para complementar, foram realizados testes *in vitro* antioxidante, antidiabética e de citotoxicidade dos nanohíbridos, a fim de avaliar sua aplicação, segurança e biocompatibilidade. Além disso, foi conduzido teste *in vitro* de atividade antimicrobiana, com o intuito de explorar o potencial desses nanohíbridos e membranas desenvolvidas.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar nanohíbridos de ZnO/Ag ou ZnO/Ag₂O e conjugar em membrana polimérica de quitosana (CHI).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar as condições de síntese verde das NPsZnO utilizando amido como agente quelante;
- b) Preparar *in situ* as NPsAg ou NPsAg₂O nas NPsZnO através dos métodos de fotorredução e hidrotermal;
- c) Caracterizar as amostras dos nanohíbridos produzidos utilizando técnicas analíticas como UV-Vis, espectroscopia FTIR, EDS, MEV, MET, DRX e TGA.
- d) Avaliar *in vitro* a viabilidade celular em células macrófagos *J774*, teste antioxidante e antidiabético para os nanohíbridos produzidos.
- e) Estabelecer a quantidade necessária de plastificante GLI para produção das membranas poliméricas de CHI.
- f) Incorporar os nanohíbridos produzidos nas membranas de CHI.
- g) Caracterizar fisicoquimicamente as membranas produzidas por diversas técnicas espectroscópicas, térmicas, mecânicas e de imagem.
- h) Testar *in vitro* as propriedades bactericidas das amostras de nanohíbridos e membranas produzidas.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 TRATAMENTO PARA QUEIMADURA DO TECIDO EPITELIAL HUMANO

As lesões cutâneas, incluindo feridas crônicas e traumáticas, representam um desafio médico significativo em escala global, afetando um grande número de pacientes. A prevalência de feridas crônicas tem aumentado devido a fatores como o aumento da incidência de condições médicas, incluindo diabetes tipo 2, doença vascular periférica e síndrome metabólica. Embora os tratamentos para feridas agudas e de pequeno porte sejam geralmente eficazes, o manejo de pacientes com queimaduras extensas, feridas infectadas e feridas crônicas apresenta complicações. A necessidade de cuidados com feridas pós-cirúrgicas e de emergência está em ascensão, impulsionando o contínuo desenvolvimento de procedimentos avançados de cuidados com feridas. No entanto, ainda há muitos aspectos dos mecanismos de reparo de feridas que não são inteiramente compreendidos [2,3].

As feridas crônicas, como úlceras venosas nas pernas, por pressão e nos pés, são caracterizadas por sua heterogeneidade na apresentação e etiologia. Fatores como a atividade elevada de proteases, infecção e isquemia ou hipóxia tecidual, lesões recorrentes decorrentes de neuropatia e falha celular contribuem para a complexidade das feridas crônicas. Essas feridas são frequentemente observadas em pacientes com diabetes e obesidade, sendo as úlceras diabéticas nos pés um problema particularmente significativo. Nesse sentido, os componentes terapêuticos padrão para úlceras diabéticas nos pés incluem desbridamento, alívio da carga, controle de infecção, revascularização cirúrgica e elevação/compressão do membro. Os enxertos de pele, tanto bioengenheirados quanto naturais, têm-se demonstrado promissor em ensaios clínicos para úlceras diabéticas nos pés. No entanto, ainda enfrentamos desafios significativos no tratamento de feridas que não cicatrizam adequadamente [1].

Nesse sentido, outro desafio é o controle de infecções, o qual é de extrema importância devido ao aumento da incidência de microrganismos multirresistentes em todo o mundo. O uso

indiscriminado de antibióticos tem levado ao surgimento de resistência antibiótica em bactérias e fungos, representando um grave problema nas infecções de feridas. O *Staphylococcus*, incluindo a forma resistente à meticilina conhecida como *Staphylococcus aureus*, é a infecção mais comumente encontrada em queimaduras e feridas. As infecções em feridas crônicas podem variar dependendo da localização geográfica. A necessidade urgente de abordar a resistência antimicrobiana tem impulsionado ações globais e aumento de financiamento para combater esse problema. O desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos eficazes, utilizando nanotecnologia e ciência avançada de biomateriais, é crucial para o tratamento de feridas infectadas [23,24].

Em prosseguimento, as queimaduras representam desafios significativos em termos de restauração funcional e reparação estética. Nesse sentido, as queimaduras agudas desencadeiam uma resposta inflamatória e podem levar a complicações como cicatrização hipertrófica, desfiguração facial e perda de função muscular. Melhorar a perfusão tecidual é vital para a cicatrização de feridas, e as abordagens terapêuticas atuais para queimaduras frequentemente resultam em cicatrizes e contração que exigem tratamentos adicionais e cuidados de longo prazo. Desse modo, os curativos eficazes que promovam a reconstrução funcional após queimaduras seriam de grande benefício para os pacientes [2,3].

No tratamento de feridas, existem abordagens convencionais e avançadas que visam promover a cicatrização adequada e prevenir complicações. Os cuidados convencionais de feridas envolvem a limpeza básica da ferida, a aplicação de curativos simples, o uso de pomadas ou cremes tópicos e o monitoramento regular da ferida para avaliar sua progressão. Essas medidas são essenciais para manter a limpeza da ferida, prevenir infecções secundárias e promover um ambiente propício à cicatrização [1,25].

No entanto, em casos de feridas mais complexas e de difícil cicatrização, são necessários cuidados avançados. Essas abordagens incluem o uso de terapia hiperbárica, que envolve a administração de oxigênio em alta pressão para melhorar a oxigenação dos tecidos e promover a

cicatrização. Além disso, fatores de crescimento podem ser aplicados na ferida para estimular a regeneração tecidual e acelerar o processo de cicatrização. O uso de tecidos alternativos da bioengenharia, também é uma opção avançada no tratamento de feridas. Esses tecidos são desenvolvidos em laboratório a partir de células-tronco ou outros materiais biológicos e podem ser usados para substituir tecidos danificados, promovendo a cicatrização adequada. Nesse mesmo sentido, a terapia de pressão negativa é outra abordagem avançada que utiliza um curativo especial conectado a um sistema de sucção para promover a granulação dos tecidos e reduzir o edema, favorecendo a cicatrização. Curativos biológicos, que consistem em produtos derivados de tecidos humanos ou animais, também são utilizados para estimular a cicatrização de feridas. Esses produtos contêm fatores de crescimento e componentes celulares que promovem a regeneração tecidual. Além disso, o uso de curativos com agentes ativos, como substâncias antimicrobianas ou anti-inflamatórias, pode ser uma opção para tratar infecções ou reduzir a resposta inflamatória na ferida. Em casos mais complexos, a cirurgia plástica pode ser necessária para reparar tecidos danificados, reconstruir a estrutura anatômica ou corrigir deformidades resultantes de feridas. Na Figura 01 é apresentado o diagrama esquemático mostrando as diferenças entre os cuidados convencionais de feridas disponíveis em qualquer clínica e os cuidados avançados de feridas [1].

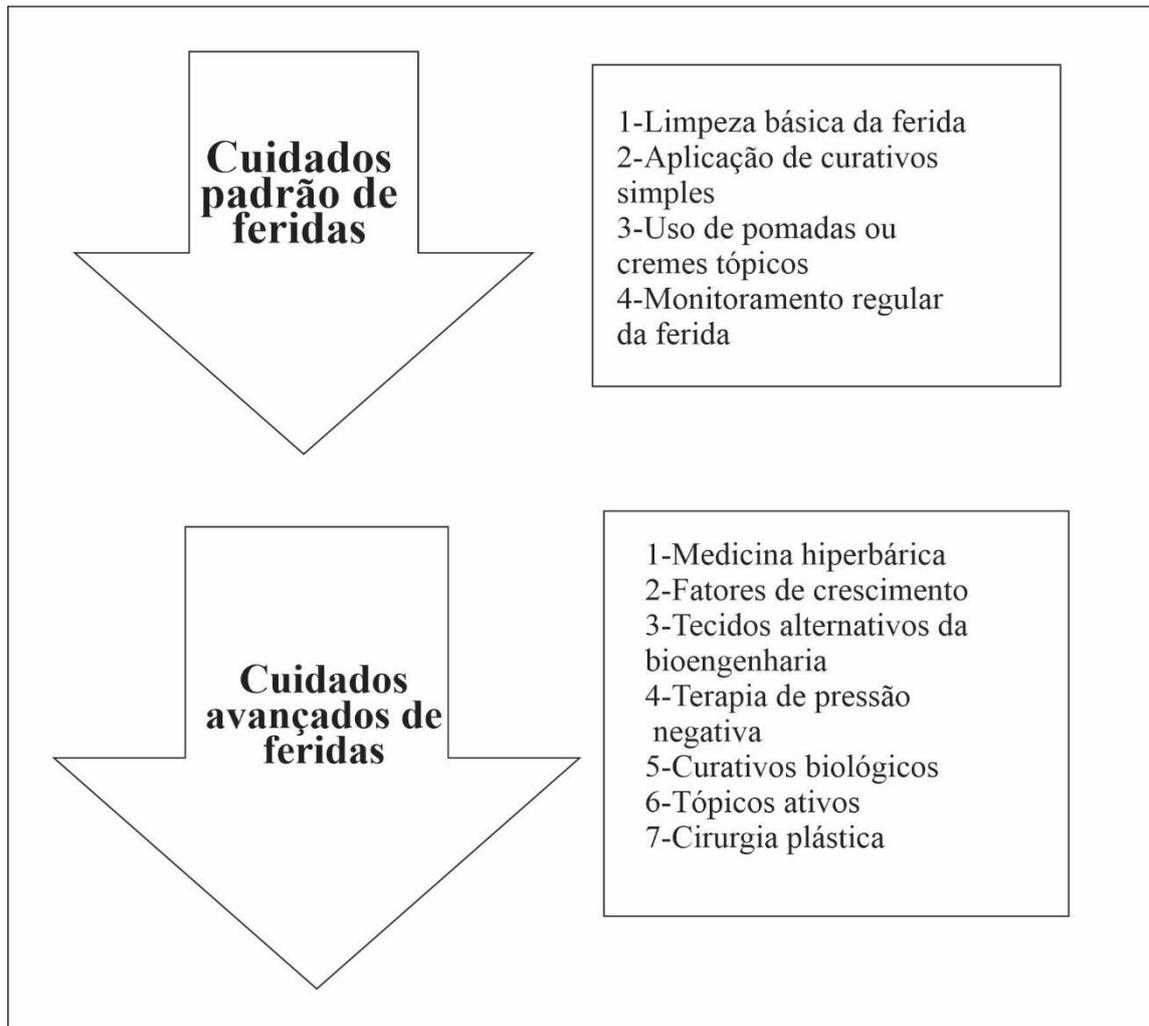


Figura 01. Diagrama esquemático mostrando as diferenças entre os cuidados convencionais de feridas disponíveis em qualquer clínica e os cuidados avançados de feridas.

O curativo avançado ideal deve manter o microambiente adequado da ferida, ser permeável ao ar e absorver o exsudato, um fluido liberado por feridas durante o processo de cicatrização, composto por plasma, células e proteínas. Embora sua presença seja normal no início da cicatrização, o excesso prolongado pode indicar inflamação crônica, prejudicando a regeneração. O gerenciamento eficaz do exsudato é crucial para otimizar o ambiente da ferida, prevenir infecções e promover uma cicatrização adequada. Além disso, o curativo deve proteger contra infecções, oferecer isolamento térmico e aprimorar os processos naturais de cicatrização de feridas. Terapias baseadas em biomateriais e NPs, que passaram por um desenvolvimento pré-clínico significativo e estão em uso clínico ou em ensaios clínicos, desempenham um papel crucial nesse contexto[1,25,26].

3.1.2. MEMBRANA POLIMÉRICA DE QUITOSANA COMO BIOMATERIAL

Os biomateriais são definidos como materiais que interagem com sistemas biológicos para avaliar, tratar, curar ou substituir tecidos ou funções do corpo. Uma característica distintiva dos biomateriais é sua biocompatibilidade, que se refere à capacidade de um material de provocar uma resposta adequada do organismo em uma situação específica. A interpretação da biocompatibilidade pode variar dependendo do desempenho ou função desejada. Alguns estudos avaliam a biocompatibilidade com base em parâmetros como viabilidade celular, resposta tecidual, formação de tumores, danos genéticos, resposta imunológica ou formação de coágulos sanguíneos. Desse modo, a Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*FDA*) define biocompatibilidade como a ausência de danos causados ao paciente pelo material usado em um dispositivo médico. Nesse sentido, os biomateriais desempenham um papel crucial em proporcionar bem-estar aos seres humanos, especialmente no campo de dispositivos médicos e implantes. Os quatro principais grupos de biomateriais mencionados são as cerâmicas, metais, polímeros e compósitos, que oferecem propriedades únicas capazes de cumprir as funções pretendidas dos dispositivos médicos [27].

Dessa forma, os biomateriais possuem a capacidade de permanecer em contato com fluidos corporais e tecidos por períodos prolongados, enquanto causam reações adversas mínimas. Dentro desse contexto, os curativos bioativos e diversas formulações de polímeros, tanto naturais, sintéticos quanto semissintéticos, também têm sido explorados para auxiliar nos processos de cicatrização de feridas. Os biomateriais utilizados na cicatrização de feridas podem fornecer uma estrutura de suporte para a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de regular a liberação de fatores de crescimento e citocinas para promover a regeneração tecidual. Além disso, esses materiais podem ajudar a manter um ambiente úmido na ferida, protegendo-a de contaminantes externos, bem como facilitando a remoção de tecido necrótico [28].

Nesse contexto, os polímeros têm desempenhado um papel de grande relevância na pesquisa e prática biomédica, e sua importância e contribuição para o avanço do conhecimento

científico na área da composição, função, biomecânica e etiologia das doenças dos órgãos humanos são inegáveis. Através do desenvolvimento de polímeros com características bioativas e biocompatíveis, é possível explorar e compreender melhor os sistemas biológicos, bem como criar soluções terapêuticas mais eficazes [29].

Biomateriais como biopolímeros naturais apresentam características promissoras para o tratamento das várias fases da cicatrização de feridas diabéticas. Esses materiais utilizam mecanismos que visam abordar a cicatrização prejudicada, incluindo a liberação controlada de fármacos. Exemplos desses biomateriais incluem colágeno e CHI, que têm demonstrado aplicações de cicatrização de feridas. O colágeno, como componente essencial da matriz extracelular, fornece suporte estrutural e estimula a migração celular e a regeneração tecidual. Sua aplicação no processo de cicatrização de feridas pode facilitar a formação de tecido novo. E por fim, a CHI (Figura 02), derivada da quitina, possui propriedades biológicas favoráveis que incluem biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesividade e não toxicidade, no mesmo sentido, apresenta propriedades antimicrobianas e pode melhorar a cicatrização de feridas, promovendo a proliferação celular e a angiogênese. Além disso, ela possui a capacidade de liberar fármacos de forma controlada, o que pode auxiliar ainda mais no processo de cicatrização, permitindo a entrega direta de agentes terapêuticos no local da ferida [28].

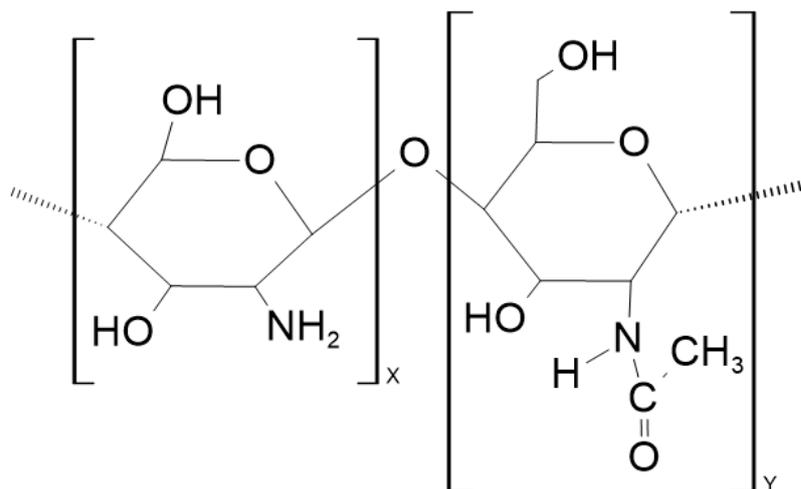


Figura 02. Representação da estrutura geral da CHI.

No mesmo contexto, a CHI tem sido amplamente explorada em diversas aplicações biomédicas devido às suas propriedades únicas e versatilidade. Sua capacidade de formar géis, micropartículas e membranas, aliada à sua mucoadesividade e capacidade de aumentar a permeabilidade, o torna um excelente material para aplicações farmacêuticas. No campo da entrega de medicamentos, a CHI tem sido utilizado como excipiente em formulações de comprimidos, melhorando a dissolução de fármacos pouco solúveis e atuando como agente estabilizador em emulsões. Além disso, sua capacidade de se ligar covalentemente a fármacos permite o transporte direcionado desses compostos até o local de ação. No âmbito da engenharia de tecidos, a CHI tem sido empregado na fabricação de *scaffolds* ou suportes, que desempenham um papel fundamental na regeneração e reparação de tecidos. Sua porosidade e grupos reativos permitem a liberação controlada de substâncias bioativas, além de interagir especificamente com componentes da matriz extracelular e receptores de superfície celular. Essas características tornam a CHI uma opção promissora para aplicações em engenharia de tecidos cartilagosos, por exemplo. Outra aplicação relevante da CHI é como agente de transferência genética não viral. Sua capacidade de formar complexos polieletrólíticos com o DNA oferece uma alternativa segura e eficaz aos vetores virais, com menor risco de induzir respostas imunes e efeitos oncogênicos. A CHI tem sido investigado como vetor de transfecção para entrega de genes terapêuticos, abrindo caminho para o desenvolvimento de terapias gênicas não virais. Além disso, a CHI mostra potencial na entrega de vacinas, tanto por via oral quanto nasal. Sua propriedade mucoadesiva facilita a adesão às superfícies celulares, permitindo a proteção e liberação controlada de antígenos. A capacidade de formar NPs sem o uso de solventes orgânicos preserva a imunogenicidade dos antígenos durante a preparação e carregamento das vacinas [30].

As membranas poliméricas de CHI têm despertado um interesse significativo devido às suas propriedades únicas e seu potencial para aplicações biomédicas. Essas membranas são formadas a partir da moldagem úmida em soluções de CHI, seguida de secagem adequada. No entanto, diversos métodos de modificação físico-química têm sido investigados para melhorar suas propriedades [31,32]. Uma área de pesquisa em destaque é a modificação da superfície das

membranas de CHI. O tratamento de plasma de nitrogênio ou argônio, por exemplo, pode aumentar a rugosidade da superfície, o que melhora a adesão e proliferação celular. Além disso, técnicas como ozonização ou irradiação UV têm sido utilizadas para promover modificações na superfície e despolimerização das membranas de CHI, alterando suas propriedades físicas e químicas. Essas modificações podem ser exploradas para modificar a porosidade das membranas, permitindo a criação de macro e micro poros, o que é relevante para aplicações como curativos de feridas [32].

As propriedades mecânicas das membranas de CHI podem ser aprimoradas por meio de diferentes técnicas. A combinação de CHI com GLI, por exemplo, tem demonstrado aumentar a ductilidade e a resistência à tração das membranas. Essa estratégia de adicionar um plastificante como o GLI ajuda a melhorar a flexibilidade e a maleabilidade das membranas de CHI [9,33]. Além disso, a adição de partículas inorgânicas às membranas de CHI tem sido uma estratégia empregada para conferir propriedades adicionais. A adição de NPsAg tem mostrado atividade antimicrobiana [34], enquanto as NPsZnO têm apresentado propriedades antibacterianas [35], antidiabéticas [36] e antioxidante [37]. No geral, membranas de CHI oferecem uma ampla gama de aplicações potenciais em áreas como cicatrização de feridas, entrega de medicamentos, atividade antimicrobiana e dispositivos biomédicos [28,38].

3.1.3 NANOMATERIAIS APLICADOS EM BIOMATERIAIS

A nanotecnologia está sendo amplamente utilizada em diversos setores da sociedade, abrangendo áreas como agricultura, transporte, eletrônica, comunicação, indústria alimentícia e medicina [39,40]. Essa tecnologia consiste na manipulação da matéria em escala nanométrica, que varia de 1 a 100 nanômetros, permitindo a criação de novas partículas e dispositivos [41]. Na área da medicina, a nanotecnologia tem se destacado como um campo interdisciplinar de ciência e tecnologia conhecido como nanomedicina, que utiliza materiais em escala nanométrica para o diagnóstico e tratamento de doenças humanas. A nanomedicina tem emergido como um componente essencial no tratamento de diferentes tipos de doenças, devido ao seu vasto potencial

para a medicina personalizada. Além disso, a nanomedicina apresenta diversas aplicações, como imagens inteligentes, detecção molecular e terapias direcionadas [42].

As propriedades únicas das NPs dependem de fatores como tamanho, forma, carga superficial, modificação e hidrofobicidade [43]. Essas características singulares das NPs conferem vantagens significativas à nanomedicina. Por exemplo, o tamanho reduzido das NPs possibilita atravessar barreiras biológicas, enquanto diferentes estruturas de NPs podem aumentar a biodisponibilidade de medicamentos insolúveis ou instáveis. Além disso, a superfície modificável das NPs permite direcionar especificamente a área afetada para fins de imagem ou entrega de medicamentos. A melhoria da bioatividade, biodisponibilidade e liberação controlada de medicamentos tem sido alcançada por meio da encapsulação de medicamentos em sistemas de entrega de nanomedicamentos, considerados uma abordagem terapêutica superior em comparação com a medicina convencional [44].

Esses materiais, em escala nanométrica, são capazes de se degradar naturalmente nas condições biológicas do corpo. A degradabilidade das NPs pode ser uma propriedade útil para controlar a liberação de substâncias, ao mesmo tempo em que permanecem estáveis em locais não afetados. As NPs biodegradáveis possuem um grande potencial nos sistemas de entrega de medicamentos por várias razões: fornecem um perfil de liberação controlada, são estáveis no sistema circulatório, são não tóxicas e não imunogênicas [42].

Os nanomateriais de ZnO sintetizados de forma verde¹ têm mostrado um grande potencial em várias aplicações biomédicas [47]. Essas abordagens ecologicamente corretas e sustentáveis utilizam organismos vivos [45], biomoléculas naturais e materiais residuais como agentes redutores e estabilizantes na síntese de NPsZnO [46,48]. Os métodos de síntese verde de NPsZnO podem ser categorizados em três principais tipos: biossíntese mediada por microbiologia,

¹ Aqui entende-se “síntese verde” como uma rota amigável de produção de nanopartículas metálicas sem a utilização de solventes tóxicos nem condições extremas de temperatura e pressão, bem como o uso de precursores com fonte de origem natural como extrato de plantas, óleos vegetais, microorganismos, matérias orgânicas diversas, como polissacarídeos, poliamidas, etc [20,45,46].

biossíntese mediada por extratos naturais e biossíntese mediada por biomoléculas/biopolímeros. Cada um desses métodos utiliza diferentes fontes e agentes para facilitar a formação das NPs, resultando em propriedades e aplicações distintas [49].

A biossíntese mediada por microbiologia envolve o uso de bactérias ou extratos bacterianos para sintetizar NPsZnO. As bactérias atuam como agentes redutores e estabilizantes, permitindo a formação das NPs. Esse método aproveita as propriedades naturais dos microrganismos para produzir NPsZnO, no mesmo contexto, síntese por organismos vivos, como bactérias e plantas, tem se destacado como uma abordagem promissora para obter NPs com propriedades antimicrobianas. Bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* têm sido usadas para a síntese de NPsZnO. Essas bactérias possuem a capacidade de converter íons de zinco em NPs metálicas por meio de processos de biorredução. Além disso, algumas bactérias também secretam moléculas orgânicas que atuam como estabilizadores das NPs, evitando sua aglomeração e promovendo sua dispersão. Estudos têm mostrado que as NPsZnO sintetizadas por bactérias apresentam atividade antimicrobiana significativa contra bactérias patogênicas [45]. Desse modo, a biossíntese mediada por extratos naturais utiliza matérias-primas derivadas de plantas e algas. Esses extratos naturais contêm biomoléculas com grupos amino, carboxila e hidroxila, que atuam como agentes estabilizantes na síntese de NPsZnO. Além disso, os fitoquímicos presentes nesses extratos aumentam as propriedades antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas das NPs [50].

No contexto das aplicações antibacterianas, as NPsZnO têm se mostrado eficazes contra uma ampla gama de patógenos bacterianos. Suas propriedades antimicrobianas derivam de sua alta reatividade e grande área de superfície em relação ao volume. Isso permite a ligação de um grande número de ligantes na superfície das NPs, possibilitando sua interação com receptores presentes na superfície bacteriana. Estudos têm demonstrado que as NPsZnO podem inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas [35,36]. As NPsZnO sintetizadas de forma verde têm demonstrado aprimoramentos significativos em termos de citocompatibilidade e propriedades

biomédicas em comparação com as NPs tradicionalmente produzidas. Elas exibem comportamento antibacteriano e/ou anticancerígeno, interagem efetivamente com membranas biológicas e podem ser aplicadas em processos de cicatrização de feridas e biossensoriamento [51].

Da mesma forma, a síntese de NPsZnO mediada por extratos vegetais tem sido amplamente explorada. Diferentes partes de plantas, como folhas, caules, raízes e frutas, têm sido utilizadas para a síntese de NPsZnO. Os extratos vegetais contêm compostos bioativos que possuem propriedades redutoras e estabilizadoras, permitindo a formação das NPs e evitando sua aglomeração. Estudos têm demonstrado que as NPsZnO sintetizadas por extratos vegetais apresentam atividade antimicrobiana significativa contra várias bactérias patogênicas [50].

No contexto do ZnO, a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) desempenha um papel significativo na atividade antibacteriana e nas propriedades toxicológicas desse material. Durante a interação do ZnO com bactérias, a exposição à luz ultravioleta (UV) ou a modificações da superfície podem estimular a produção de ROS. Por exemplo, a absorção de oxigênio induzida pelo recozimento com oxigênio pode aumentar a quantidade de átomos de oxigênio na superfície do ZnO, resultando em uma resposta antibacteriana aprimorada. Esse aumento dos níveis de ROS pode levar a um estresse oxidativo intenso nas bactérias, causando danos em suas biomoléculas e levando à inibição do crescimento bacteriano. Além disso, a liberação de íons Zn^{2+} da superfície do ZnO também pode contribuir para a atividade antibacteriana, uma vez que os íons Zn^{2+} têm habilidade de gerar ROS através de reações redox [35,52].

A síntese biomédica mediada por biomoléculas e biopolímeros implica na utilização de carboidratos ou biopolímeros estruturais, para a produção de NPsZnO. Essas biomoléculas desempenham funções como agentes redutores e estabilizantes, facilitando o processo de formação das NPs [45,53]. Em linhas gerais, a elaboração de NPs é um procedimento complexo, no qual uma ampla gama de variáveis distintas pode influenciar as propriedades do produto final. Determinadas variáveis exercem impacto significativo sobre as características das NPs resultantes, enquanto outras podem ter efeitos mais sutis. No contexto da produção de NPs, como é o caso das

NPsZnO, é crucial obter uma distribuição de tamanho restrita do produto final e ser capaz de controlar a morfologia das NPsZnO. Com o intuito de evitar o crescimento desordenado e a agregação das NPsZnO, cientistas têm explorado a utilização de diversos ligantes orgânicos. Entre esses ligantes, destacam-se o polietileno glicol (PEG), o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), o ácido oléico e a gelatina, os quais têm sido empregados para direcionar a morfologia e o tamanho das nanopartículas. O amido apresenta uma reatividade química notável quando comparado a outros carboidratos, devido à presença de grupos hidroxila em suas unidades de α -glicose. Tais grupos hidroxila são capazes de reagir de forma análoga aos grupos hidroxila de álcoois primários e secundários, o que os torna aptos a atuar como agentes de oxidação para sais metálicos e, conseqüentemente, apropriados para processos de polimerização [53].

A nanotecnologia verde oferece uma série de vantagens comparativas em relação aos métodos convencionais de síntese de NPsZnO. Enquanto os métodos tradicionais podem envolver o uso de substâncias químicas tóxicas e solventes prejudiciais ao ambiente e aos seres vivos, a abordagem da nanotecnologia verde emprega fontes naturais e processos ambientalmente sustentáveis, reduzindo o impacto ambiental e promovendo uma maior biocompatibilidade das nanopartículas [45].

A síntese verde de NPsZnO não apenas oferece uma abordagem sustentável e *eco-friendly*, mas também abre caminho para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e materiais antibacterianos. Essas nanoestruturas sintetizadas de forma verde podem ser exploradas no desenvolvimento de terapias antibacterianas mais eficazes, combatendo doenças causadas por patógenos bacterianos resistentes a múltiplos fármacos. É importante ressaltar que a síntese de NPsZnO de forma verde ainda está em constante evolução, e mais pesquisas são necessárias para a compreensão completa de seus mecanismos de ação, caracterização físico-química e otimização de suas propriedades. No entanto, os estudos existentes destacam o potencial promissor das NPsZnO sintetizadas de forma verde como agentes antibacterianos inovadores na área biomédica [35,49].

No mesmo contexto dos nanomateriais aplicados como biomateriais, a Ag em suas diferentes formas, tem sido amplamente utilizada como agente antimicrobiano ao longo da história. Nesse sentido, com o surgimento da nanotecnologia, as NPsAg se tornaram uma área de pesquisa importante devido à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Essas NPs exibem propriedades únicas, como alta capacidade de superfície e atividade elétrica, óptica e catalítica, que as tornam adequadas para aplicações médicas [34]. As NPsAg têm sido abordadas em uma variedade de produtos, como cremes e curativos para tratamento de queimaduras e úlceras, embalagens de alimentos para prevenção de contaminação, eletrodomésticos, instrumentos cirúrgicos, roupas, cosméticos, produtos odontológicos, cateteres e curativos. Sua atividade antimicrobiana aprimorada tem sido especialmente valiosa na área médica, onde a resistência aos antibióticos é um problema crescente [34,54].

Dessa maneira, as NPsAg demonstraram atividade antimicrobiana contra vários microorganismos, bactérias, fungos e vírus. Elas atacam os microorganismos em várias estruturas simultaneamente, tornando difícil o desenvolvimento de resistência. As NPsAg também têm sido estudadas como uma alternativa aos antibióticos convencionais, buscando novos agentes que possam combater os microorganismos patogênicos sem promover o surgimento de resistência [55]. Nesse sentido, as ROS desempenham papéis significativos na regulação da biologia celular e estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças. Recentemente, estudos têm demonstrado que as NPsAg também são capazes de gerar ROS e induzir estresse oxidativo (EO) em sistemas biológicos. A interação entre as NPsAg e as ROS pode causar danos celulares, incluindo disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica, danos no DNA e ativação de vias inflamatórias. Além disso, o estresse oxidativo induzido pelas NPsAg tem sido associado a efeitos citotóxicos e genotóxicos em diferentes tipos celulares. Nesse sentido, compreender os mecanismos moleculares subjacentes à geração de ROS pelas NPsAg e seus efeitos no estresse oxidativo, a fim de avaliar tanto os riscos quanto os benefícios dessas NPs em aplicações biomédicas e ambientais é de fundamental importância [56]. Ao projetar sistemas de entrega de nanomedicamentos com NPsAg, é crucial considerar a estabilidade das NPs, o tamanho adequado para permitir a penetração em tecidos e

células-alvo, a modificação de superfície para direcionamento e liberação controlada do medicamento e a biocompatibilidade geral das NPs [34,54].

3.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2.1 USO DE ZnO EM APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Estruturas nanométricas de metal e óxido de metal têm mostrado grande potencial devido à sua alta relação superfície/volume e alta reatividade. Nesse sentido, o ZnO revelou uma aplicabilidade mais ampla, inclusive na nanomedicina, onde os nanomateriais de ZnO têm mostrado grande potencial ao interagir efetivamente com membranas biológicas e exibir comportamentos antibacterianos e/ou anticancerígenos [49].

Chandrasekaran e colaboradores investigaram a síntese de NPsZnO utilizando dois métodos diferentes: precipitação química e um método de síntese verde utilizando extrato de folhas de *vinca rosea*. O objetivo era determinar qual método produzia as NPs mais eficientes para atividades antimicrobiana, antidiabética e anticâncer. Os resultados confirmaram a presença de NPsZnO de alta pureza, com formato hexagonal. O tamanho das NPs variou de 16 a 41 nm. Além disso, a atividade anticâncer de ambos os tipos de NPsZnO foi avaliada utilizando a linhagem celular MCF-7 de câncer de mama. Os resultados indicaram que a síntese verde das NPsZnO apresentou uma atividade citotóxica melhor em comparação com o método de precipitação química. Nesse sentido, as NPs sintetizadas pelo método verde demonstraram excelente atividade antidiabética e antimicrobiana. Ambas as amostras de NPsZnO mostraram inibição efetiva da α -amilase, sendo que as NPs sintetizadas pelo método verde (SV- NPsZnO) apresentaram uma eficiência maior em comparação com as NPs precipitadas quimicamente (NPs PQ-ZnO). Essa diferença de eficácia pode ser atribuída à presença de alcaloides nas SV- NPsZnO. Além disso, as SV- NPsZnO exibiram um forte efeito citotóxico contra a linhagem celular MCF-7, com um valor de IC₅₀ de 81,75 μ g/mL. Em resumo, os resultados sugerem que as NPsZnO sintetizadas por meio do método verde utilizando extrato de folhas de *vinca rosea* apresentaram atividades antimicrobiana, antidiabética e anticâncer superiores em comparação com as sintetizadas por

métodos de precipitação química. Essa abordagem de síntese verde oferece benefícios potenciais, como aumento da eficiência do medicamento, menor toxicidade e custo mais baixo [51].

A síntese verde de NPsZnO usando extrato de sementes de *Silybum marianum L.* e seu potencial de aplicação têm despertado um interesse tremendo nos últimos anos. O estudo de Mohammadi Arvanag e colaboradores relata um método verde assistido por micro-ondas para a síntese de NPsZnO usando extrato de sementes de *Silybum marianum L.* As características da amostra preparada foram exploradas em termos de fase cristalina, morfologia, composição, área de superfície, propriedades ópticas e térmicas. As partículas da amostra biossintetizada (ZnO/extrato) apresentaram tamanhos menores do que as produzidas quimicamente. A existência de biomoléculas do extrato de sementes de *Silybum marianum L.* ligadas à amostra ZnO/extrato foi confirmada por várias análises. Desse modo, a amostra ZnO/extrato foi utilizada para tratar ratos diabéticos induzidos por aloxano e sua eficácia foi comparada com tratamentos de ZnO, extrato e insulina. Para esse fim, os níveis de glicose no sangue, insulina, colesterol total, triglicerídeos totais e lipoproteína de alta densidade foram medidos antes e após o tratamento com os agentes de tratamento estudados e comparados entre si. Além disso, as atividades antibacterianas de ambas as amostras de ZnO foram investigadas contra a *E. coli* para avaliar seu potencial aplicação antibacteriana. A partir dos resultados, as NPs ZnO/extrato apresentaram um desempenho excepcional na superação dos distúrbios diabéticos e boa atividade antibacteriana contra a bactéria estudada [36].

Rani e sua equipe desenvolveu uma biossíntese eficiente de NPsZnO hidrofílicas. Esta biossíntese foi realizada utilizando extratos aquosos de flores de *Plumeria obtusa* (amostras rotuladas como PC1) e *Tabernaemontana divaricata* (amostras rotuladas como C1). As NPsZnO resultantes foram centrifugadas, lavadas com álcool diluído e secas a 80°C em uma estufa por 4 horas. As amostras produzidas foram testadas para a ação antidiabética medindo *in vitro*, a inibição da enzima α -amilase. Além disso, o PC1 e C1 foram investigadas com relação à sua eficácia antidiabética em camundongos machos C57BL/6 com diabetes induzido por estreptozotocina

(STZ). Tanto o PC1 quanto o C1 apresentaram um potencial antidiabético significativo; no entanto, o nível de glicose no sangue foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) nos camundongos diabéticos induzidos por STZ tratados com PC1 em comparação com o C1. No geral, o PC1 e o C1 mostraram ser candidatos antidiabéticos muito promissores para o tratamento antidiabético *in vivo* [57].

Maheo e colaboradores desenvolveu um método abiótico eficiente para a síntese de NPsZnO utilizando CHI e um extrato aquoso das folhas de *Elsholtzia blanda*. As NPsZnO sintetizadas apresentaram tamanhos variando de 20 a 70 nm e possuíam formato esférico e hexagonal. A atividade antidiabética das NPsZnO foi avaliada e demonstrou a maior porcentagem de inibição enzimática em $74\% \pm 4$. Além disso, as NPs exibiram significativa atividade antioxidante, com uma atividade máxima de eliminação de 78% contra o *2,2-difenil-1-picrilhidrazil*. O efeito citotóxico das NPs foi investigado na linhagem celular de osteossarcoma humano (MG-63), e o valor de IC_{50} foi determinado como $62,61 \mu\text{g/mL}$. Além disso, a eficiência fotocatalítica das NPs sintetizadas foi avaliada por meio da degradação do corante *Congo red*, resultando em uma eficiência de degradação de 91%. Em suma, as análises abrangentes indicam que as NPsZnO sintetizadas podem ser adequadas para várias aplicações biomédicas, bem como para remediação ambiental [58].

Malik e colaboradores utilizaram em sua pesquisa, um extrato das folhas de *Ocimum basilicum* como agente redutor na síntese de NPsZnO. As quais foram sintetizadas de forma sustentável, mediadas pelo extrato de *Ocimum basilicum* e decoradas em folhas de óxido de grafeno reduzido (RGO) por meio de um método simples de único passo. O tamanho médio de cristalito do ZnO foi de 25 nm, o que confirmou a estrutura hexagonal de *wurtzita* do ZnO. A técnica de MET confirmou a morfologia esférica das partículas com tamanho médio de 31 nm. A atividade antioxidante das NPsZnO de *Ocimum basilicum* sintetizadas e dos nanohíbridos de RGO-ZnO foi avaliada por meio de ensaios de eliminação de *DPPH* e demonstrou ser dependente da dose. O RGO-ZnO inibiu efetivamente as enzimas α -amilase e α -glicosidase, indicando

atividade antidiabética *in vitro*. Além disso, os nanohíbridos de RGO-ZnO apresentaram potencial antibacteriano com aumento da concentração contra cepas bacterianas gram-positivas (*Cocci*) e gram-negativas (*E. coli*). Na atividade fotocatalítica, as NPsZnO e os nanohíbridos de RGO-ZnO foram utilizados como catalisadores e degradaram o corante rodamina B (Rh-B) em 91,4% e 96,7%, respectivamente, sob luz UV-visível. No geral, os nanohíbridos de RGO-ZnO apresentaram melhores resultados em atividade antibacteriana, antidiabética e fotocatalítica em comparação com as NPsZnO puras. Portanto, os nanohíbridos de RGO-ZnO demonstraram ser um material promissor para estudos de fotocatalise e biológicos [59].

Malasa e colaboradores em outra abordagem com NPsZnO foram sintetizadas com sucesso utilizando extratos de folhas, caules e calos de *Tabernaemontana heyneana* Wall. pelo método de combustão verde. Os espectros de FTIR revelaram a presença de fitoquímicos mais prováveis dos extratos vegetais envolvidos nos processos de redução e estabilização das NPsZnO. As quais foram capazes de inibir efetivamente a atividade do radical DPPH (*1,1-difenil-2-picrilhidrazil*), exibindo uma potente atividade de captura de radicais (IC₅₀ entre 467,7 e 752,3 µg/mL). As NPsZnO apresentaram forte atividade anti-inflamatória (estabilização de membrana). O potencial antidiabético das NPsZnO foi avaliado e demonstrou excelente atividade inibitória de α-glucosidase (IC₅₀ de 16,3 µg/mL) e α-amilase (IC₅₀ de 42,3 µg/mL). O efeito citotóxico das NPsZnO foi investigado na linhagem celular A549 (câncer de pulmão humano) por meio do ensaio MTT, que mostrou uma resposta dependente da dose. Os valores de IC₅₀ variaram de 89,47 a 185,8 µg/mL, demonstrando sua maior eficácia citotóxica. O percentual de degradação do corante carcinogênico azul de metileno foi estudado e uma atividade catalítica excepcional de 87-100% foi registrada pelas NPsZnO em 160 min. Portanto, as NPsZnO se mostraram como melhores candidatas para aplicações biomédicas e industriais futuras [60].

Al-Radadi e colaboradores, sintetizaram NPsZnO utilizando sulfato de zinco como precursor e moléculas bioativas de *Zingiber officinale* (gingibre) como agentes estabilizantes e redutores. Os efeitos das NPsZnO foram avaliados em diversos ensaios biológicos. Nos ensaios

antibacterianos, observou-se um aumento significativo na atividade antimicrobiana dos antibióticos (*Ciprofloxacina*, *Imipenem*, *Vancomicina* e *Amoxicilina-ácido clavulânico*) quando combinados com as NPsZnO, resultando em inibições de até 35,3; 24,1; 10,5 e 11,2; respectivamente, contra *S. aureus* e 41,4; 31,8; 15,8 e 23,9%; respectivamente, contra *E. coli*, em comparação com os antibióticos isoladamente. Além disso, as NPsZnO demonstraram compatibilidade com hemácias, atividade antioxidante e ausência de hemólise significativa em altas concentrações. Elas também exibiram inibição significativa da enzima α -amilase, sugerindo potencial antidiabético. No ensaio citotóxico utilizando camarões de salmoura (*Artemia salina*), as NPsZnO causaram uma taxa máxima de mortalidade de 61% na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio anti-inflamatório, as NPsZnO inibiram a atividade da *ciclo-oxigenase* (COX-1 e COX-2) em até 53,11 e 51,14%; respectivamente, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, as NPsZnO apresentaram potencial significativo contra a doença de *Alzheimer*, inibindo as enzimas *acetilcolinesterase* (AChE) e *butirilcolinesterase* (BChE) em até 62,91% e 60,18%; respectivamente, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados indicam que as NPsZnO sintetizadas com o uso de *Zingiber officinale* possuem propriedades antimicrobianas, citotóxicas, anti-inflamatórias e potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas. As quais apresentam resultados promissores para respectivas aplicações biológicas *in vivo* [61].

Assim, torna-se evidente que a síntese verde de NPsZnO utilizando diversos substratos orgânicos é viável, resultando em NPs com propriedades superiores em comparação com as sintetizadas por métodos químicos tradicionais. Além disso, a comprovação adicional reside nas diversas aplicações biológicas das NPsZnO.

3.2.2. APLICAÇÕES COMBINADAS DE Ag EM CONTEXTOS BIOLÓGICOS

Estudo com Ag é amplamente reconhecida por suas fortes propriedades antimicrobianas e é comumente utilizada na forma de nanomateriais ou sais metálicos para diversas aplicações antimicrobianas. Agentes antimicrobianos desempenham um papel crucial em campos diversos, como tratamento de água, indústrias químicas, conservação de alimentos, tanques de aquicultura,

produtividade agrícola e aplicações biomédicas. Com o avanço da nanociência e tecnologia, as NPsAg têm recebido grande atenção como agentes antimicrobianos eficazes e são sintetizadas por meio de vários protocolos. Nesse sentido, a síntese de NPsAg mediada por plantas e algas, destacando sua aplicação como agentes antimicrobianos [55].

No estudo relacionado e conduzido por Bruna e sua equipe [34], foi constatado que as NPsAg têm se destacado como excelentes agentes antimicrobianos, capazes de combater bactérias *in vitro* e *in vivo*, responsáveis por causar infecções. A capacidade antibacteriana das NPsAg abrange bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, incluindo cepas multirresistentes. Elas apresentam múltiplos e simultâneos mecanismos de ação e, quando combinadas com agentes antibacterianos, como compostos orgânicos ou antibióticos, demonstram efeitos sinérgicos contra bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As características das NPsAg as tornam adequadas para aplicação em produtos médicos e de cuidados de saúde, onde podem tratar eficientemente infecções ou preveni-las. Diante da urgente necessidade de novos agentes antibacterianos eficazes.

Balachandar e colaboradores, desenvolveu o extrato de acetato de etila das folhas de *Glochidion candolleianum* (Wight & Arn.) Chakrab. & M. Gangop. (GCL) para realizar a fitossíntese de NPsAg. Essas NPs foram subsequentemente submetidas a ensaios antibacterianos, abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As GCL com NPsAg foram caracterizadas por meio de análises espectroscópicas e microscópicas. Nesse sentido, as GCL com NPsAg discretas formadas apresentaram tamanho na faixa de micrômetros. Imagens de MEV revelaram que as NPsAg eram esféricas e elipsoidais, dispersas de forma uniforme e recobertas por um material secundário com espessura de aproximadamente 10 nm. Uma zona de inibição máxima de 12,2 mm de diâmetro foi observada contra *Salmonella enterica*, seguida por uma zona de 11,8 mm de diâmetro contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados sugerem que o GCL poderia ser utilizado para o desenvolvimento de NPsAg antibacterianas contra bactérias patogênicas. Nesse sentido, o presente trabalho pode realizar outros testes *in vitro*, como

citotoxicidade e atividade antidiabética, a fim de avaliar possíveis análises *in vivo*. Esses testes adicionais forneceriam informações valiosas sobre a segurança e eficácia dos nanohíbridos sintetizados [62].

Robkhob e sua equipe, desenvolveu uma investigação dos efeitos do tamanho e da forma dos nanomateriais utilizados no tratamento e no manejo do Diabetes *Mellitus* tipo 2 (T2DM) na prevenção da hiperglicemia crônica e do estresse oxidativo. Especificamente, relatamos os efeitos da dopagem de Ag em nanobastões de ZnO (NPs ZnO/Ag) como uma estratégia racional de desenvolvimento de medicamentos. Em seguida, as atividades quantitativas de eliminação de radicais e inibição enzimática metabólica dos NPs ZnO/Ag em uma concentração de 100 µg/mL mostraram depender da quantidade de Ag dopada até um nível limite (3-4%). A análise de dicroísmo circular revelou um mecanismo promissor de inibição enzimática. Neste sentido, a inibição aprimorada de enzimas e a eliminação de radicais livres responsáveis principalmente pelos danos mediados por ROS fornecem uma forte justificativa científica para considerar os NPs ZnO/Ag como uma nanomedicina candidata para o controle da hiperglicemia pós-prandial e do estresse oxidativo associado [63].

Barwant e colaboradores, realizou uma síntese biogênica de NPs utilizando um extrato vegetal, econômica e ecologicamente amigável. Este estudo investigou atividades farmacológicas seletivas, como antitumoral, antioxidante e clivagem de DNA, dos NPs de Ag/AgO/Ag₂O sintetizados por meio da síntese verde mediada por *S. elaeagnifolium*. A atividade antitumoral dos NPs de Ag/AgO/Ag₂O foi testada em linhagens de células de câncer de pulmão (A-549) e apresentou atividade com IC₅₀ de 67,09 µg/mL. A atividade máxima de eliminação do radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi de 25,78% e 20,86% a 100 µg/mL, respectivamente. Além disso, as NPs de Ag/AgO/Ag₂O sintetizados por *S. elaeagnifolium* demonstraram considerável atividade de clivagem de DNA [64].

Na pesquisa liderada por Iqbal e sua equipe, adotou-se uma abordagem de síntese verde e ecologicamente sustentável para a produção de NPs ZnO dopadas com Ag, utilizando o extrato

aquoso das folhas de *Azadirachta* indica como agente redutor. O intervalo de energia de *band gap* do ZnO sintetizado de forma sustentável e do ZnO dopado com Ag foi de 3,39 eV e 3,25 eV, respectivamente. A atividade antibacteriana do NPs ZnO/Ag foi avaliada com zonas de inibição de 19 mm e 16 mm contra *cocos* e *E. coli*, respectivamente. A atividade antidiabética foi avaliada nos ensaios de inibição de α -amilase e α -glicosidase nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, o potencial de cicatrização *in vitro* do ZnO sintetizado de forma sustentável e das NPs ZnO/Ag mediadas pelas folhas de *neem* foi avaliado em ratos albinos utilizando uma membrana de hidrogel de CHI como curativo para feridas[65].

Na pesquisa conduzida por Mohammadi e colaboradores, foram desenvolvidos nanohíbridos contendo Ag_2O , CuO e ZnO para investigar suas propriedades antibacterianas e seus efeitos em agentes de infecção bacteriana, além de avaliar seu impacto em células cancerígenas. Nesse sentido, os resultados de CIM mostraram que todos os NPs produzidos tiveram têm efeitos antimicrobianos, mas as NPs CuO tiveram maior eficiência de atividade com 62 $\mu\text{g/mL}$ nas células microbianas investigadas. Em seguida, às NPs Ag_2O apresentam uma letalidade máxima das células cancerígenas, com IC_{50} de 110 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem celular C26 e 130 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem HCT-116, desse forma, os resultados promissores das NPs produzidas permitem o desenvolvimento de estudos futuros *in vivo* para regeneração de tecidos [66].

Recentemente publicamos resultados referente à produção de membranas à base de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) contendo PEG, alginato de sódio esterificado (ALG-e) e aditivos poliméricos carregados com NPs Ag [67]. As NPs Ag foram produzidas em suspensão aquosa e adicionadas aos géis poliméricos utilizando uma técnica de troca de fase. A formação do compósito foi confirmada pela presença do pico de prata no padrão de DRX do PHB. A análise morfológica revelou que a inclusão do polímero PEG resultou na formação de poros na superfície da membrana, e essa formação de poros foi minimizada pela adição do polímero ALG-e. A membrana PHB/PEG/ALG-e/NPs Ag combinou as melhores propriedades de permeabilidade ao vapor de água e hidrofiliabilidade dos diferentes polímeros utilizados. Todas as amostras apresentaram boa

atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo que o maior halo inibitório foi observado para o PHB/PEG/NPsAg contra o micro-organismo Gram-positivo *S. aureus*. Assim, o compósito PHB/PEG/ALG-e/NPsAg demonstrado que é um candidato promissor para o tratamento de cicatrização de feridas na pele. Para avançar nas aplicações *in vivo* com feridas de queimaduras em ratos, é essencial realizar análises mecânicas de tração e testes *in vitro* de citotoxicidade. Os testes mecânicos de tração seriam importantes para avaliar a resistência e a capacidade de alongamento das membranas de curativo contendo as NPsAg. Além disso, os testes *in vitro* de citotoxicidade seriam cruciais para avaliar o impacto dos nanohíbridos nas células, a fim de garantir sua segurança antes de prosseguir para estudos *in vivo*.

A viabilidade da síntese ecológica de NPsAg e NPsAg₂O utilizando diversos substratos orgânicos é evidente, resultando em NPs com propriedades superiores em comparação com aquelas sintetizadas por métodos químicos convencionais. A incorporação dessas NPs em membranas poliméricas para uso como biomaterial proposto é respaldada por evidências adicionais, destacando suas diversas aplicações biológicas.

3.2.3. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS DE CHI

A CHI é um biopolímero natural de polissacarídeo originado da quitina, que é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza. [7]. Nesse sentido, a CHI, tem sido amplamente utilizada em estruturas para aplicações de medicina regenerativa e cicatrização de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de interação celular e propriedades antibacterianas e antifúngicas. No entanto, a CHI apresenta algumas limitações quando aplicada em curativos, como baixa resistência mecânica e baixa atividade antibacteriana, o que compromete sua eficácia no tratamento de feridas [31,32].

Uma abordagem promissora desenvolvida por Bagheri e equipe [68], produziu nanofibras fabricadas a partir de CHI e óxido de polietileno (PEO), reforçadas com NPsAg e NPsZnO. Esses nanohíbridos demonstraram alta atividade antioxidante e antibacteriana contra *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse sentido, os resultados dos testes de viabilidade celular, determinou-se que a concentração ideal de NPsZnO e NPsAg nas nanofibras é de 0,2 e 0,08% p/v, respectivamente. Além disso, essas concentrações não apresentaram citotoxicidade nas células fibroblásticas, o que indica uma boa biocompatibilidade. Os estudos também mostraram que as nanofibras adicionadas com as NPs de Ag/ZnO são compatíveis com o sangue, conforme evidenciado pelos efeitos no tempo de coagulação. Além disso, observou-se uma migração e proliferação significativas de fibroblastos na região da ferida, o que indica um potencial para a cicatrização de feridas. Em resumo, os nanohíbridos desenvolvidos utilizando nanofibras CHI/PEO conjugadas com NPs de Ag/ZnO demonstraram ser biocompatíveis, antioxidantes e antibacterianos. Esses materiais mostraram potencial como curativos eficazes para o tratamento de feridas. Essa abordagem pode ajudar a combater as infecções bacterianas e reduzir a dependência excessiva de antibióticos. Nos estudos antibacterianos, observou-se uma alta sensibilidade de *S. aureus* em relação às esteiras compostas contendo as NPs, em comparação com *P. aeruginosa* e *E. coli*. Além disso, a avaliação da citotoxicidade não revelou toxicidade para as células fibroblásticas, e a viabilidade dos fibroblastos nas esteiras compostas aumentou significativamente, indicando que as esteiras compostas não apenas não apresentaram efeitos tóxicos, mas também constituem uma estrutura promissora para o crescimento celular. Este estudo demonstrou o uso simultâneo dessas duas NPs em combinação com nanofibras de CHI, acelerando a migração e proliferação de células fibroblásticas. Após 24 horas de tratamento, foi observado um reparo significativo nas feridas. Esses resultados indicaram que os andares de nanofibras de CHI/PEO contendo 8,3% de NPs Ag/ZnO podem ser uma escolha adequada para curativos que facilitem o processo de cicatrização da ferida. Portanto, avançar em estudos *in vivo* para aplicação em queimaduras e em estudos *in vitro* antidiabética seria uma etapa importante para explorar o potencial terapêutico dos nanohíbridos sintetizados neste estudo em diferentes contextos clínicos e expandir o conhecimento sobre suas aplicações biomédicas.

A abordagem do estudo conduzido por Qiu e colaboradores envolveu a preparação de membranas nanohíbridos flexíveis de CHI/ZnO por meio de um método sustentável e acessível,

utilizando a precipitação in situ. Posteriormente, essas membranas foram fixadas na matriz de CHI e convertidos em NPsZnO por interação com NaOH aquecido. Portanto, este trabalho oferece uma maneira eficaz de preparar membranas com nanohíbridos biocompatíveis e antibacterianos de CHI/ZnO, a membrana de CHI apresentou fraca atividade antibacteriana contra *E. coli*, enquanto a atividade antibacteriana contra *S. aureus* foi melhor. Portanto, como pesquisa futura, seria promissor adicionar um plastificante a membrana para ampliar a sua flexibilidade, demais estudos para adição de NPs conjugadas o que poderia potencialmente melhorar suas propriedades antibacterianas e ampliar a gama de aplicações do material [69].

No estudo conduzido por Shah e sua equipe, curativos à base de CHI fabricados pela *Medline Pharmaceuticals* em Chicago foram avaliados, demonstrando uma notável eficácia no controle de feridas em ratos diabéticos quando comparados aos curativos convencionais. Nesses estudos, observou-se que a CHI forma uma membrana gelatinosa nas feridas, o qual desempenha um papel crucial na coagulação sanguínea e promove uma cicatrização significativa. Além disso, a CHI possui propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e bioativas, o que a torna um material ideal para o tratamento de feridas. Materiais compostos contendo CHI têm sido desenvolvidos, incluindo aqueles carregados com neuropeptídeos e neurotensina, e têm demonstrado uma notável eficácia na cicatrização de feridas diabéticas, em comparação com materiais que contêm derivados simples de CHI. A adição dessas substâncias aos materiais compostos potencializa sua capacidade de promover a regeneração e a cicatrização do tecido danificado. Uma abordagem promissora tem sido a adicionadas NPs metálicas a CHI. Por exemplo, andadeiras contendo NPs de CHI/colágeno/Ag têm mostrado resultados positivos ao acelerar o processo de cicatrização. Isso se deve às propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias dessas NPs, que ajudam a prevenir infecções e reduzem a resposta inflamatória na ferida. Outra abordagem interessante é o uso de híbridos de CHI/NPsCu, que também têm demonstrado propriedades de cicatrização rápida em feridas diabéticas. No entanto, é importante ressaltar que a estabilidade do cobre nesse complexo ainda requer investigação adicional para garantir sua eficácia a longo prazo. Apesar dos resultados promissores obtidos em estudos com ratos, é necessário realizar mais pesquisas e ensaios clínicos

para avaliar a aplicação desses curativos à base de CHI e NPs em feridas de diabéticos humanos. No entanto, essas descobertas preliminares indicam um potencial significativo desses materiais para melhorar o tratamento de feridas em pacientes diabéticos [28].

A membrana de CHI apresenta diversas características que a tornam promissora como biomaterial, especialmente quando combinada com NPs. Essa abordagem amplia as possibilidades de aplicação, abrangendo propriedades antimicrobianas, citotóxicas, antidiabéticas e antioxidantes. Essa combinação representa um avanço significativo para o desenvolvimento de curativos cutâneos com diversas aplicações biológicas.

CAPÍTULO IV

Procedimentos Experimentais

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O amido ($C_6H_{10}O_5$)_n utilizado foi fornecido pela Dinâmica e pureza= 90%. Nitrato de zinco hexahidrato ($Zn(NO_3)_2 \cdot (6H_2O)$) (*Sigma-Aldrich*) com pureza= 98%, o nitrato de prata ($AgNO_3$) (*Sigma-Aldrich*) com pureza= 99%. Polivinilpirrolidona (PVP) (C_6H_9NO)_n (Dinâmica), pureza= 98% e densidade de 1,2g/cm³. CHI (Mw=110kDa (*Sigma-Aldrich*), pureza= 90% grau de desacetilação, e densidade de 1,2 g/cm³. Ácido acético (CH_3COOH) (*Vetec*). Glicerol ($HOCH_2CH(OH)CH_2OH$) (*Sigma-Aldrich*) com pureza= 99%, Tripolifosfato de sódio (TPP) ($Na_5P_3O_{10}$) (*Sigma-Aldrich*) com pureza= 85%. Utilizou-se água ultrapura para a preparação de todas as etapas de síntese, produzida em um sistema *Milli-Q® Merck Millipore*.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 PRODUÇÃO DE NPsZnO

Para a produção de NPsZnO, foi empregado o método de síntese verde conforme descrito por referências [69,70]. Na síntese, foram utilizados 5 mmol de nitrato de zinco hexahidratado ($Zn(NO_3)_2 \cdot (6H_2O)$) em 20 mL de água ultrapura, mantidos a uma temperatura de 50°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 g de amido, os quais foram homogeneizados por 3 horas para formar um gel. Posteriormente, a mistura foi transferida para um béquer e colocada em uma estufa a 120°C por 12 horas, resultando na obtenção de um xerogel. Em seguida, o xerogel foi submetido a um processo de maceração e levado para uma mufla a uma temperatura de 400°C por 6 horas em uma cápsula de porcelana, resultando na produção das NPsZnO.

4.2.2 PRODUÇÃO DE NANOHÍBRIDOS DE ZnO CONJUGADOS COM Ag OU Ag₂O.

Para a preparação das amostras de ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O, foram dissolvidos 2 mmol de AgNO₃ em 30 mL de água ultrapura para a amostra de ZnO/Ag, e 4 mmol de AgNO₃ na mesma quantidade de água para a amostra de ZnO/Ag₂O. Em seguida, 40,0 mmol de nanopartículas de

ZnO (NPsZnO) foram adicionados a essas soluções. A síntese dos nanohíbridos ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O foi realizada utilizando os métodos de fotorredução [70] e tratamento hidrotérmico [71]. A mistura resultante foi agitada por 60 minutos sob luz ambiente, seguida de um tratamento ultrassônico de 180 minutos. Posteriormente, as suspensões foram submetidas a um tratamento hidrotérmico a 180°C por 12 horas em uma autoclave de aço. Os produtos finais, os nanohíbridos ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O, foram obtidos após aquecimento em estufa a 60°C por 120 minutos. As amostras foram denominadas conforme apresentado na Tabela 01: ZnO para NPs de ZnO, ZnOAg para NPs de ZnO/Ag, e ZnOAg₂O para nanopartículas de ZnO/Ag₂O.

Tabela 01. Detalhamento das diferentes amostras de nanohíbridos produzidas neste estudo e suas respectivas nomenclaturas adotadas.

Amostras	Nomenclatura adotada
NPsZnO	ZnO
NPs(ZnO/Ag)	ZnOAg
NPs(ZnO/Ag ₂ O)	ZnOAg ₂ O

4.2.3 PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM CHI, GLI, PVP COM NANOHÍBRIDOS DE ZnO CONJUGADOS DE Ag OU Ag₂O.

Após a produção dos nanohíbridos, procedeu-se à fabricação de membranas poliméricas utilizando CHI. Com o intuito de conferir maior flexibilidade e diminuir a fragilidade das membranas de CHI, foi considerada a adição de um plastificante. Nesse contexto, o GLI foi escolhido como o plastificante proposto. Foram então estabelecidas diferentes proporções entre a CHI e o plastificante (GLI), nas porcentagens de 0%, 5%, 10% e 20% (ver Tabela 02) [9,33]. Os resultados desses processos foram as amostras de membranas de CHI com ou sem GLI [9].

Tabela 02. Detalhamento das amostras de CHI/GLI em variação de porcentagem do plastificante em 0%, 5%, 10% e 20%.

Amostras e proporções		Nomenclatura adotada
CHI	GLI	
100% (1g)	0%	CHI
95% (0,95g)	5% (0,05g)	CHI5
90% (0,9g)	10% (0,1g)	CHI10
80% (0,8g)	20% (0,2g)	CHI20

Após a seleção do método de moldagem/evaporação de solvente, conforme referenciado [9,67,72], procedeu-se com a dissolução de 1g de quitosana (CHI) em 50 mL de uma solução de ácido acético 2% (v/v) para a formação do gel polimérico. Durante esta fase, foi adicionada uma proporção específica de plastificante (GLI), conforme detalhado na Tabela 2.

Posteriormente, as amostras de CHI assim preparadas foram vertidas em uma placa de Petri com 8 cm de diâmetro para serem moldadas, com a evaporação do solvente ocorrendo naturalmente à temperatura ambiente. As membranas resultantes de CHI possuíam uma espessura aproximada de 30 μm . Para finalizar o processo, as membranas de CHI ou CHI/GLI foram submetidas à reticulação com 20 mL de uma solução aquosa de TPP a uma concentração de 25 mg/L. Em seguida, foram realizadas lavagens repetidas com água ultrapura. Após esta etapa, as membranas foram novamente deixadas para secar à temperatura ambiente [73].

Logo após, a produção das membranas de CHI, CHI5, CHI10 e CHI20, foram realizados testes de tração mecânica para avaliar as propriedades de resistência dessas membranas, as quais foram avaliadas de acordo com a norma *ASTM D882-10* [74]. Nesse sentido, os testes mecânicos foram realizados utilizando uma máquina de teste universal (*INSTRON 3367*) sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($53 \pm 3\%$). Posteriormente, a amostra que apresentou maior flexibilidade, que foi a CHI20, foi selecionada como matriz para adicionar os nanohíbridos produzidos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. Dessa forma, três variações de membranas foram desenvolvidas: CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O. A composição de cada

amostra, com e sem os nanohíbridos e suas respectivas nomenclaturas adotada, está detalhada na Tabela 03.

Tabela 03. Detalhamento das amostras de CHI/GLI com e sem os nanohíbridos e sua nomenclatura adotada.

Amostras					Nomenclatura adotada
CHI	GLI	ZnO	Ag	Ag ₂ O	
100% (1g)	0%	Sem	Sem	Sem	CHI
80% (0,8g)	20% (0,2g)	Sem	Sem	Sem	CHI20
80% (0,8g)	20% (0,2g)	Com (0,2g)	Sem	Sem	CHI20ZnO
80% (0,8g)	20% (0,2g)	Com (0,2g)	Com	Sem	CHI20Ag
80% (0,8g)	20% (0,2g)	Com (0,2g)	Sem	Com	CHI20Ag ₂ O

A metodologia empregada na fabricação das membranas contendo nanohíbridos foi conduzida de acordo com os seguintes procedimentos padronizados. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo PVP em uma proporção de 1:1 em massa com os nanohíbridos, utilizando água ultrapura como solvente. Essa formulação foi adotada visando a suspensão eficaz dos nanohíbridos na solução, promovendo sua dispersão homogênea na matriz polimérica [75].

O processo teve início com a agitação mecânica da solução contendo os nanohíbridos a uma temperatura de 50°C, seguida pela adição da solução de CHI/GLI. Após a completa incorporação dos componentes, a solução de CHI/GLI/NANOHÍBRIDOS foi mantida sob agitação mecânica por um período de 60 minutos. Em seguida, a solução foi submetida a um banho ultrassônico para assegurar a homogeneização da mistura e a eliminação de bolhas de ar. Posteriormente, a solução foi cuidadosamente vertida em uma placa de Petri e deixado para secar à temperatura ambiente até a formação da membrana polimérica. A etapa subsequente compreendeu a reticulação das membranas de CHI/GLI/NANOHÍBRIDOS utilizando uma solução de TPP, seguida por uma lavagem em água ultrapura para remoção de resíduos. Após essa etapa, as membranas foram novamente deixadas para secar à temperatura ambiente [76].

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.3.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-Vis

Para a obtenção de dados de absorção na faixa UV-Vis das amostras em estado sólido, foi empregado o espectrofotômetro *Ocean Optics HR2000*, equipado com uma fibra óptica e uma esfera integradora operando em modo de reflectância difusa. As medições foram realizadas na região espectral de 300 a 600 nm e foram adquiridas em temperatura ambiente.

4.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ACOPLADO COM A ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

O método empregado para a metalização das amostras envolveu a aplicação de uma fina camada de ouro, utilizando o equipamento de metalização *Cressington*, fabricado pela *Kurt J. Lesker* 108 (LCNT), disponível no Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCNT). Já as imagens e análise de EDS foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura *Jeol*, modelo JSM 6390LV/LGS, localizado no Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais. De forma geral fora utilizado um feixe de elétrons de operando em 10 kV. Esse procedimento permitiu uma análise detalhada da composição química das amostras, incluindo elementos como Zn e Ag.

4.3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EMISSÃO DE CAMPO (FESEM) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A caracterização dessas amostras foi conduzida para compreender suas propriedades morfológicas com mais detalhes. Nesse sentido, para análise por FESEM, foi utilizado um microscópio *JEOL JSM IT500-HR* operando em múltiplas energias, incluindo 10, 20 e 120 kV. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro para melhorar a condutividade elétrica e minimizar cargas superficiais. A análise das amostras também foi realizada por MET usando um microscópio *JEOL JEM1400 FLASH*, operando em 120 kV. As amostras foram preparadas através do gotejamento de uma suspensão aquosa das amostras em uma tela de cobre recoberta por duas camadas: uma de polímero condutor (*formva*) e uma camada de carbono. O solvente foi evaporado em uma estufa a 50°C. Logo após, as imagens obtidas foram analisadas utilizando o *software ImageJ* versão 1.53k *freeware* (versão *Java 1.8.0_172*).

4.3.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Os experimentos foram conduzidos utilizando um difratômetro *Shimadzu LabX DRX-6000*, operando no modo de varredura. A radiação utilizada foi $\text{CuK}\alpha$ (comprimento de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e um filtro de níquel, com uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 40 mA. Para as amostras produzidas, a velocidade de varredura foi de 2 graus por minuto, e a faixa de ângulos 2θ analisada variou de 10 - 80 graus, com um intervalo de passo de 0,02 graus. A análise de difração de raios X (DRX) foi realizada com o objetivo de identificar as fases presentes nas amostras poliméricas e nas NPs. Nesse sentido, foi realizado o refinamento de *Rietveld* de todo o padrão de DRX [77–79], dessa maneira, foi utilizada a função *pseudo-Voigt* modificada por *Thompson-Cox-Hastings* implementada no programa *Fullprof* [80]. A função de resolução instrumental para efeitos de alargamento foi obtida utilizando um padrão de silício (Si SMR640d NIST) ajustando o perfil dos picos com o *software WinPlotr* [81]. A dependência angular da largura total a meia altura do pico (β) foi descrita pela fórmula de *Cagliotti* [82] e a anisotropia do alargamento de tamanho foi elucidada utilizando um modelo de harmônicos esféricos (SPH).

4.3.5 PROPRIEDADE MECÂNICA DE TRAÇÃO

Este estudo teve como objetivo determinar a quantidade ideal de plastificante a ser adicionada na membrana de CHI. A propriedade de tração das membranas de CHI pura e das suas variações com plastificantes foram avaliadas de acordo com a norma ASTM D882-10 [74]. A máquina de teste universal (*INSTRON 3367*) sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($53 \pm 3\%$) foi utilizada nos testes.

Amostras de membranas com dimensões de 100 mm de comprimento e 10 mm de largura foram fixadas nas garras do equipamento, com uma distância inicial de separação de 50 mm e uma velocidade de puxamento de 0,2 mm/min. A célula de carga utilizada tinha capacidade para 100N. A tensão na ruptura, o alongamento na ruptura e o Módulo de *Young* foram diretamente calculados pelo *software* do equipamento (*Bluehill*, versão 2.22).

4.3.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os grupos funcionais presentes no amido em pó, no precursor xerogel das NPs e nos nanohíbridos foram identificados por meio de espectroscopia infravermelha com transformada de *Fourier* (FTIR). Este método utilizou pastilhas de KBr e um espectrofotômetro *PerkinElmer Spectrum Two™* para realizar medições na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com uma resolução de 8 cm^{-1} .

4.3.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A metodologia para a análise termogravimétrica (TGA) envolveu a realização de testes em diversas amostras. Inicialmente, foram analisados o amido em pó e o xerogel e os nanohíbridos produzidos, com uma faixa de temperatura de 25 a 1000°C. Posteriormente, para as membranas produzidas, a temperatura estabelecida foi de 25 a 600°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em uma atmosfera inerte de nitrogênio. Todas as análises termogravimétricas foram conduzidas em um analisador térmico simultâneo TGA/DTA, NETZSCH STA 449 F1 Jupiter, com fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.

4.3.8 ÂNGULO DE CONTATO

Para os testes de molhabilidade da superfície foi avaliada por meio da medida de ângulo de contato estático, nesse sentido, foi aplicada a metodologia para as membranas de CHI e suas respectivas proporções (ver Tabela 02). Uma gota de 5 μL de água destilada foi depositada sobre uma amostra de membrana. O ângulo de contato foi medido pela análise da imagem da gota, que foi capturada pelo microscópio digital e registrada em computador. Os valores do ângulo de contato foram obtidos utilizando o *plugin* LB-ADSA e logo após o *software ImageJ*. Esse *plugin* faz uso do método LBADSA (do inglês *low-bond axisymmetric drop shape*, “*formato de gota axissimétrica de baixa ligação*”) [83].

4.3.9 PERMEAÇÃO AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)

A técnica de permeação ao vapor de água foi empregada para avaliar a permeação ao vapor de água pelas membranas de CHI produzidos e suas respectivas proporções. A metodologia aplicada neste trabalho seguiu o método gravimétrico estático conforme descrito na norma internacional ASTM E 96/E96 M-05 [84], com adaptações baseadas no trabalho de Martelli *et al* [85]. Esse método envolve a medição da massa de sílica ativada, que pesa aproximadamente $3,5\text{g} \pm 0,1\text{g}$, colocada em recipientes hermeticamente selados contendo as membranas preparadas. Esses recipientes foram então armazenados em um dessecador contendo uma solução saturada de cloreto de sódio para manter uma umidade relativa controlada. Nesse sentido, onde um medidor de umidade do ar e temperatura é utilizado para monitorar as condições ambientais. Os vapores de água entram no sistema, e os recipientes contendo as membranas de CHI são hermeticamente selados. Além disso, a impermeabilização adequada ao redor dos recipientes é garantida. A sílica ativada é utilizada para absorver os vapores de água, resultando em um aumento na massa da sílica ativada ao longo do tempo, o que é uma medida da quantidade de vapor de água que permeou as membranas. Essa técnica permite avaliar a capacidade das membranas de CHI de permitir a passagem de vapor de água, fornecendo informações valiosas sobre sua permeabilidade e sua aplicabilidade em diversas condições ambientais.

Conforme a metodologia adotada, o grau de absorção da amostra em estudo foi determinado através do aumento de massa da sílica ativada. Foram realizadas pesagens em intervalos de 24 horas ao longo de um período de 7 dias. A taxa de transmissão de vapor d'água (TVA) foi calculada aplicando a Equação 01

$$TVA = \frac{\Delta m / \Delta t}{A} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo “A” a área da membrana exposta em metros quadrados (m^2), Δm a variação da massa em gramas (g) e Δt é a variação do tempo em dias.

Na metodologia apresentada, o coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinado utilizando a 1ª Lei de Fick, que descreve a difusão de substâncias através de um material e é uma abordagem comum para calcular coeficientes de permeabilidade em sistemas de transporte de massa. A Equação 02, baseada na 1ª Lei de Fick, foi empregada para calcular o coeficiente PVA neste estudo. Essa equação é essencial para quantificar a taxa de difusão de vapor d'água através das membranas de CHI em questão.

$$PVA = \frac{TVA}{S(R1-R2)} * x \quad \text{Equação 02}$$

Sendo “S” a pressão de saturação do vapor d'água na temperatura do teste, R1 a umidade relativa no dessecador mantida a $60\% \pm 1$, R2 a umidade relativa dentro da célula do sistema mantida em 0%, e “x” a espessura da membrana em metros (m).

4.4. AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

4.4.1. SCREENING DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes de suscetibilidade microbiana foram conduzidos empregando o método de difusão em ágar *Mueller-Hinton*, seguindo rigorosamente as diretrizes estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* em 2007 [86], referenciado como fonte. Para garantir resultados precisos e confiáveis, cada microrganismo foi submetido a esse método em triplicata, em ambas as etapas do estudo. Foram utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* derivada ATCC 25922 e *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para cada microrganismo testado [87].

4.4.2. TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os testes de atividade antimicrobiana foram conduzidos nas culturas de microrganismos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* derivada ATCC 25922 e *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, previamente crescidas durante a noite em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), foram ajustadas para o padrão 0,5 de *Mac Farland* e inoculadas em placas de *Petri* contendo ágar *Muller-Hinton*, com um pH ajustado entre 7,2-7,4, que havia sido solidificado previamente e semeado com uma alça de *Drigalsky*. Em seguida, discos das membranas com 0,8

cm² foram posicionados sobre a superfície do meio contendo os microrganismos. Para o controle negativo, os constituintes das membranas foram utilizados, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, é uma organização sem fins lucrativos que desenvolve e publica normas voluntárias para aprimorar a qualidade dos serviços laboratoriais de saúde em todo o mundo) em 2003. O controle positivo consistiu na aplicação do antimicrobiano gentamicina (50 µg/mL), cuja atividade contra as cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela medida dos halos de inibição, em milímetros. A interpretação dos resultados seguiu as recomendações do CLSI em 2007 [86]. Nesse contexto, os halos de inibição formados foram comparados com uma tabela de referência, classificando os microrganismos como resistentes (zona de inibição inferior a 8 mm), intermediários (de 9 a 15 mm) e sensíveis (de 15 a 25 mm) [87].

4.4.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para avaliar a CIM das amostras produzidas de membranas e nanohíbridos com atividade antimicrobiana, foram realizados testes quantitativos em triplicata para cada microrganismo, utilizando o método de microdiluição em caldo proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Esse método permitiu a visualização da menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento do microrganismo. A técnica empregada consistiu em utilizar uma placa de ELISA com 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de caldo *Mueller-Hinton* juntamente com 50 µL das amostras em concentrações variadas de 6,25 µg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹, além de 50 µL do inóculo. Para controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas meio de cultura para verificar se não haveria contaminação do meio, enquanto poços com o inóculo e meio de cultura foram utilizados como controle positivo para análise da viabilidade das cepas testadas. Além disso, poços com meio de cultura e dimetilsulfóxido (DMSO), que é usado para auxiliar a solubilização das amostras, e suspensão bacteriana também foram utilizados para verificar se o DMSO não inibia o crescimento das bactérias testadas. Após a incubação durante 24 horas a 35 ± 2°C, foram adicionados em cada poço 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,01%, seguido de incubação por mais uma hora. A presença de coloração

rosa/avermelhada indicava a presença de metabolismo dos microrganismos no meio, enquanto a coloração azul indicava ausência de crescimento bacteriano [87].

4.4.4. TESTE ANTIDIABÉTICO

Os estudos antidiabéticos *in vitro* foram conduzidos com o propósito de avaliar a capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase pelas amostras em análise. Para realizar essa avaliação, foram empregados o método modificado de Caraway [88] e o método colorimétrico enzimático. Resumidamente, o procedimento envolveu a incubação das amostras em uma solução contendo amido a uma concentração em 5 mmol/L e tampão de fosfato com uma concentração em 500 mmol/L. Essa incubação ocorreu a uma temperatura de 37°C por um período de 2 min, seguido pelo tratamento em um banho de água a 37°C por aproximadamente 7 min. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de iodato de potássio a uma concentração em 50 mmol/L, 0,5 mL de iodeto de potássio a uma concentração em 600 mmol/L e 0,5 mL de ácido clorídrico a uma concentração em 200 mmol/L a cada uma das soluções. A reação foi então completada pela adição de 4 mL de água destilada. A atividade de inibição da α -amilase foi determinada pela análise da absorbância máxima da solução azul formada durante a reação, e isso foi realizado utilizando um espectrofotômetro. A Equação 03 foi aplicada para calcular a atividade de inibição da α -amilase. Esse protocolo experimental permitiu avaliar a capacidade das amostras de inibir a ação da enzima α -amilase, que desempenha um papel importante na digestão de amido. A inibição da α -amilase pode ser relevante no contexto do diabetes, pois pode contribuir para a regulação dos níveis de glicose no sangue, tornando esses testes uma etapa fundamental na avaliação do potencial antidiabético das amostras em análise.

$$\text{Amilase} = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 800 \quad \text{Equação 03}$$

Sendo: A_c = absorbância do controle; A_a = absorbância da amostra

Para avaliar a atividade inibitória da enzima α -glicosidase, um protocolo específico foi seguido. Inicialmente, 100 μ L da solução de α -glicosidase, com uma concentração de 0,1

unidade/mL, foi combinado com 200 μ L de uma suspensão contendo os produtos em uma concentração de 100 μ g/mL. Essa mistura foi incubada a uma temperatura de 37°C por um período de 1 hora. Após a incubação, 10 mM de *p-nitrofenil- α -D-glicopiranosose* (pNPG) foi adicionado à mistura e incubado por mais 10 min a 37°C. A reação foi então interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de Na₂CO₃ com uma concentração de 0,1 M. A absorbância máxima do *p-nitrofenol* liberado como resultado da reação do pNPG foi registrada usando um leitor de placas Elisa de 96 poços (*SpectraMax M5, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA*). Esse procedimento experimental permitiu avaliar a capacidade das amostras em inibir a atividade da enzima α -glicosidase, que desempenha um papel importante na digestão de carboidratos complexos em açúcares simples. A inibição dessa enzima pode ser relevante no contexto do diabetes, pois pode ajudar a reduzir a absorção de açúcares, contribuindo assim para o controle dos níveis de glicose no sangue [88].

O reagente número 1, que consiste em uma solução com as seguintes concentrações: tampão de 36 mmol/L, fenol de 20 mmol/L, 4-aminoantipirina de 5 mmol/L, glicose oxidase de 10.000 U/L e peroxidase de 700 U/L, foi preparado para uso nos experimentos. No procedimento experimental, 1 mL do reagente número 1 foi incubado a uma temperatura de 37°C em cada tubo de amostra e em cada tubo padrão, durante um período de 10 min. Após a incubação, 10 μ L da amostra e do padrão foram adicionados para a leitura das absorbâncias das amostras, as quais foram realizadas em 505 nm. A Equação 04 foi aplicada para calcular a atividade de inibição da α -glicosidase nas amostras produzidas do respectivo trabalho.

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 100 \quad \text{Equação 04}$$

4.4.5. TESTE ANTIOXIDANTE

O ensaio antioxidante foi conduzido utilizando o *2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)* como uma fonte de radicais livres. Nesse sentido, o ácido gálico foi empregado como controle positivo para avaliar a atividade antioxidante das amostras, a qual foi expressa em equivalentes de ácido gálico (μ g/mL). Primeiramente, uma solução estoque de *DPPH* a uma concentração de 75 μ g/mL em metanol foi preparada para a construção da curva de calibração do *DPPH*.

Posteriormente, quantidades apropriadas das amostras foram adicionadas à solução de *DPPH*, resultando em concentrações finais de 1, 10 e 50 µg/mL em um volume total de 3 mL. As suspensões resultantes foram mantidas em ambiente escuro à temperatura ambiente por um período de 20 min antes da análise. A atividade de eliminação de radicais livres pelas amostras foi avaliada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (modelo SP-22, Biospectro) para medir a absorbância máxima a 515 nm. A Equação 05 foi aplicada para calcular a atividade de eliminação de radicais, enquanto a curva de calibração do *DPPH* foi construída com base nos valores de absorbância obtidos a 515 nm. A equação da curva de calibração do *DPPH* foi determinada como $C = 0,6608 - 0,0546A$ ($R^2 = 0,968$), em que C representa a concentração de *DPPH* na solução e A é a absorbância medida a 515 nm. Esta equação permitiu estimar os valores de IC_{50} das amostras para as três concentrações analisadas. Em resumo, este ensaio proporcionou uma avaliação quantitativa da capacidade das amostras em neutralizar radicais livres, um indicador importante da atividade antioxidante [89].

$$\% \text{ Eliminação de radicais} = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100 \quad \text{Equação 05}$$

4.4.6. CITOTOXICIDADE

Os macrófagos (linha celular J774) foram cultivados em meio RPMI 10% suplementado com soro fetal bovino (SFB), em uma câmara úmida a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). A viabilidade das células J774 (2 x 10⁴ células) foi avaliada em triplicata após 24 horas de exposição contínua aos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. A medição da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de redução do MTT a formazan. Seguindo o protocolo experimental, as células foram inicialmente aderidas a placas de 96 poços, e o meio de cultura foi posteriormente substituído por 200 µL de meio contendo os extratos e frações diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5%, nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL. As placas foram então incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de uma solução de 0,5 mg/mL do corante MTT, previamente filtrado através de membrana *Milipore* de 0,22 µm. As placas foram incubadas por 3 horas para permitir a redução do MTT a formazan. Após a incubação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente, e 200 µL de

DMSO foram adicionados a cada poço para solubilização do formazan. O conteúdo foi transferido para uma nova placa e submetido à leitura no leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ajustado para uma absorvância de 570 nm [90]. Para análise, os resultados foram normalizados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ VC} = [\text{DO (células tratadas)} - \text{DO (branco)}] / [\text{DO (controle)} - \text{DO (branco)}] \times 100$$

Equação 06

VC corresponde à viabilidade celular e DO refere-se à densidade ótica

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios biológicos foram obtidos em triplicata e expressos como valor médio. A significância estatística foi avaliada usando a análise de variância ANOVA de um fator com um nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada usando o *Origin*© 2016 b9.3.226 (*OriginLab Corporation*, disponível em www.originlab.com).

CAPÍTULO V

Resultados e discussão

SUBCAPÍTULO 5.1

Resultados e discussão

Caracterização dos Nanohíbrido de ZnO/Ag ou ZnO/Ag₂O

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SUBCAPÍTULO - CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHÍBRIDOS DE ZnO/Ag OU ZnO/Ag₂O

Na Figura 03, os espectros de FTIR do amido puro e do xerogel são apresentados, destacando algumas de suas principais bandas. A banda larga em 3402 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila O-H associados à estrutura química do amido [53]. A banda centrada em 2932 cm^{-1} é atribuída a vibração de estiramento do grupo C-H devido a átomos de carbono alifáticos [91,92]. A banda em 1650 cm^{-1} representa a deformação angular simétrica de O-H ligado à água molecular [93], enquanto a banda em 1388 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico de C-O [94]. No xerogel, uma banda em 1735 cm^{-1} é observada, característica apenas de sua estrutura, relacionada à vibração de estiramento do grupo carbonila C=O, comum em compostos orgânicos contendo cetonas ou aldeídos, o qual sugere a formação desses composto químicos após o processo de calcinação [95]. A banda proeminente entre 1200 e 1100 cm^{-1} , reconhecida como região de identificação para carboidratos, está associada à vibração de estiramento de C-O-H [96].

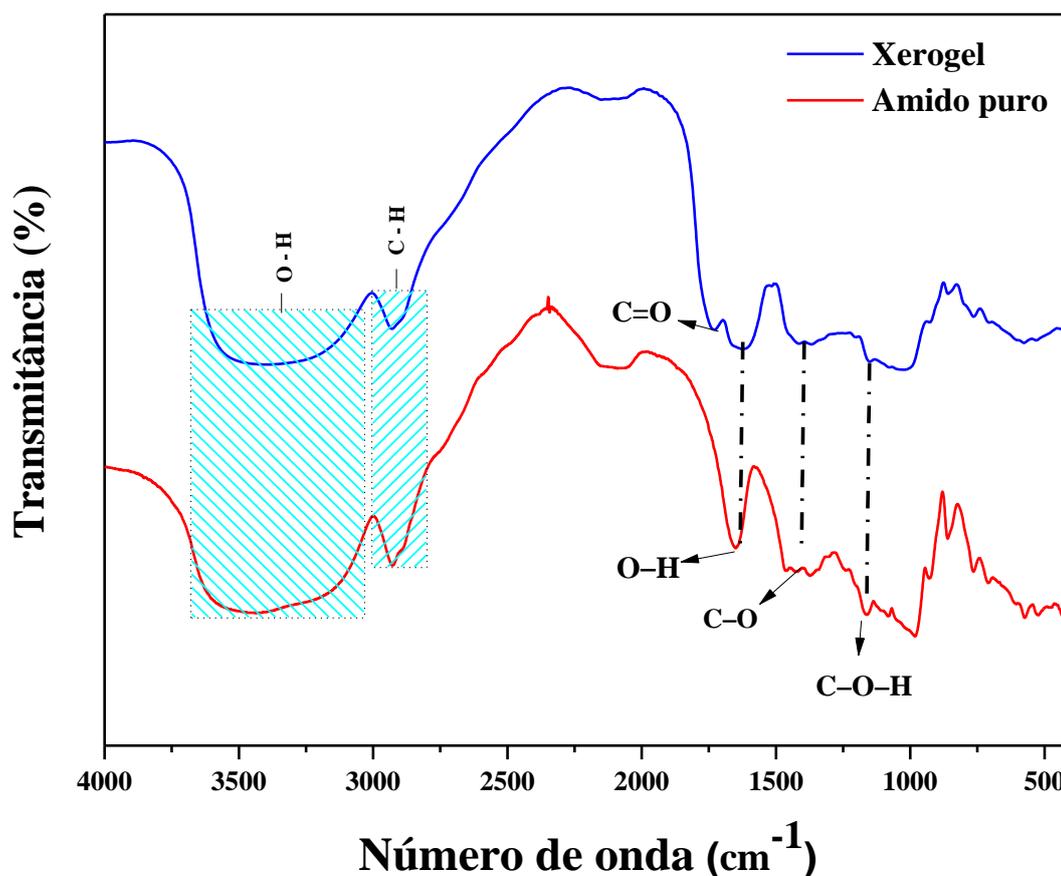


Figura 03. Espectro de FTIR do xerogel e do amido puro.

Os espectros de FTIR das NPs de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O são apresentados na Figura 04, o qual evidencia a preservação da composição química do ZnO nas amostras das NPsZnO antes e após a formação dos nanohíbridos ZnO/Ag [97] e ZnO/Ag₂O [98]. As bandas localizadas em 1385 e 1039 cm⁻¹, relacionadas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico de C–O advindas do amido [94], as bandas em 3460 e 1625 cm⁻¹ representam a deformação angular simétrica de O-H ligado à água molecular nas NPs [99].

É notável que os grupos funcionais associados aos subprodutos da hidrólise e do tratamento térmico foram mantidos, indicando que não foram totalmente eliminados durante o processo de calcinação [95]. A banda intensa centrada em 465 cm⁻¹ é atribuída ao modo de estiramento

vibracional da ligação Zn–O, consolidando a presença da composição química do ZnO nas NPs [100,101].

Esses resultados destacam a importância da abordagem de síntese verde na obtenção de nanohíbridos, evidenciando a sustentabilidade do processo de fabricação [102]. Métodos como hidrotermal [103] e fotorredução [70], utilizados na conjugação de NPs de Ag ou Ag₂O, minimizam o consumo de reagentes químicos e reduzem a geração de resíduos tóxicos, alinhando-se com os princípios da química verde [104].

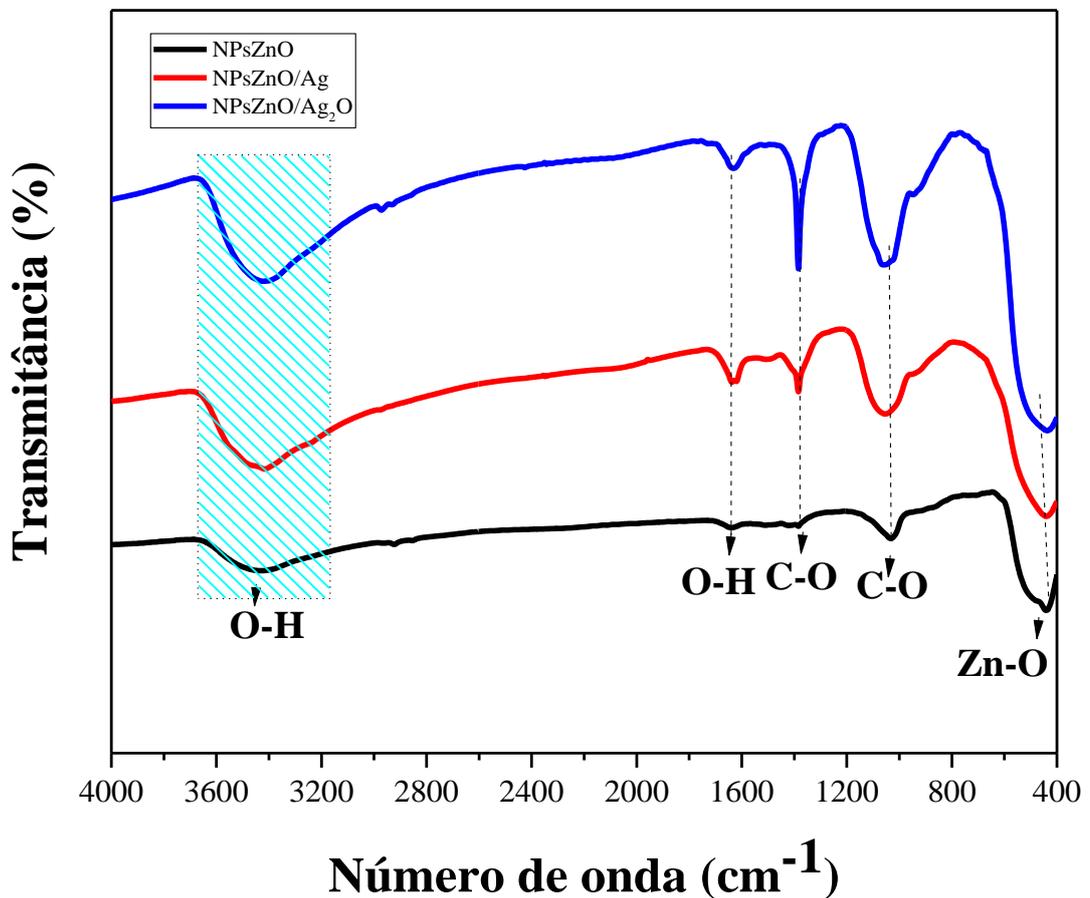


Figura 04. Espectros de FTIR de nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O.

As medidas de espectroscopia UV-Vis são apresentadas na Figura 05. Nas NPsZnO, foi identificada uma cor característica branca, conforme ilustrado na Figura 05a [105]. O espectro de absorvância das NPsZnO revelou uma banda centrada em 390 nm devido à transição $O\ 2p \rightarrow$

Zn 3d [53,62]. Estudos anteriores também relataram uma banda de absorção semelhante para NPsZnO produzidas por diferentes métodos [106].

Os espectros de UV-Vis dos nanohíbridos de ZnO/Ag (Figura 05b) e ZnO/Ag₂O (Figura 05c) revelaram uma banda adicional centrada em 435 nm, correspondente à ressonância de plasmon de superfície de Ag⁰ [107]. Na Figura 05c, observa-se uma diminuição na intensidade dessa banda, sugerindo possível *damping* no processo de oxidação da amostra, o qual sugere a presença de NPsAg₂O na amostra de ZnO/Ag₂O [108].

Nos gráficos de *Tauc* apresentados na Figura 05d, observou-se um aumento no intervalo de banda óptica dos nanohíbridos em 3,7% e 4,7% para ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O, respectivamente, em comparação com as NPsZnO sintetizadas (2,95 eV). Esse aumento sugere a presença de partículas menores, o que é consistente com os resultados de MET, que apresentam morfologia superficial de partículas menores de Ag e Ag₂O [109].

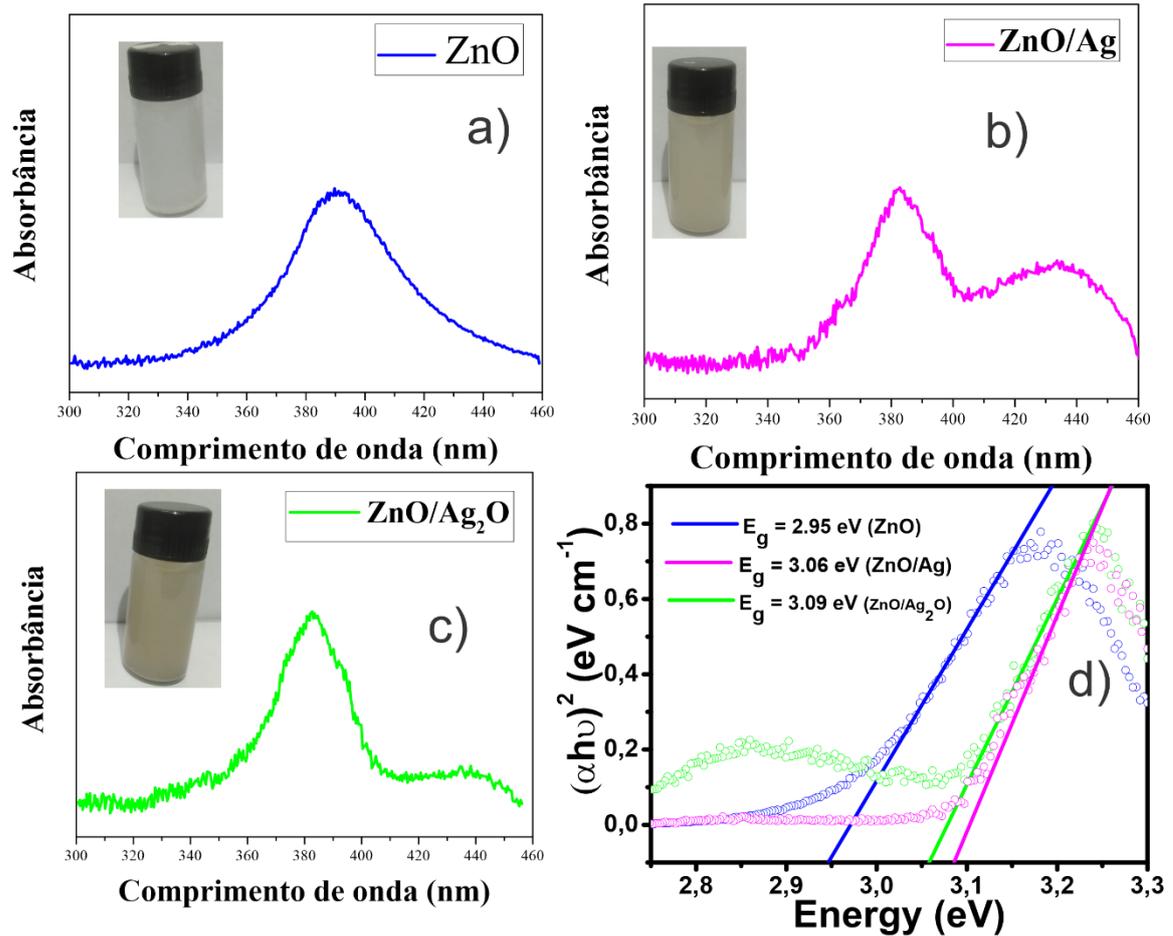


Figura 05. Espectro de UV-Vis das NPsZnO a), ZnO/Ag b), ZnO/Ag₂O c) e a energia de *gap* óptico (E_g) d).

O padrão de difração de DRX do xerogel foi apresentado na Figura 6, evidenciando uma estrutura típica e caracteristicamente amorfa, conforme visualmente observado na imagem fornecida. O padrão exibiu um halo na faixa de 10° a 30° [110].

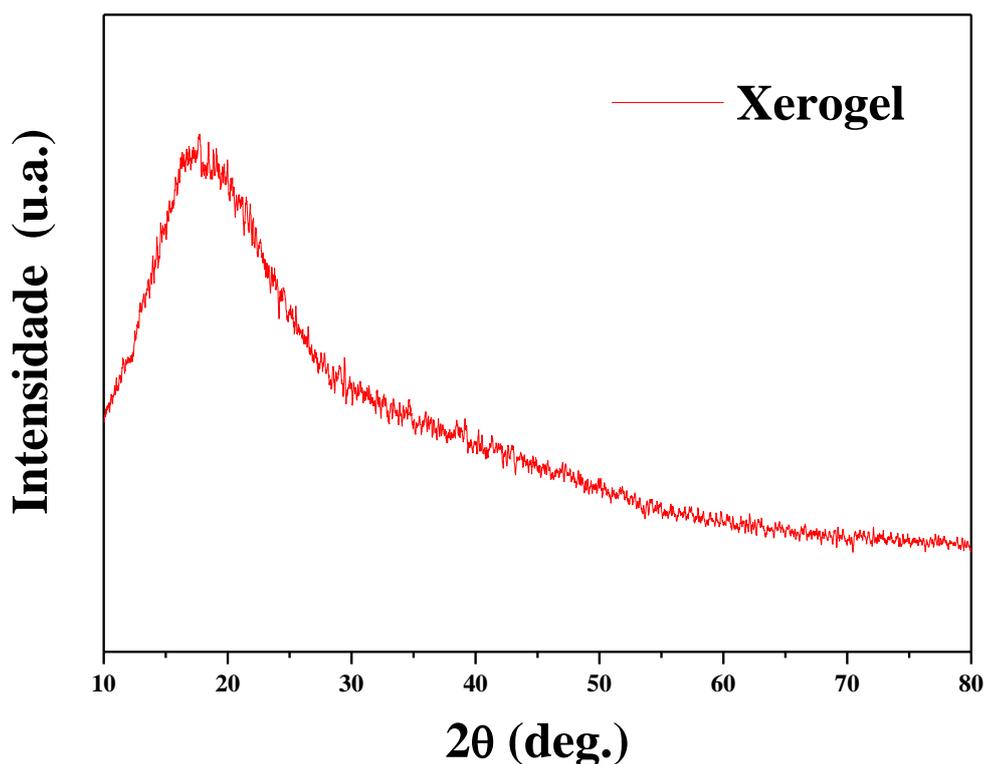


Figura 06. O padrão de difração de DRX do xerogel.

A Figura 07a apresenta os padrões de difração de DRX observados e calculados dos nanohíbridos obtidos neste estudo. As NPsZnO cristalizaram em uma estrutura similar à *wurtzita* (grupo espacial P63mc, ICSD#082028), exibindo planos cristalográficos (110), (002), (101), (102), (110), (103) e (112) (Figura 07b), que também foram preservados na estrutura dos nanohíbridos [94].

Na Figura 07c, é apresentado o padrão de difração de DRX da amostra de ZnO/Ag, o qual demonstra um pico localizado em 38° correspondente ao plano (111), além de um halo amorfo de baixa intensidade característico das NPsAg. Esse resultado é suportado pela presença proeminente dos planos cristalográficos (111) e (200) posicionados em $2\theta = 38^\circ$ e $2\theta = 44,3^\circ$, respectivamente, indicando uma estrutura cúbica metálica de Ag pertencente ao grupo espacial $Fm\bar{3}m$ (ICSD#604631) [67,70].

Na Figura 07d, a amostra de ZnO/Ag₂O revela uma fase secundária que pode ser atribuída à estrutura cúbica semelhante à estrutura tipo cuprita do Ag₂O, pertencente ao grupo espacial

$Pn\bar{3}m$ (ICSD#031058). Essa conclusão é suportada pela presença proeminente dos planos cristalográficos (111) e (200) centrados em $2\theta = 32,75^\circ$ e $2\theta = 38,02^\circ$, respectivamente. Essas descobertas sugerem a formação de dois diferentes nanohíbridos, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O, evidenciando a presença das fases secundárias de Ag e Ag₂O nas respectivas amostras [111].

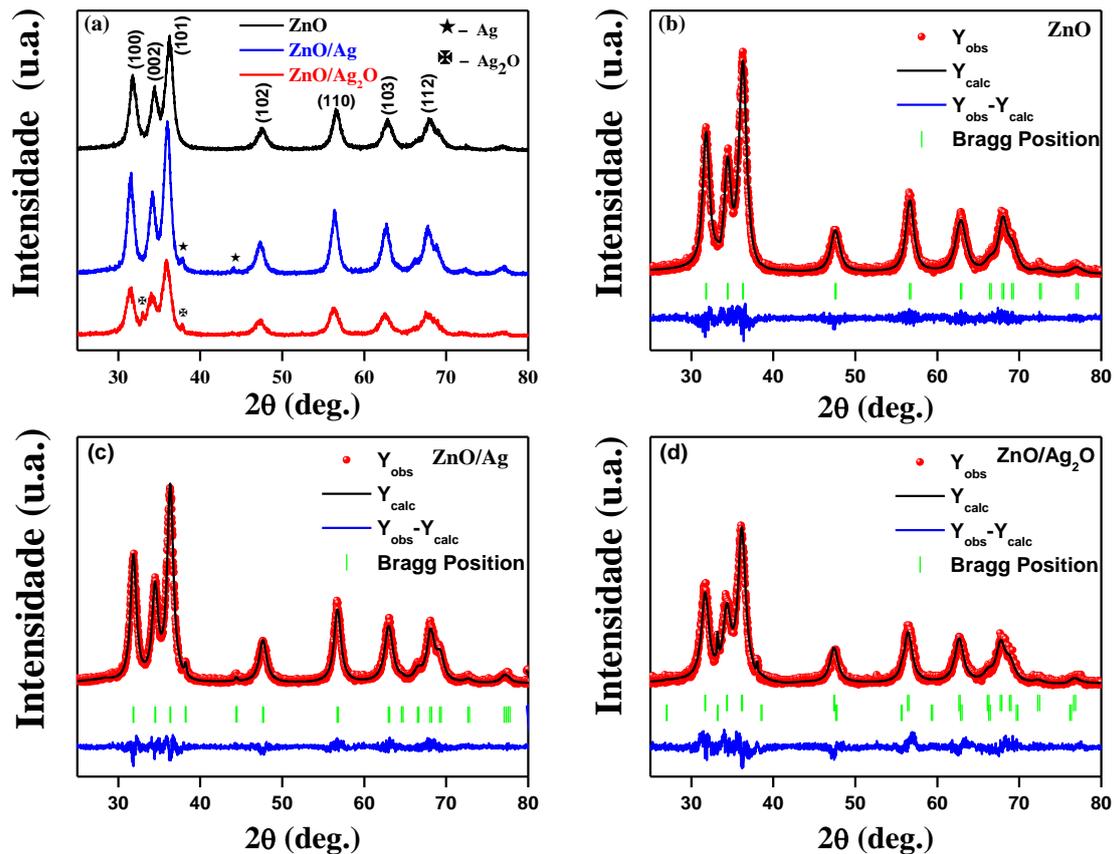


Figura 07 a) A análise de DRX (Difração de Raios-X) das amostras NPsZnO, NPs ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag₂O, b) A análise de refinamento de *Rietveld* das ZnONPs, c) NPs ZnO/Ag e d) NPs ZnO/Ag₂O.

Uma análise mais detalhada da estrutura das NPsZnO e dos nanohíbridos ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O foi obtida por meio de refinamento de *Rietveld*, cujos parâmetros relevantes estão resumidos na Tabela 04. Os parâmetros de qualidade do refinamento, incluindo $R_p = 9-15$, $R_{wp} = 12-19$, $R_e = 10-14$ e $\chi^2 = 1-2$; mostram que os ajustes são confiáveis. A estrutura hexagonal do ZnO, a fase cúbica do Ag e a fase cúbica do Ag₂O são sugeridas. As constantes de rede $a = b = 3-4 \text{ \AA}$ e $c = 5-6 \text{ \AA}$ das NPs de ZnO do tipo *wurtzita* mudaram muito pouco após a formação dos nanohíbridos, o que também é confirmado pela anisotropia assumida semelhante ($c/a \sim 2$). Como

pode ser observado, o volume da célula sofreu uma pequena compressão de ZnO (48 \AA^3) para ZnO/Ag (47 \AA^3), que aumentou ainda mais para 48 \AA^3 em ZnO/Ag₂O [95,112]. Esses resultados representam, com boa aproximação, o valor encontrado para o material estabelecido ICSD#082028 [113]. As fases secundárias de Ag e Ag₂O exibiram volumes de célula de 68 e 102 \AA^3 , respectivamente, o que também está em bom acordo com os materiais brutos ICSD#604631 [114] e ICSD#031058 [115]. O tamanho do cristalito dos nanocristais de ZnO foi encontrado na faixa de 14-17 nm, enquanto as NPs de Ag e Ag₂O apresentaram tamanhos de 7 e 6 nm, respectivamente.

Tabela 04. Informações cristalográficas e parâmetros refinados relevantes dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O.

Parâmetros	Amostras		
	NPs ZnO	NPs ZnO/Ag	NPs ZnO/Ag ₂ O
Fatores de Qualidade do Refinamento			
Rp	10	9	15
Rwp	13	12	19
Re	12	10	14
χ^2	1	2	2
Fase do ZnO			
Estrutura cristalina	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₃ mc	P6 ₃ mc	P6 ₃ mc
Constantes de rede	***	***	***
a=b (Å)	3	3	3
c (Å)	5	5	5
c/a	2	2	2
Volume da célula	***	***	***
V _c (Å ³)	48	47	48
Tamanho do cristalito			
D _{DRX} (nm)	16	14	17
Fase do Ag			
Estrutura Cristalina	-	Cúbica	-
Grupo Espacial	-	Fm $\bar{3}$ m	-
Constantes de rede	***	***	***
a=b=c (Å)	-	4	-
Volume da célula	***	***	***
V _c (Å ³)	-	68	-
Tamanho do cristalito	***	***	***
D _{DRX} (nm)	-	7	-
Fase do Ag₂O			
Estrutura Cristalina	-	-	Cúbica
Grupo Espacial	-	-	Pn $\bar{3}$ m
Constantes de rede	***	***	***
a=b=c (Å)	-	-	5
Volume da célula	***	***	***
V _c (Å ³)	-	-	102
Tamanho do cristalito	***	***	***
D _{DRX} (nm)	-	-	6

A análise morfológica das NPsZnO, realizada por MEV, revelou a presença de aglomerados na morfologia superficial, conforme demonstrado na Figura 08a [116–119]. Além disso, o EDS foi utilizado para analisar a composição química superficial das NPsZnO. Os espectros obtidos nas Figuras 08b, c e d confirmam a presença do elemento Zn [117,118].

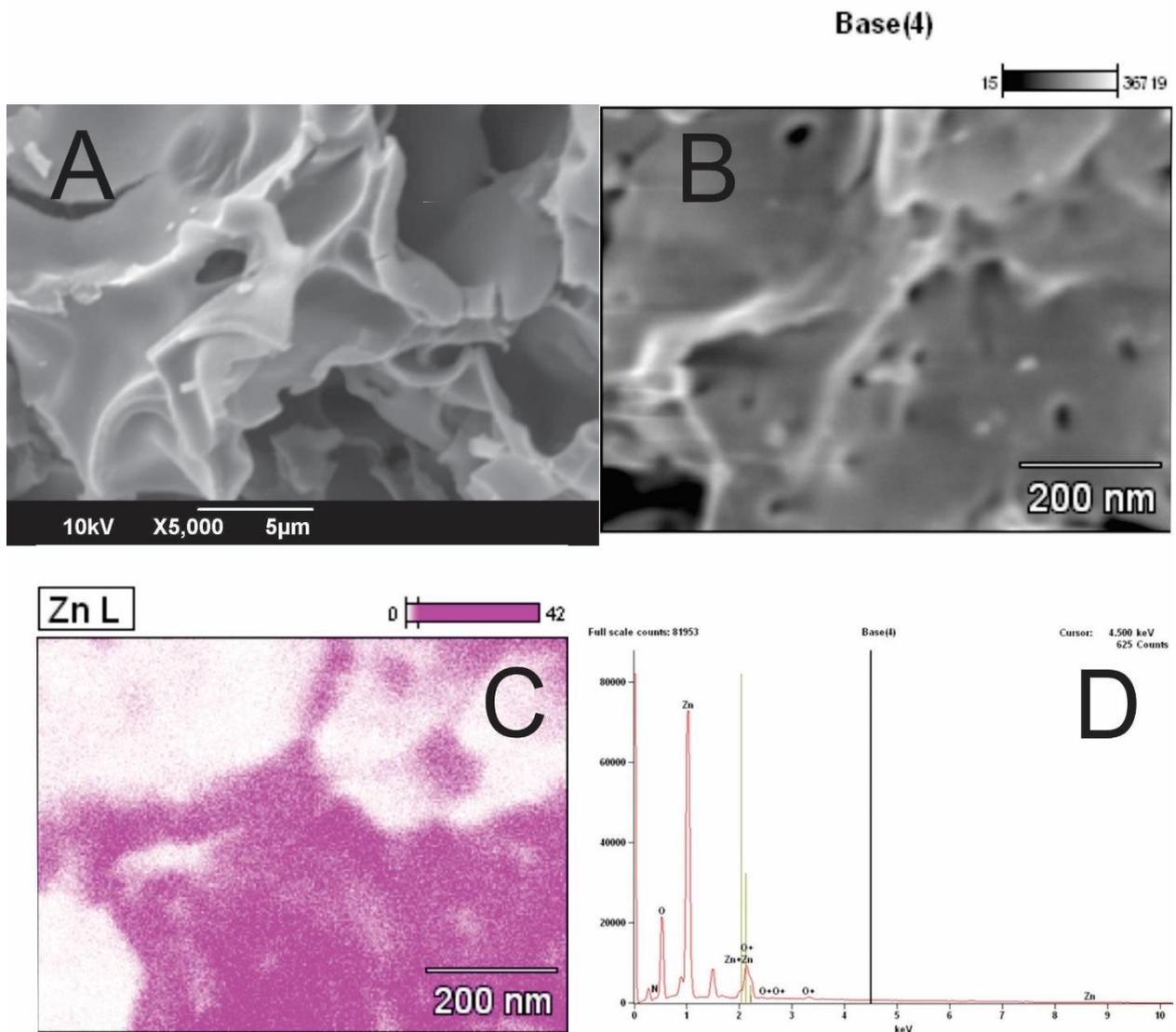


Figura 08. a) Imagens de MEV b) Imagem do EDS c) Imagem do EDS da amostra do *spectror* de Zn e d) EDS dos picos de elementos presentes nas NPsZnO.

Na Figura 09 a), apresenta-se uma imagem de MEV das NPsZnO e exibe característica de aglomerados na morfologia de superfície da amostra [120]. Na Figura 09 b), a caracterização morfológica utilizando o FESEM revela que as NPsZnO estão aglomeradas com formatos esféricos [121]. Na Figura 09c), são apresentadas imagens obtidas por MET das NPsZnO, evidenciando uma variedade de formas esféricas [94]. O cálculo do diâmetro médio das NPsZnO resultou em 24 ± 8 nm, como demonstrado na Figura 09d), entretanto, esses valores apresentam uma ligeira discrepância em relação aos obtidos por meio da análise de difração de DRX com cálculos e refinamentos de *Rietveld* demonstrados anteriormente (Tabela 04), o que sugere a

possibilidade de NPs com tamanhos variáveis das NPsZnO. Essa faixa de tamanho médio está em conformidade com outros estudos, que indicam diâmetros médios de NPsZnO variando entre 10 e 40 nm [122,123].

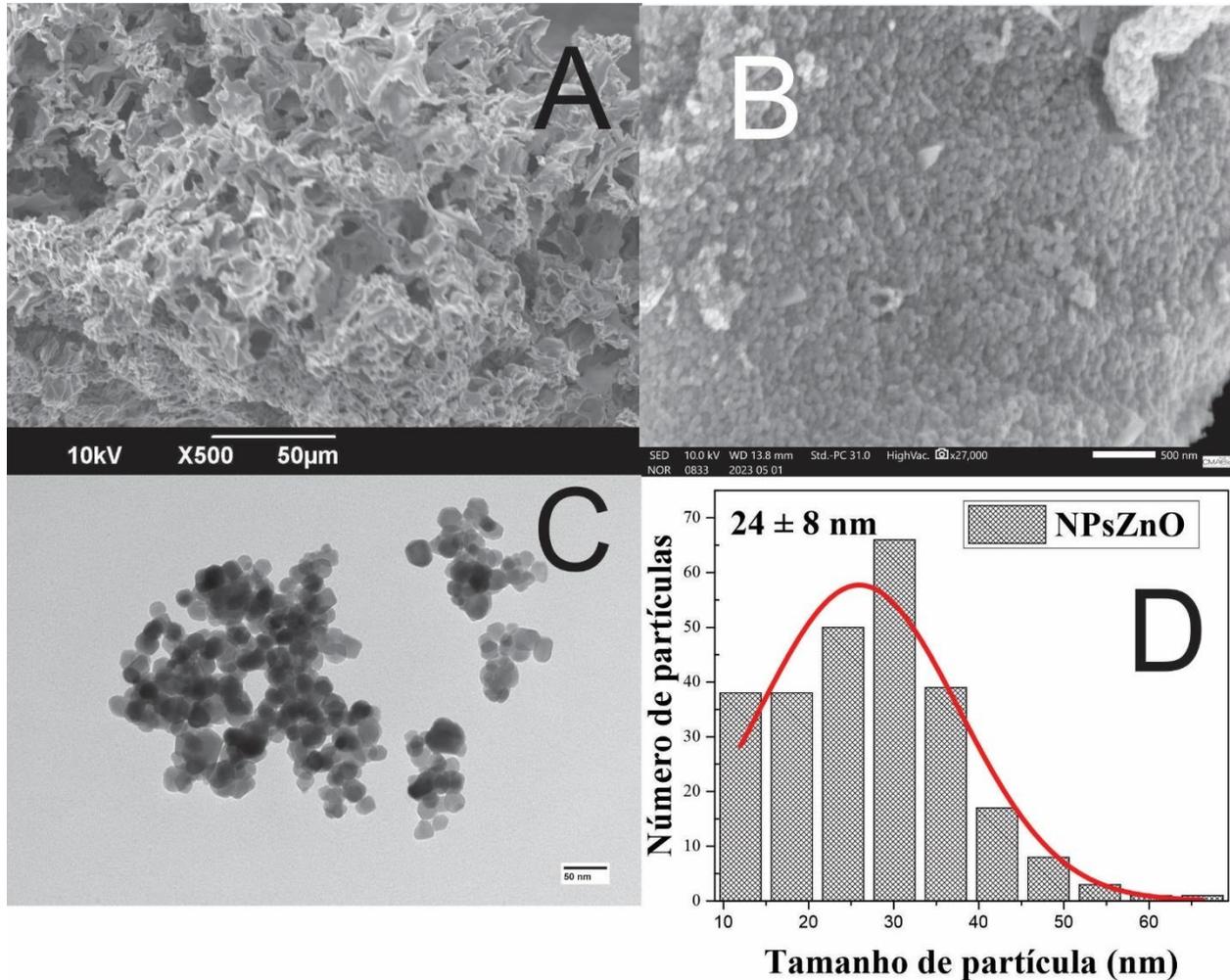


Figura 09. As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET e d) o gráfico do diâmetro das NPsZnO.

Nas Figuras 10 e 11, a morfologia superficial dos nanohíbridos de ZnO/Ag (Figura 10a) e ZnO/Ag₂O (Figura 11a), o qual foi obtida por MEV. As imagens revelam a presença de aglomerados nas amostras [124,125]. Nas Figuras 10 e 11, as representações b), c), d) e e) mostram os espectros de EDS das amostras de NPs ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag₂O, onde é possível observar a presença dos elementos Zn e Ag na superfície das amostras. Nas Figuras 10 e 11, a representação f) exhibe picos de Zn e picos adicionais de baixa intensidade atribuídos ao elemento Ag [126].

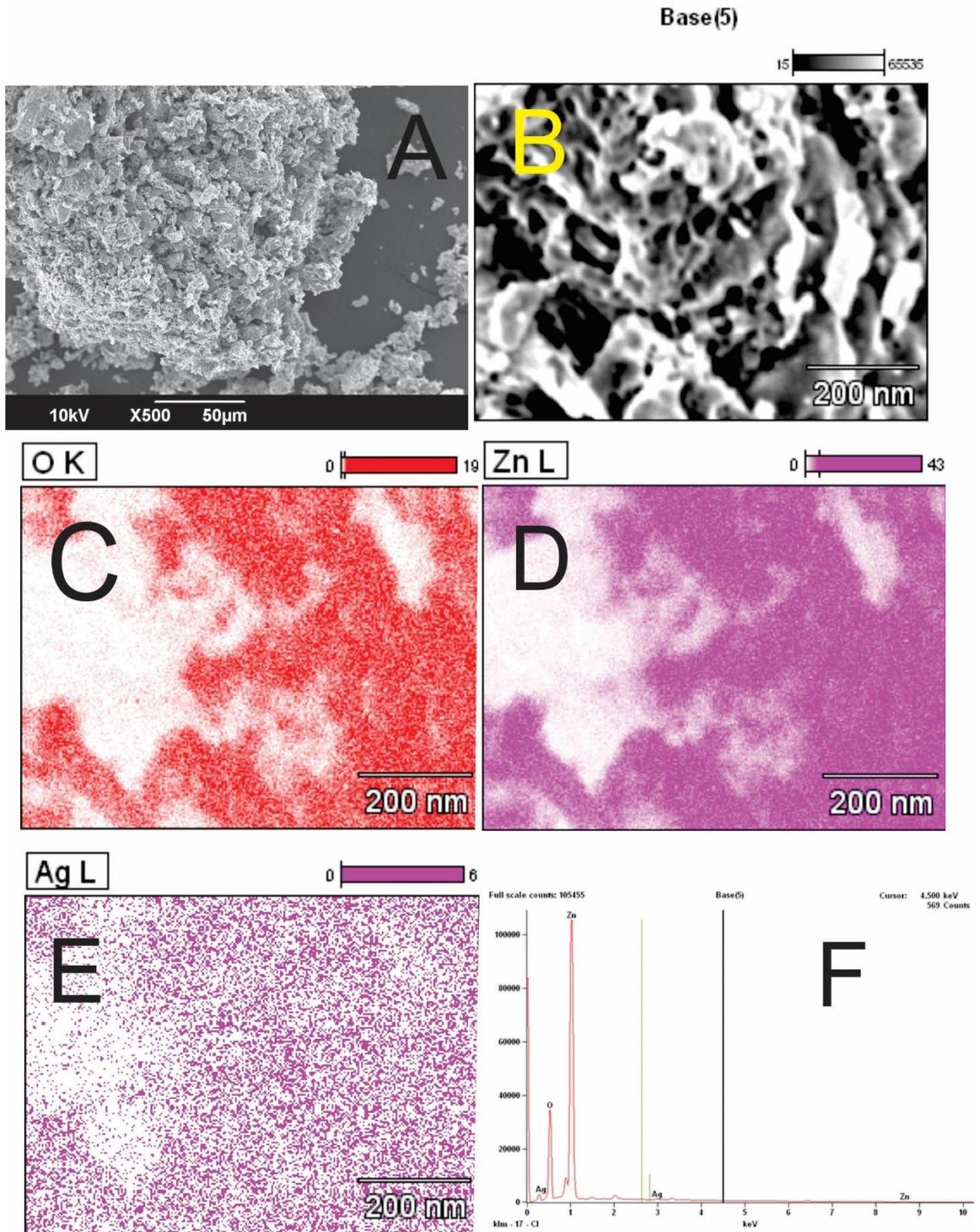


Figura 10. a) Imagens de MEV e b) Imagem do EDS c) Imagem do EDS do *spectro* de O, d) Zn, e) Ag e f) EDS dos picos de elementos presentes nas NPs ZnO/Ag.

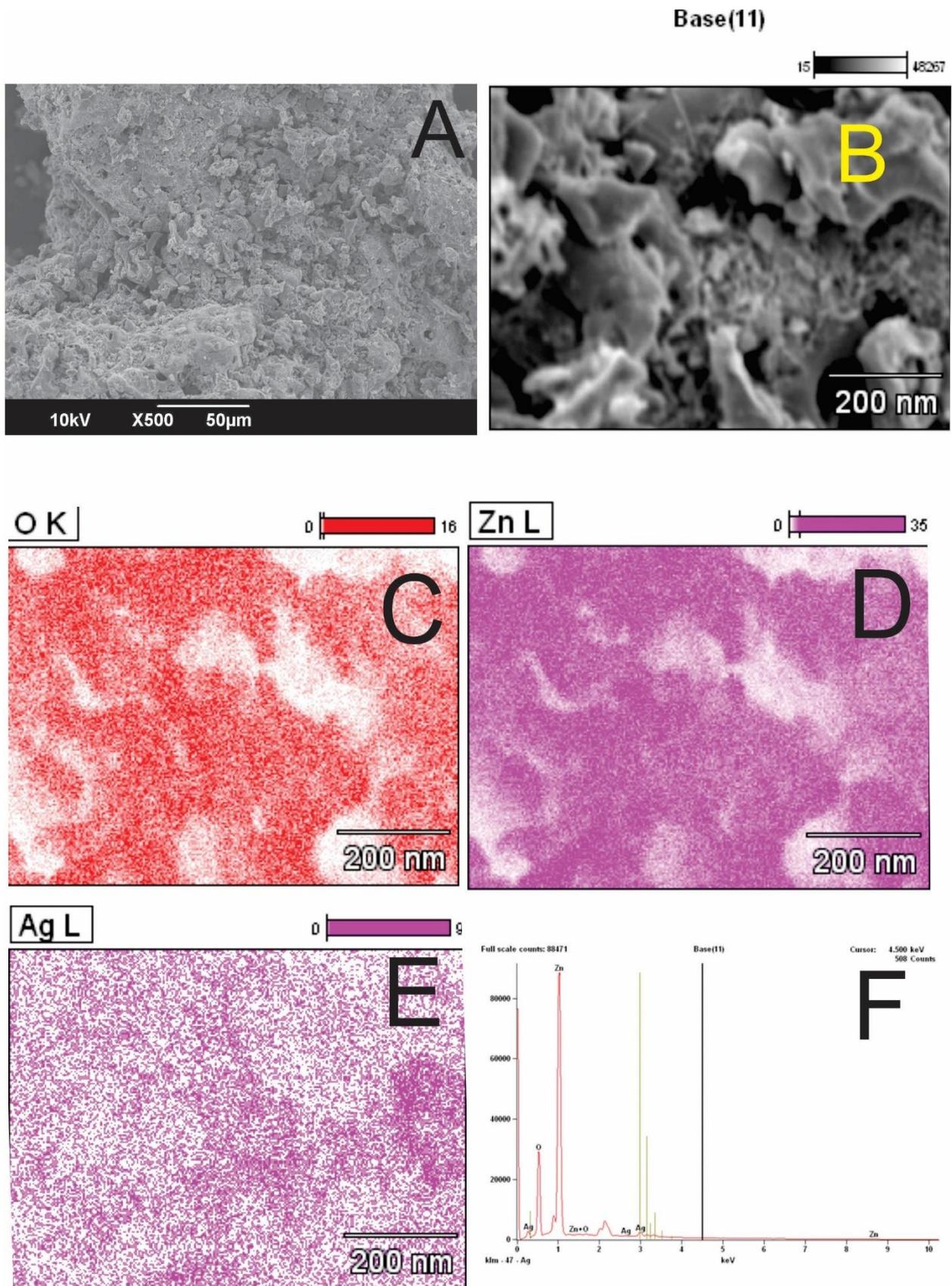


Figura 11. a) Imagens de MEV, b) Imagem do EDS, c) Imagem do EDS do *spectro* de O, d) Zn, e) Ag e f) EDS dos picos de elementos presentes nas NPs ZnO/Ag₂O.

Nas Figuras 12 e 13 a, são apresentadas as morfologias superficiais das amostras de nanohíbridos de ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. As imagens obtidas por MEV evidenciam a presença de aglomerados com morfologia em padrões desordenados [125]. Nas Figuras 12 e 13 b (FESEM), observa-se, para as respectivas amostras, características esféricas [127]. Além disso, nas Figuras 12 e 13 c (MET), na análise morfológica superficial das amostras, com característica arredondada. Essas imagens revelam a presença de partículas menores conjugadas as NPsZnO, indicando a presença de NPs de Ag ou Ag₂O [128,129].

O diâmetro médio das amostras de nanohíbridos nas imagens foi calculado como sendo de 27 ± 11 nm para ZnO/Ag (Figura 12 d) [130–132] e 34 ± 8 nm para ZnO/Ag₂O (Figura 13 d) [133], com significância estatística para todas as amostras. Assim, as amostras produzidas apresentam um diâmetro médio estatisticamente significativo de 28 nm [134]. Outros resultados de DRX com cálculos e refinamentos de *Rietveld* demonstrados anteriormente (Tabela 04) indicam tamanhos médios de cristalitos menores, sendo de 13,9 e 16,5 nm.

Em um estudo conduzido por Andrade e seus colaboradores [70], foi desenvolvido um método químico inovador e simples à temperatura ambiente, para produzir partículas de ZnO com uma morfologia em forma de estrela. Além disso, essas partículas foram decoradas com NPsAg para aprimorar suas propriedades fotocatalíticas e bactericidas. As imagens de MET das nanoestruturas híbridas ZnO/Ag recém-preparadas revelaram que, após a fotorredução dos íons Ag⁺, as NPsAg adquiriram uma forma quase esférica e foram uniformemente dispersas na superfície do ZnO. A concentração de AgNO₃ utilizada nos experimentos desempenhou um papel crucial no controle do tamanho médio das partículas e na distribuição. Para as amostras ZnO(t)/Ag0,05, ZnO(t)/Ag0,1 e ZnO(t)/Ag0,2 os diâmetros médios das amostras foram estimados em $23,0 \pm 5,4$; $32,8 \pm 8,6$ e $43,6 \pm 13,4$ nm. Esses resultados indicam a capacidade de ajustar as características das nanoestruturas híbridas ZnO/Ag por meio da variação da concentração de AgNO₃ no processo de preparação.

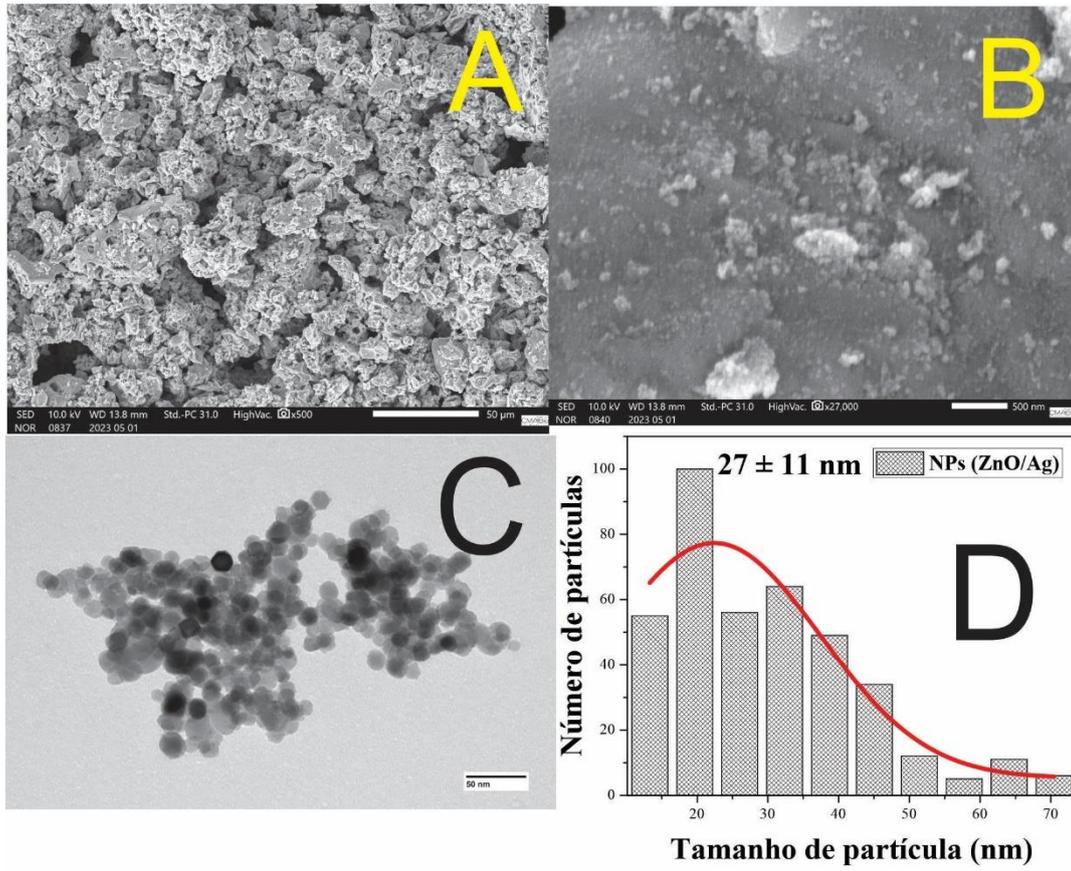


Figura 12. As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET das NPsZnO e d) o gráfico do diâmetro médio das NPs ZnO/Ag.

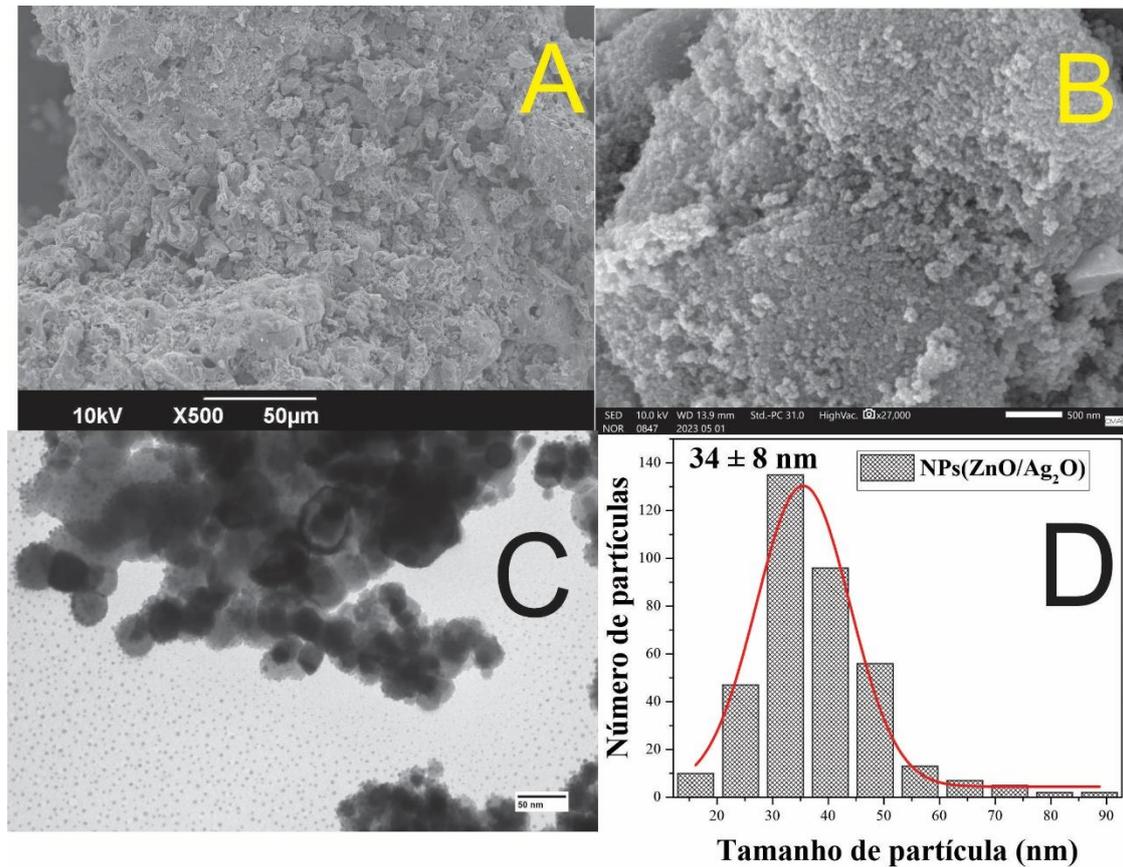


Figura 13. As medidas de a) MEV, b) FESEM, c) o MET e d) o gráfico do diâmetro médio das NPs ZnO/Ag₂O.

Nas Figuras 14 e 15 a, são apresentadas as imagens de MET com sinalizações da estrutura de NPs conjugadas [135], e nas Figuras 14 e 15 b, são mostradas ampliações das imagens (Figura 14 e 15 a) das amostras de nanohíbridos de NPsAg [136] ou NPsAg₂O [137]. Nas Figuras 14 e 15 c, são apresentadas as NPsAg ou NPsAg₂O dispersas com formatos arredondados. Por fim, nas Figuras 14 e 15 d, foram calculados os tamanhos de diâmetros médios das NPs, os quais apresentam os valores de 7,9 e 6,0 nm, respectivamente. É relevante observar que esses valores são maiores do que os obtidos a partir do refinamento de *Rietveld* (consulte Tabela 04), o qual apresenta os valores correspondentes de 6,9 e 5,6 nm para o tamanho do cristalito.

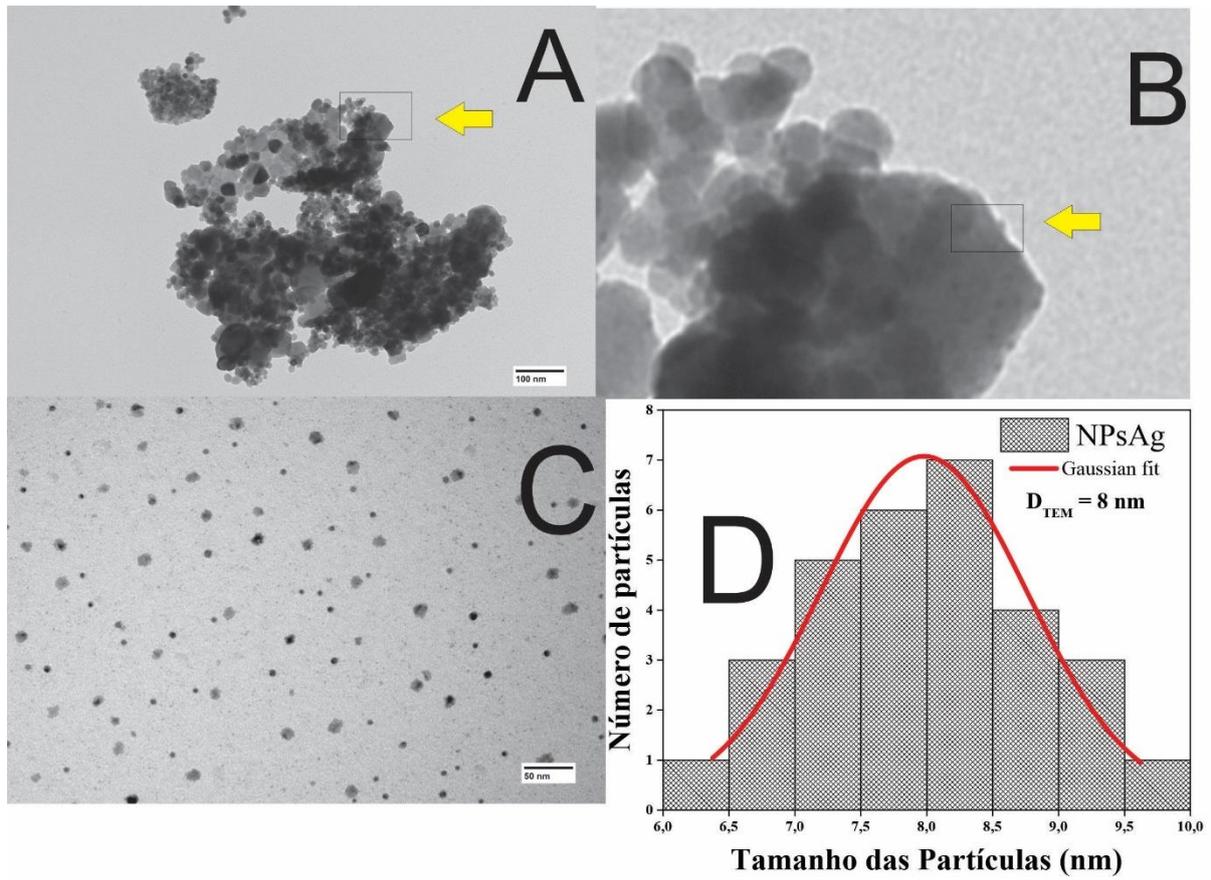


Figura 14. a) MET com sinalizações da estrutura de NPs conjugadas, b) ampliação da imagem a) e c) MET das partículas em dispersão e d) cálculo do diâmetro médio das NPsAg.

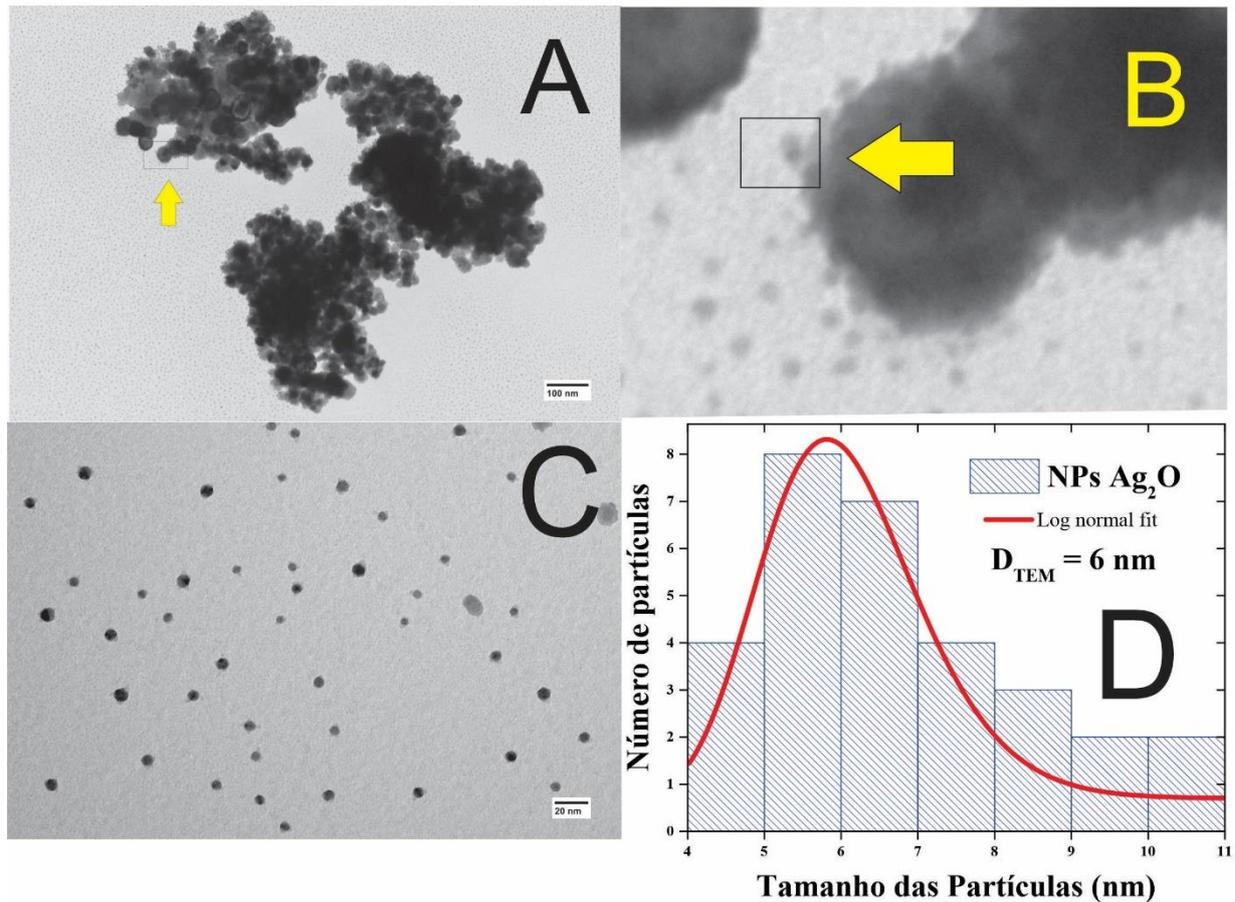


Figura 15. a) MET com sinalizações da estrutura de NPs conjugadas, b) ampliação da imagem a) e c) MET das partículas em dispersão e d) cálculo do diâmetro médio das NPs Ag₂O.

A Figura 16 ilustra os resultados derivados da análise termogravimétrica (TGA/DTG) aplicada as amostras de amido e o xerogel. Na Figura 16a, de acordo com os dados adquiridos, uma diminuição inicial de massa da ordem de 12% foi notada dentro da faixa de temperatura entre 30 e 180°C. O gráfico DTG demonstra uma taxa de partida em torno de 45°C, com a perda de água que aumenta até atingir uma temperatura situada entre 85 e 87°C [138]. Em seguida, uma segunda perda de aproximadamente 50% foi observada na faixa de temperatura de 180 a 300°C, acompanhada por um segundo pico térmico identificado no amido em aproximadamente 300°C, sugerindo a ocorrência de degradação em ambos eventos térmicos principais [138,139]. Por fim, acima de 300°C, a reação de carbonização do amido torna-se proeminente [140].

Na Figura 16b é apresentada a análise termogravimétrica TGA/DTG do xerogel. De acordo com os dados obtidos, observou-se que o xerogel experimentou uma perda de massa inicial de aproximadamente 6% na faixa de temperatura entre 30 a 230°C. No entanto, o resultado mais

significativo ocorreu a uma temperatura de aproximadamente 87°C, indicando um evento térmico relevante. Esse comportamento pode ser atribuído a processos como à evaporação de água molecular adsorvida que contribuem para essa perda de massa específica. Uma segunda perda de massa significativa, totalizando cerca de 50%, foi observada em uma faixa de temperatura que vai de 230 a 560°C. Este intervalo foi marcado por um evento térmico notável, centrado em torno de 300°C. A decomposição de carboidratos, em temperaturas relativamente elevadas, é provavelmente a principal razão para esse evento térmico [141].

A perda de massa restante do produto, que corresponde a cerca de 12%, ocorreu em uma faixa de temperatura mais alta, de 560 a 1000°C. Esses resultados são fundamentais, pois estabelecem uma temperatura segura de 400°C para a obtenção das NPsZnO. A análise TGA/DTG fornece informações cruciais sobre as transformações térmicas do material e é valiosa para orientar a produção controlada das NPsZnO, garantindo sua estabilidade e qualidade desejadas para futuras aplicações [94].

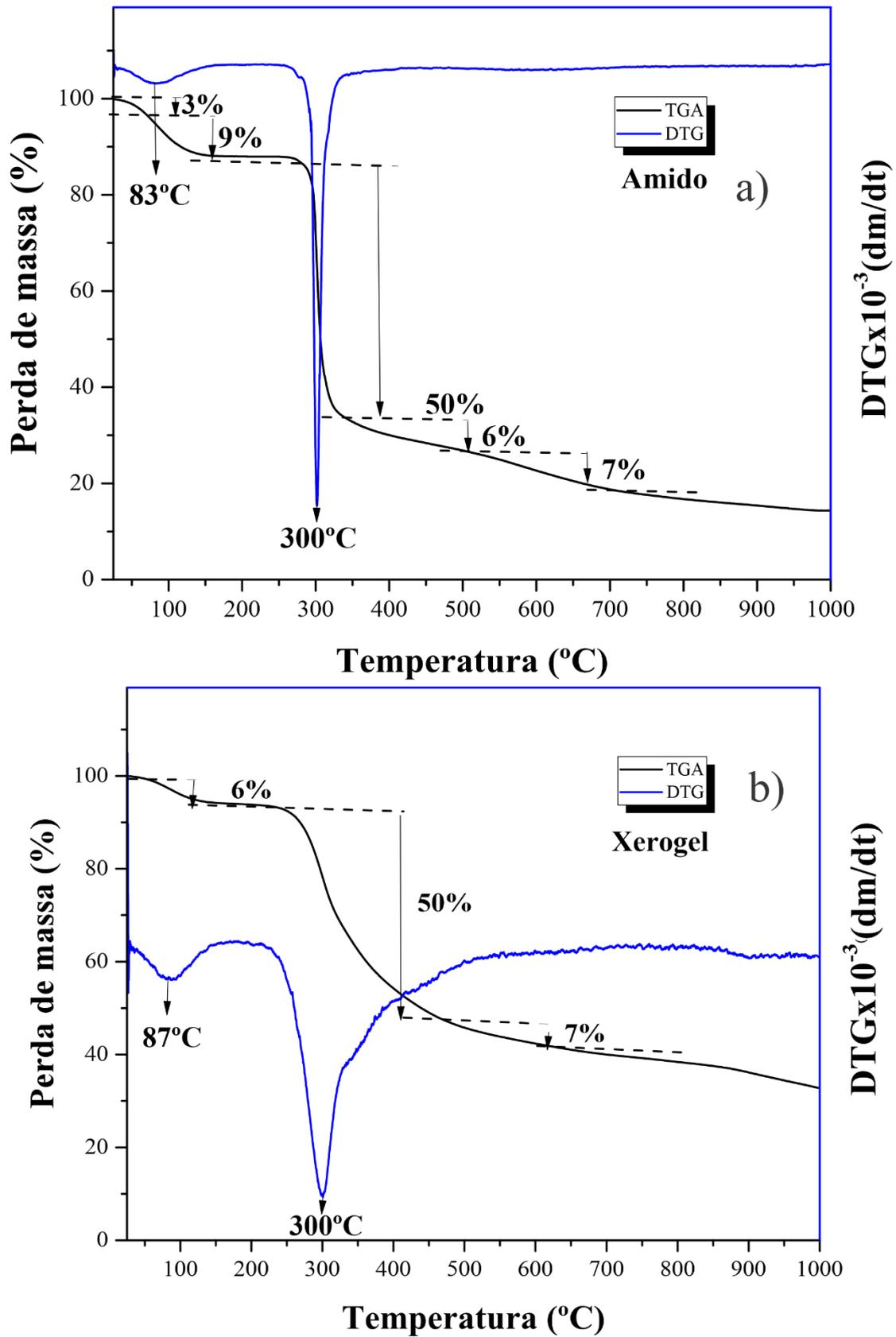


Figura 16. a) Análise termogravimétrica TGA/DTG do amido e b) do xerogel produzido.

5.1.1. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS NANOHÍBRIDOS

5.1.1.1. PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DOS NANOHÍBRIDOS

Representado na Figura 17, as amostras dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag, ZnO/Ag₂O e o controle positivo com o antibiótico gentamicina, os quais foram submetidas à avaliação de atividade antimicrobiana por meio do método de difusão em disco. As amostras produzidas foram testadas para as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, sendo associadas a fatores patogênicos e de infecção [142,143]. As atividades antimicrobianas foram avaliadas contra esses três patógenos amplamente reconhecidos. Para a cepa *S. aureus*, foram observadas zonas de inibição com médias de 8 ± 1 mm (ZnO), 10 ± 1 mm (ZnO/Ag) e 10 ± 2 mm (ZnO/Ag₂O), enquanto o controle positivo apresentou uma zona de inibição de 15 ± 1 mm. Esses resultados apresentam significância estatística entre as amostras de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. Em relação ao patógeno *E. coli*, as médias das zonas de inibição foram de 15 ± 2 mm (ZnO), 17 ± 1 mm (ZnO/Ag) e 18 ± 2 mm (ZnO/Ag₂O), com o controle positivo apresentando uma zona de inibição de 20 ± 1 mm. Esses resultados também demonstram significância estatística entre os três nanohíbridos. Finalmente, para o patógeno *S. agalactiae*, as zonas de inibição médias foram de 20 ± 2 mm (NPsZnO), 22 ± 2 mm (ZnO/Ag), 24 ± 2 mm (ZnO/Ag₂O), enquanto o controle positivo apresentou uma zona de inibição de 21 ± 2 mm. Esses resultados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação à gentamicina em relação ao patógeno *S. agalactiae* [144,145].

Percebe-se, por análise estatística, que os nanohíbridos são mais efetivos para as cepas de *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o controle positivo utilizado. Não parece haver também diferença significativa, dentro do erro da medida, de atuação entre os nanohíbridos nesse tipo de teste [70,146,147].

Já é estabelecido que atividade antimicrobiana é influenciada pela área de superfície e concentração das NPsZnO, além da estrutura cristalina e da forma das partículas [148]. A atividade antibacteriana das NPsZnO envolve diversos mecanismos distintos, como o contato direto das

partículas com as paredes celulares, resultando na destruição da integridade das bactérias, liberação de íons antimicrobianos, principalmente íons Zn^{2+} e formação de ROS [148,149].

Nejabatdoust e sua equipe [150], investigaram a resistência a agentes antimicrobianos nanoestruturados em cepas bacterianas, com especial ênfase para o patógeno *Staphylococcus aureus*. Cepas bacterianas foram submetidas à ação de NPsZnO funcionalizadas com ácido glutâmico (GLU) e conjugadas com tiossemicarbazida (TSC), denominadas ZnO/GLU–TSC. Esses resultados indicam uma notável amplificação da atividade antibacteriana das NPs. As NPs ZnO/GLU–TSC demonstraram um notável potencial antibacteriano, com zonas médias de inibição do crescimento bacteriano de 11, 15 e 20 mm para concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Em um estudo anterior conduzido por Andrade *et al.* [70], que envolveu a produção de ZnO com Ag conjugado, observou-se um aumento significativo na atividade antibacteriana com a presença de NPsAg na superfície do ZnO. Esse aprimoramento pôde ser atribuído à capacidade das NPsAg de gerar ROS. Os quais são altamente reativos e podem causar danos às estruturas celulares de microrganismos, resultando em sua inibição ou morte. Além disso, a liberação lenta de íons Ag^+ a partir do Ag metálico contribui para um efeito antimicrobiano prolongado.

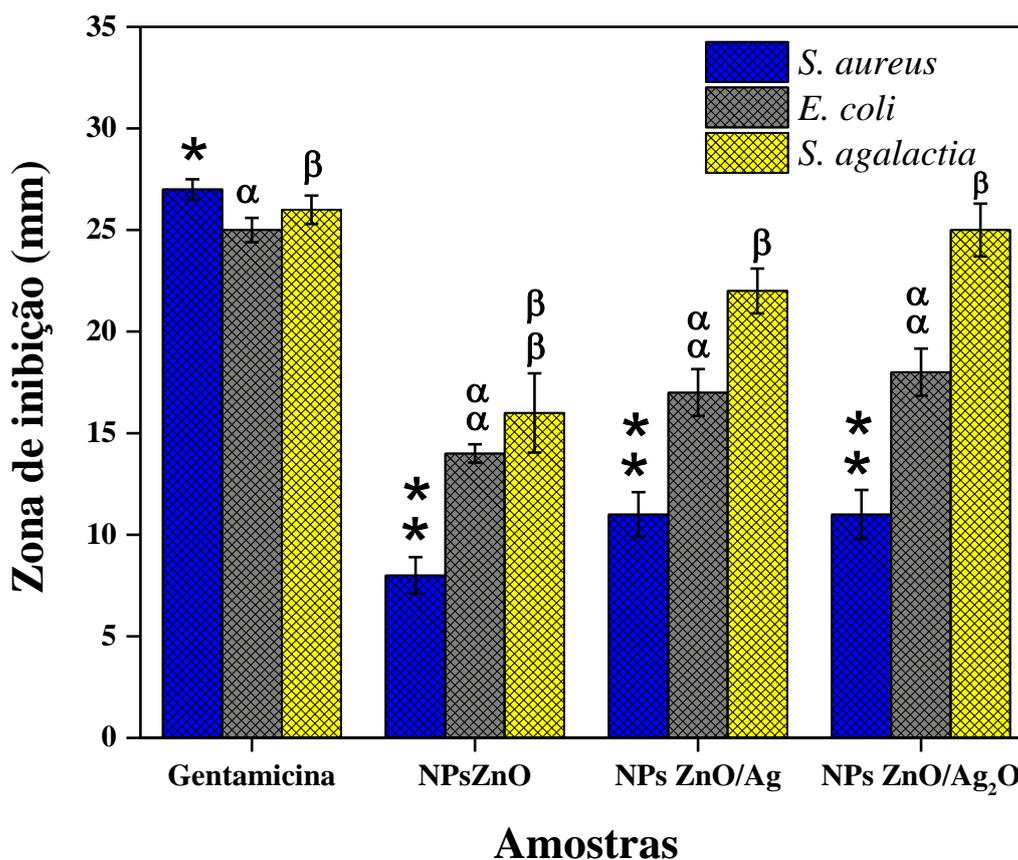


Figura 17. Demonstração dos resultados da atividade antimicrobiana das NPsZnO, NPs ZnO/Ag, NPs ZnO/Ag₂O e a gentamicina controle positivo contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foram identificadas, indicadas por asteriscos (* e **) que representam níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

A análise da atividade antimicrobiana promoveu uma avaliação substancial, englobando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as amostras de nanohíbridos de ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O, comparativamente às NPsZnO. Esse parâmetro propiciou informações cruciais a respeito da capacidade das NPs ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag₂O em conter o crescimento das cepas microbianas avaliadas na menor concentração aplicada. Conforme evidenciado na Tabela 05, os nanohíbridos em análise manifestaram uma eficácia notável na atividade antimicrobiana em relação a todas as cepas testadas. Destaca-se especialmente a notável atividade desses nanohíbridos contra *S. agalactiae*, que se manteve com uma CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ para todas as amostras. Em relação à cepa *E. coli*, a atividade variou entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$, dependendo da

amostra específica. Em relação a *S. aureus*, a CIM observada foi de 100 µg/mL para todas as amostras [66,151,152]. Valores semelhantes também foi encontrado por El-Beley e colaboradores [153] que sintetizaram NPsZnO por outra rota verde e encontraram valores do CIM de 50 µg/mL para *S. aureus*, 25 µg/mL para *P. aeruginosa*. Já Mohammadi e sua equipe [66], investigaram as propriedades antibacterianas de NPsAg₂O. Diferentes concentrações dessas NPsAg₂O foram testadas em cinco bactérias distintas: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*. Foi determinado CIM variando de 62,5 a 250 µg/mL, dependendo da cepa bacteriana.

Tabela 05. Apresenta os valores de inibição antimicrobiana específicos para cada cepa testada de CIM (µg/mL) nas NPsZnO, NPs ZnO/Ag e NPs ZnO/Ag₂O.

<i>Amostra utilizada</i>	Bactérias utilizadas (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>S. agalactiae</i>
<i>NPsZnO</i>	100	100	25
<i>NPs ZnO/Ag</i>	100	100	25
<i>NPs ZnO/Ag₂O</i>	100	50	25

5.1.1.2. TESTE ANTIDIABÉTICO DOS NANOHÍBRIDOS

Na Figura 18, apresenta-se os gráficos de atividade antidiabética, a qual foi avaliada nos ensaios de inibição da α -glicosidase e α -amilase nos nanohíbridos produzidos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O. Nas Figuras 18 a e b, apresenta-se o gráfico de concentração do amido com valores de 526, 507 e 396 µg/mL e de inibição da α -amilase e seus respectivos resultados de 34,4; 36,6 e 50,4%. Nas Figuras 18 c e d, apresenta-se o gráfico de concentração de glicose com valores de 82,1; 78,2 e 71,7 µg/mL e de inibição da α -glicosidase e seus respectivos resultados de 17,9; 21,7 e 28,2%. No entanto, são necessários estudos adicionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação e avaliar a segurança e eficácia das NPs nesse contexto clínico [154,155]. Nesse sentido, os resultados sugerem que a adição de NPsAg ou NPsAg₂O nas NPsZnO

desempenha um papel significativo na promoção da atividade inibitória das enzimas em questão [154–156].

No estudo conduzido por Robkhob *et al.* [63], as NPsZnO exibiram uma inibição da atividade da enzima α -amilase de 22% e quando dopadas com 5% de NPsAg apresentaram um leve aumento 23%. Ao ser comparadas com o medicamento *miglitol*, utilizado no tratamento do diabetes tipo 2 para retardar a digestão e absorção de carboidratos, as NPsZnO dopadas com NPsAg demonstraram uma inibição ainda mais pronunciada na atividade da enzima α -amilase. Esses resultados indicam que as NPsZnO dopadas com NPsAg podem representar uma promissora abordagem no contexto de agentes antidiabéticos.

A literatura apresenta que a dopagem de NPsAg nas NPsZnO aprimora significativamente o efeito inibitório sobre a enzima α -glicosidase, demonstrando eficácia comparável ao medicamento comercialmente disponível, o *miglitol*. Adicionalmente, tanto as NPsZnO quanto as NPsAg exibem efeitos redutores de glicose, aumentam os níveis de insulina no soro sanguíneo e aprimoram a atividade da glicocinase. Essas descobertas são respaldadas pela regulação positiva de genes relacionados à insulina, a GLUT-2 e glicocinase, observada em estudos com ratos diabéticos [63].

Iqbal e sua equipe [65], realizaram uma síntese ecológica de NPsZnO e NPs ZnO/Ag. As quais demonstraram atividades de inibição notáveis, com valores de 60% e 65% na atividade da α -amilase e de 62% e 75% na atividade da α -glucosidase, nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

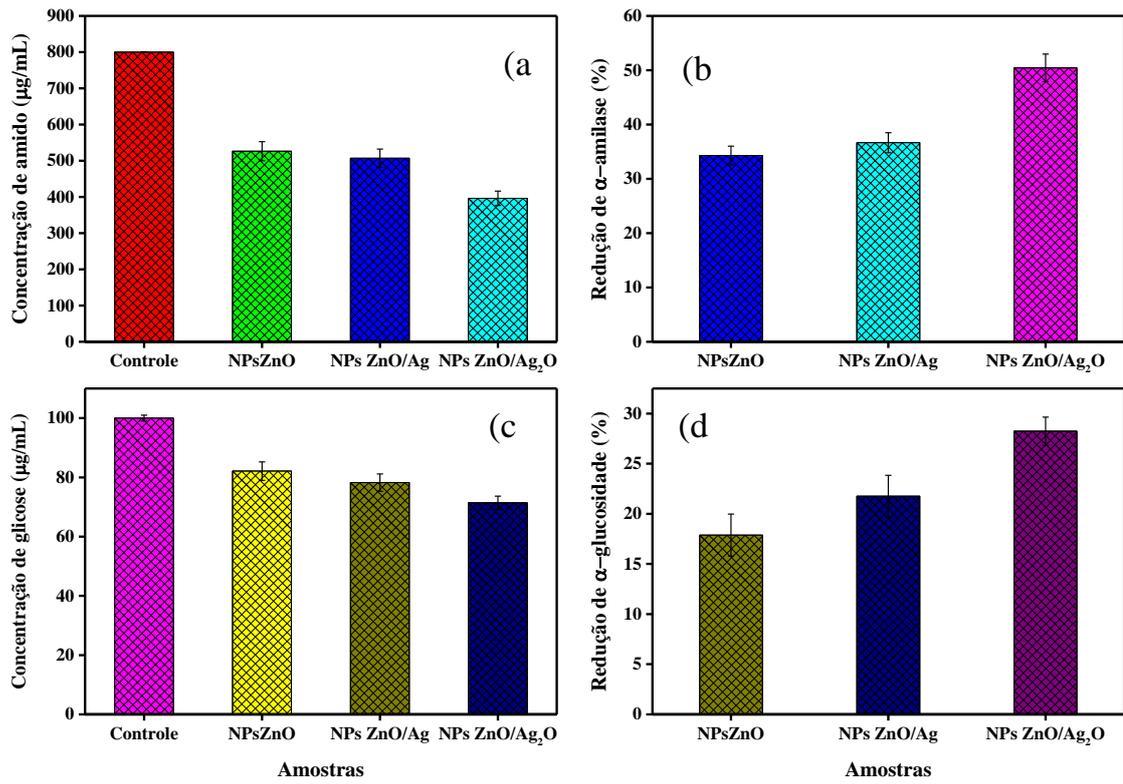


Figura 18. a) Atividade da amilase, b) Redução da α -amilase, c) Atividade da glucosidase e d) Redução da α -glucose de nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O.

5.1.1.3. DETERMINAÇÃO PELO MÉTODO DO RADICAL LIVRE 2,2 DIFENIL-1-PRICRIL HIDRAZILA (DPPH) DOS NANOHÍBRIDOS

O ensaio de DPPH foi utilizado para investigar a capacidade de supressão de radicais livres das amostras de nanohíbridos sintetizados. Os resultados deste ensaio, apresentados de forma resumida na Figura 19 a). Os dados apresentados fornecem informações sobre o potencial antioxidante das amostras. A porcentagem de atividade de captura de radicais livres variou consideravelmente com a concentração das amostras analisadas, no caso das NPsZnO, a porcentagem de inibição de radicais livres abrangeu uma faixa que se estendeu de $1,3 \pm 0,1$ a $14,3 \pm 0,7$ %, para as NPs ZnO/Ag com $1,0 \pm 0,1$ a $2,2 \pm 0,1$ % e por fim, as NPs de ZnO/Ag₂O, por sua vez, demonstraram variação na porcentagem de inibição que se situou entre $7,8 \pm 0,1$ e $14,2 \pm 0,7$ µg/mL. Os resultados são consistentes ($p < 0,05$) com um aumento significativo na capacidade de inibição de radicais livres para as amostras de nanohíbridos ZnO e ZnO/Ag₂O. Contudo, é relevante observar que não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os níveis de concentração de 10 e 50 µg/mL para as NPs de ZnO/Ag, o que sugere uma eficácia consistente da amostra mesmo em concentrações mais baixas. Além disso, em comparação com as outras amostras, as NPs de ZnO/Ag exibiram a menor porcentagem de inibição em todos os níveis correspondentes, o que ressalta a eficácia superior das NPs de ZnO/Ag₂O [18,157,158]. As NPsAg₂O tem a maior capacidade de capturar radicais livres, como os radicais DPPH [159].

O potencial geral das NPsZnO e seus nanohíbridos foi avaliado a partir dos valores obtidos de IC₅₀ (ver Figura 19 b). Os valores médios de IC₅₀ foram encontrados entre o controle utilizado com 144,1 µg/mL (ácido gálico), 185,1 µg/mL (NPsZnO), 201,1 µg/mL (NPs ZnO/Ag) e 183,5 µg/mL (NPs ZnO/Ag₂O). Notavelmente, em todas as concentrações, a amostra NPs de ZnO/Ag₂O demonstrou os menores valores de IC₅₀ em comparação com as demais amostras de nanohíbridos testados e acima do ácido gálico utilizado como controle [64,160–162].

Desenvolvido por Suresh e colaboradores [162], NPs de ZnO/Ag foram sintetizadas e avaliadas quanto à atividade antioxidante. Os testes realizados incluíram a avaliação da capacidade

de eliminação de radicais livres DPPH e radicais hidroxila, bem como ensaios de poder redutor. As NPs de ZnO/Ag exibiram atividade antioxidante, com um valor IC_{50} de 340 $\mu\text{g/mL}$ para o teste DPPH, superior ao ácido ascórbico padrão (289,7 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, apresentaram atividade de eliminação de radicais hidroxila, com um valor IC_{50} de 344,4 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o ácido ascórbico teve um valor de 316,1 $\mu\text{g/mL}$. Nesse sentido, o poder redutor demonstra uma variação maior em relação ao ácido ascórbico, adotado como controle.

No estudo realizado por Barwant e sua equipe [64], foi desenvolvido um nanocomposto de Ag/AgO/Ag₂O, o qual foi testado sobre a capacidade de eliminar os radicais livres por parte das NPs produzidas e foi avaliada por meio do ensaio de eliminação do DPPH. Observou-se que o potencial de eliminação de radicais das NPs aumentou com a concentração, variando de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Essas NPs apresentaram uma inibição máxima na eliminação de radicais DPPH de 20,9%, com um valor de IC_{50} de 89,6 $\mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, apresentam resultados que revelaram os NPs de Ag/Ag₂O mediados por DPPH, o qual demonstraram a maior atividade de captura de radicais livres em comparação com os NPsZnO, com atividade de captura de 77,6% e 75,1% a 100 $\mu\text{g/mL}$ [163].

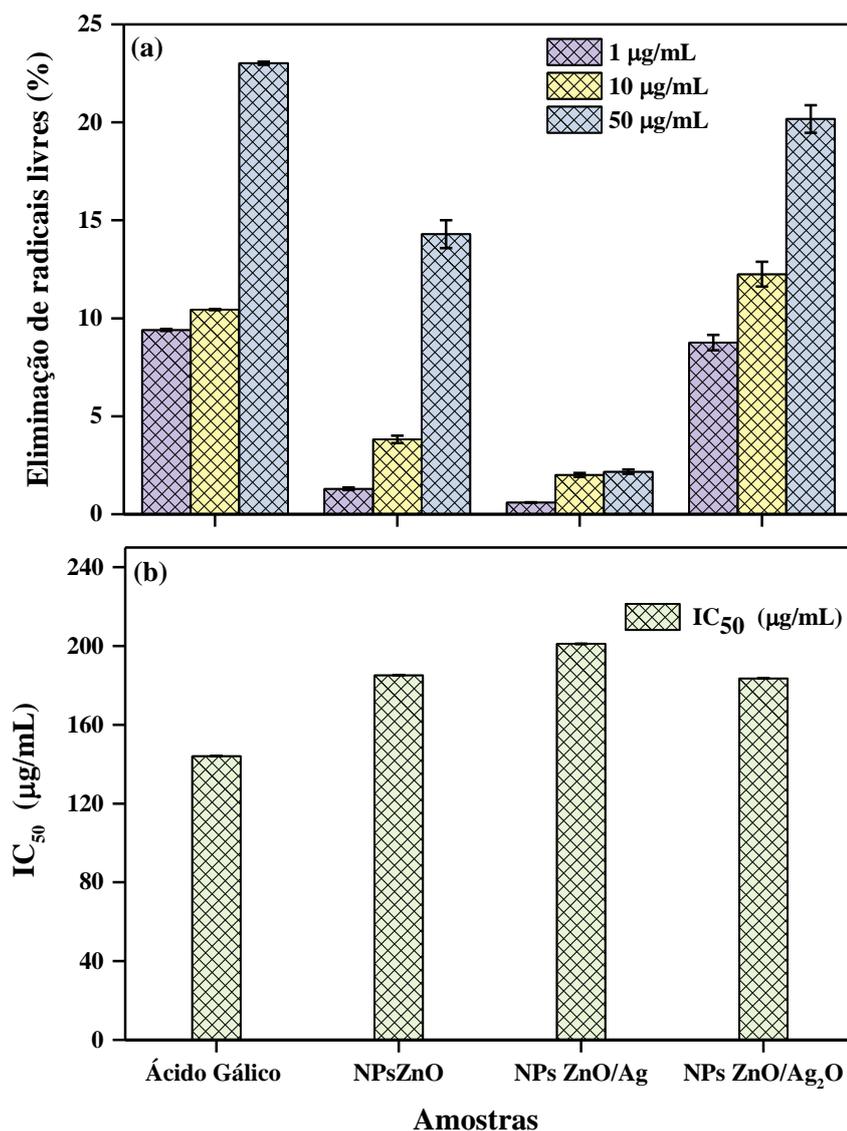


Figura 19. a) Atividade de eliminação de radicais livres e b) Valores de IC₅₀ dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O obtidos pela análise *DPPH*.

5.1.1.4. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DOS NANOHÍBRIDOS.

Os nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O foram submetidos à análise de citotoxicidade *in vitro* usando o teste estatístico ANOVA para determinar a significância estatística em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A viabilidade celular dos macrófagos *J774* foi avaliada em concentrações 30, 100 e 300 µg/mL. Para a respectiva concentração em 30 µg/mL a qual apresenta valores de 58, 62 e 64 %, na 100 µg/mL com valores de 59, 64 e 66 % e por fim com 300 µg/mL demonstrando resultados de 57, 65 e 68% (ver Figura 20). Os resultados demonstraram viabilidade celular para todas as amostras testadas. Os valores de viabilidade celular acima de 50% são considerados indicativos de viabilidade celular adequada, sugerindo a ausência

de toxicidade nas amostras avaliadas. A Observa-se uma diferença significativa entre as amostras, onde as NPsZnO exibem maior citotoxicidade em comparação com as NPs ZnO/Ag e as NPs ZnO/Ag₂O, que demonstram uma diminuição na atividade citotóxica [164,165].

Com base nos resultados obtidos, observou-se que as amostras de nanohíbridos ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O exibem diferentes níveis de citotoxicidade nas células de macrófagos J774, conforme refletido nos valores de IC₅₀ de viabilidade celular com os respectivos valores de 118,3; 141,1 e 153,1 µg/mL (ver Figura 21). A amostra de ZnO/Ag₂O demonstrou o maior valor de IC₅₀, indicando menor impacto na viabilidade celular, o que a torna uma escolha promissora como biomaterial [166,167].

Neste estudo, foram observados efeitos tóxicos das NPsAg, entretanto, nenhum efeito citotóxico ou genotóxico foi encontrado em macrófagos na dose bactericida. Essas descobertas enfatizam a importância de considerar a dosagem adequada ao usar NPsAg em aplicações biomédicas. [168]. Em outro estudo promissor, a viabilidade de queratinócitos e fibroblastos tratados com NPs ZnO/Ag, NPsAg, NPsAgO e NPsZnO foi avaliada. Os resultados mostraram que o nanohíbrido de ZnO/Ag melhorou significativamente a viabilidade dos queratinócitos, enquanto a viabilidade dos fibroblastos foi reduzida em concentrações iguais ou maiores que 5 µg/mL. Para os queratinócitos, uma redução na viabilidade foi observada apenas em concentrações de 50, 65, 85 e 100 µg/mL. Os valores de IC₅₀ para queratinócitos (98,9 µg/mL) e fibroblastos (103,7 µg/mL) foram semelhantes, indicando um efeito seletivo do nanohíbrido de ZnO/Ag nas células tratadas [18].

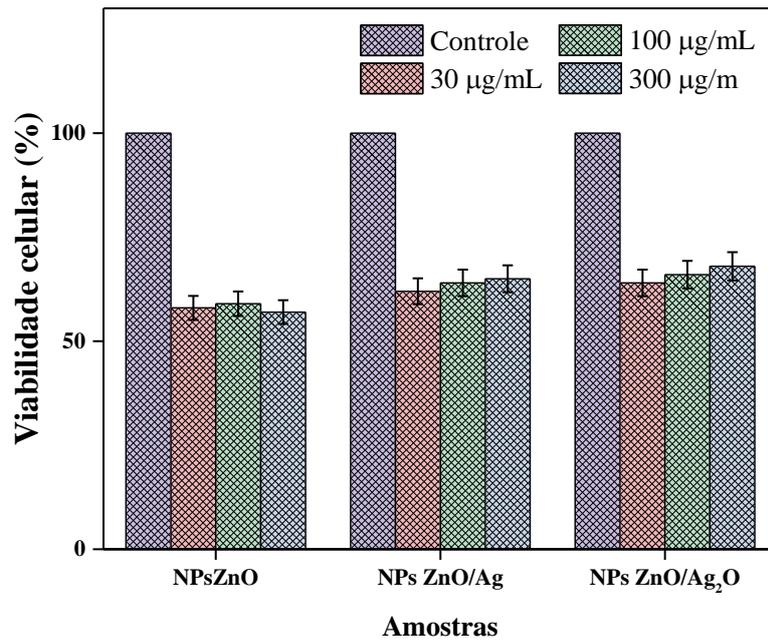


Figura 20. Aplicação biológica de amostras produzidas a partir dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O com o respectivo teste *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774.

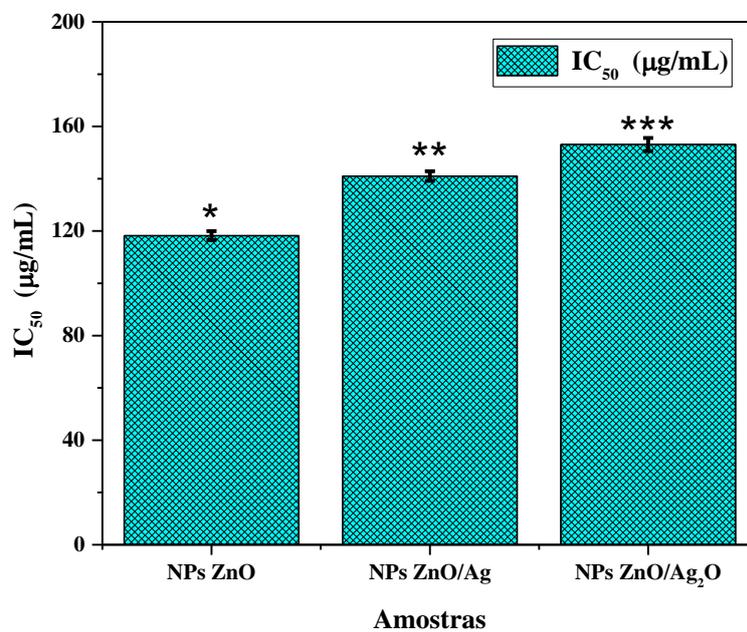


Figura 21. Apresentação dos valores de IC₅₀ dos nanohíbridos de ZnO, ZnO/Ag e ZnO/Ag₂O obtidos pela análise de teste *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774.

SUBCAPÍTULO 5.2

Resultados e discussão

Caracterização das membranas de CHI com e sem nanohíbrido

5.2. SUBCAPÍTULO - CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CHI COM E SEM NANOHÍBRIDO

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CHI COM PLASTIFICANTE

O estudo realizado envolvendo ensaios mecânicos de tração em membranas de CHI e suas variantes com e sem plastificante (GLI) revelou importantes descobertas relacionadas à flexibilidade e à redução da fragilidade dessas membranas. Os resultados das medidas de módulo de *Young*, tensão e deformação de ruptura são apresentados na Tabela 06. O módulo de *Young* é uma medida de rigidez do material, e os resultados mostram que todas as amostras caracterizadas no estudo apresentaram significância estatística. Isso indica que as amostras diferem em termos de rigidez. Notavelmente, as amostras de CHI10 e CHI20 exibiram os menores valores de módulo de *Young* respectivamente. Esses valores inferiores indicam que essas amostras são mais flexíveis, o que é uma característica desejável para reduzir a rigidez e aumentar a flexibilidade das membranas. Além disso, os valores de tensão de ruptura, que representam a força máxima suportada pelas amostras antes da falha, também foram avaliados. Não foi encontrada diferença com significância estatística nos valores de tensão de ruptura entre as amostras CHI10 e CHI20. Isso sugere que, embora as amostras sejam mais flexíveis devido aos baixos valores de módulo de *Young*, elas mantêm uma capacidade adequada de suportar tensões antes de romper, o que é uma característica importante para materiais flexíveis[169,170].

Os resultados dos ensaios de deformação de ruptura são notáveis, destacando a amostra de CHI20 como mais flexível entre as demais. Essa amostra apresentou um valor de deformação de ruptura de 35% com uma significativa diferença em relação à amostra sem plastificante (CHI) que registrou 5%. Nesse sentido, a amostra CHI20 é 7 vezes mais flexível do que a amostra CHI. Essa diferença é estatisticamente significativa, enfatizando a notável flexibilidade da amostra CHI20 em comparação com as demais amostras. Além disso, é importante notar que a amostra CHI20 também demonstrou ter um módulo de *Young* e tensão de ruptura menores em comparação com as outras amostras. Um menor módulo de *Young* indica maior flexibilidade, e a menor tensão de ruptura sugere que a amostra é capaz de suportar menos carga antes de falhar [171,172]. As

mudanças nas propriedades mecânicas decorrentes da adição de GLI são resultado do enfraquecimento das forças intermoleculares entre as cadeias adjacentes de CHI, aumentando o volume livre e diminuindo a resistência mecânica. O pequeno tamanho das moléculas de GLI permite que elas sejam facilmente inseridas entre as cadeias de CHI. Portanto, o aumento na concentração de GLI levou a uma redução de tensão de ruptura devido a interações intermoleculares mais baixas, permitindo que mais cadeias deslizem e aumentando a elongação dos filmes [169,171,173].

No estudo conduzido por Epure *et al.*[172], foi produzida CHI plastificada por meio de um tratamento termomecânico, representando uma abordagem alternativa à fundição com solvente. O plastificante empregado foi o GLI, com uma concentração constante de 25% em massa. Observou-se um aumento significativo (40%) na elongação na ruptura quando a CHI foi plastificada. Em outro estudo conduzido por Sabbah e sua equipe [171], foram desenvolvidos e caracterizadas novas membranas à base de CHI plastificados com espermidina e/ou GLI. Observou-se que o aumento na quantidade de CHI resultou em um aumento na resistência à tração da membrana e na sua elongação na ruptura. Notavelmente, quando a espermidina estava ausente, apenas os valores de resistência à tração e módulo de *Young* foram significativamente superiores em todas as concentrações de CHI. Além disso, as membranas contendo espermidina demonstraram uma maior extensibilidade, exibindo uma elongação na ruptura ainda maior do que as membranas plastificadas com GLI. A presença simultânea de concentrações adequadas de espermidina e GLI ampliou ainda mais a extensibilidade e plasticidade da amostra produzida, permitindo que ela fosse termoselada e exibisse uma permeabilidade semelhante à do produto comercial *Viscofan NDX*, amplamente utilizado como invólucro de alimentos à base de proteínas.

Portanto, com base nos resultados apresentados, a amostra de membrana CHI20 emerge como uma opção promissora para aplicações como curativos de pele, onde a flexibilidade e a capacidade de acomodar os diferentes tipos de topografia do corpo humano são fundamentais [169–171].

Tabela 06. Valores do módulo de *Young* (MPa), tensão (MPa) e deformação na ruptura (%) das amostras de CHI, CHI5, CHI10 e CHI20 obtidos dos testes mecânicos de tração

<i>Amostras utilizadas de membranas</i>	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Deformação de Ruptura (%)
CHI	993 ± 72	24 ± 4	5 ± 3
CHI5	1371 ± 63	41 ± 3	8 ± 6
CHI10	161 ± 25	11 ± 3	9 ± 5
CHI20	38 ± 10	10 ± 2	35 ± 12

A hidrofiliçidade da superfície das membranas produzidas de CHI foi estimada indiretamente através da determinação do ângulo de contato destas amostras frente a água (que é uma medida de molhabilidade da superfície das amostras). Um exemplo típico destes experimentos está representado na Figura 22 e os valores obtidos dos ângulos de contatos estão descritos na Tabela 07. O valor médio do ângulo de contato para as membranas de CHI, sem plastificante, foi de 96°. À medida que a percentagem de plastificante era aumentada o valor do ângulo de contato vai diminuindo até atingir um valor de 73°. Considerando o erro das medidas apresentados na Tabela 07 verifica-se que 5% de plastificante (CHI5) não alterou significativamente a molhabilidade da membrana de CHI. Já a dição de 10% do plastificante já conduz ao valor médio máxima de molhabilidade obtido nesse estudo. Este comportamento já era esperado uma vez que, a adição do plastificante GLI às membranas de CHI aumentam o número de grupos hidroxilas, altamente hidrofílicos, presentes na estrutura das membranas.

Este comportamento geral é bem descrito na literatura como no trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa realizado por Lopes e colaboradores [72], que encontram a mesma tendência de diminuição do ângulo de contato em membranas de PHB ao se aumentar a quantidade de plastificante, poli(etilenoglicol) (PEG). No mesmo contexto, em um estudo conduzido por Leceta e sua equipe [174], foram desenvolvidas membranas à base de CHI plastificada com GLI e a tendência de diminuição do ângulo de contato foi a mesma encontrada

no nosso trabalho, sendo que eles só encontraram diferenças significativas com o uso de 30% de GLI o que foi o dobro do utilizado no nosso trabalho.

Tabela 07. Valores detalhados de ângulo de contato com água das amostras de membranas de CHI, CHI5, CHI10 e CHI20.

<i>Amostras utilizadas de membranas</i>	Ângulo de contato (frente) (°)	Ângulo de contato (fundo) (°)	Ângulo de contato (Média) (°)
CHI	96 ± 4	95 ± 6	96 ± 6
CHI5	100 ± 3	99 ± 4	100 ± 4
CHI10	76 ± 5	74 ± 6	75 ± 6
CHI20	71 ± 5	74 ± 5	73 ± 6

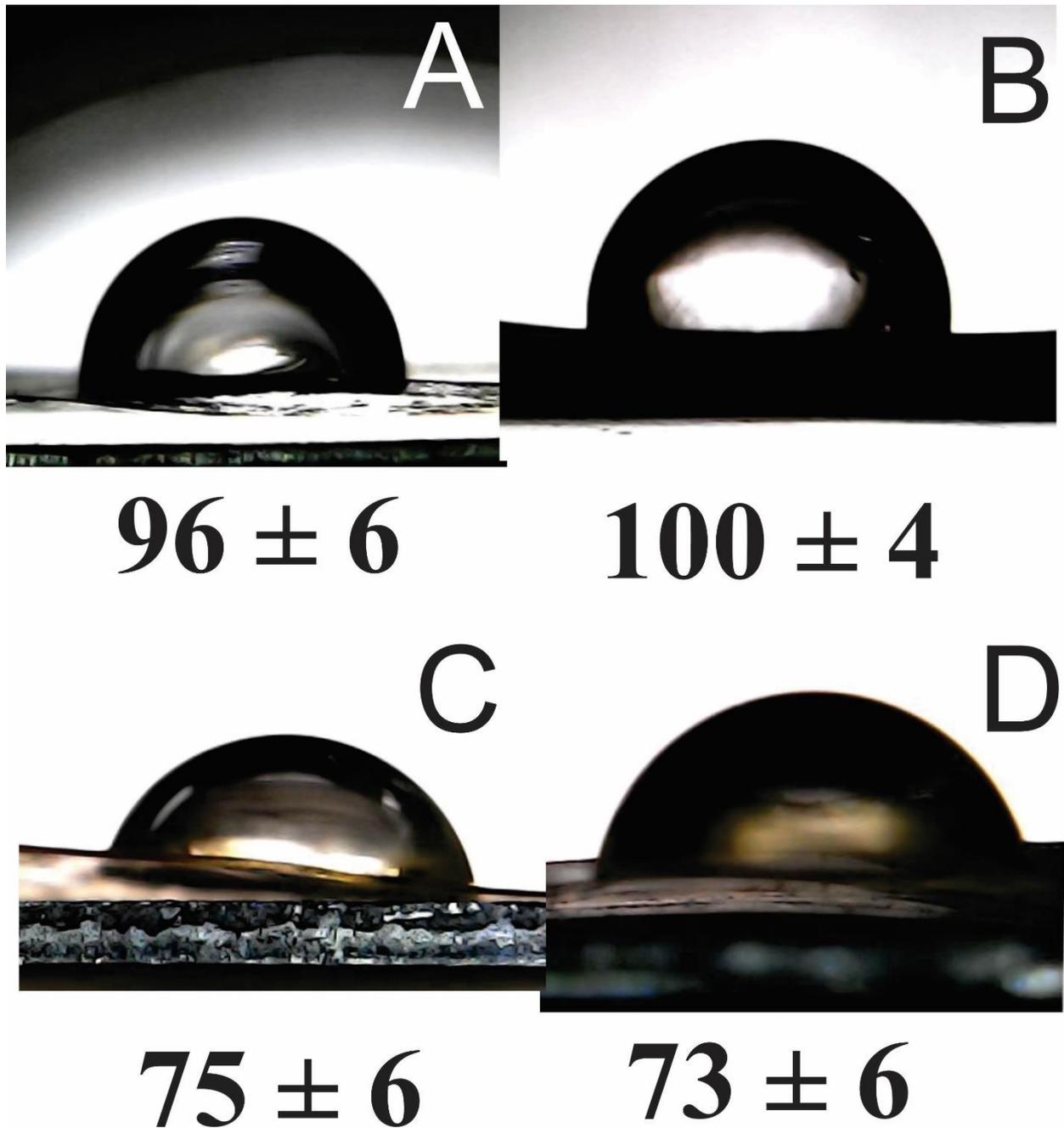


Figura 22. Apresentação do ângulo de contato representa como uma gota de líquido interage com a superfície do material nas amostras de CHI a), CHI5 b), CHI10 c) e CHI20 d).

A amostra CHI20 foi selecionada para a incorporação dos nanohíbridos, evidenciando características hidrofílicas por meio do teste de ângulo de contato. Destaca-se que essa amostra demonstrou maior flexibilidade em comparação com as demais membranas de CHI. A escolha fundamentou-se na relevância da hidrofiliicidade para aplicações biomédicas, proporcionando interações favoráveis com ambientes biológicos. A flexibilidade adicional é crucial para a conformidade e adaptabilidade do material em diferentes contextos clínicos. Essa abordagem

estratégica visa otimizar as propriedades da membrana, almejando uma resposta biocompatível e eficaz quando empregada como curativo avançado.

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM OS NANOHÍBRIDOS

Nas Figuras 23, 24 e 25 são apresentadas as micrografias da superfície e seção transversal por MEV e EDS das amostras de membranas de CHI e CHI20, na Figura 23 a) é apresentado a imagem por MEV da membrana de CHI, o qual evidencia um aspecto liso da amostra, caracteriza também riscos ou defeitos provenientes do processo da *casting* em placa de Petri [175], na Figura 23 c) é apresentado a amostra de membrana de CHI20 com uma característica rugosa proveniente da adição do plastificante GLI [176]. Na Figuras 23 b) e d) o espectro de EDS apresenta picos predominante de C, o que caracteriza uma morfologia orgânica superficial das amostras [69]. Para as Figuras 24 e 25, são apresentadas as imagens da seção transversal das amostras de CHI (Figura 24 a) e CHI20 (Figura 25 a) e do seu respectivo cálculo da média em espessura de 19 ± 2 (Figura 24 b) e $25 \pm 2 \mu\text{m}$ (Figura 25 b). As amostras de membranas de CHI e CHI20 apresentam uma característica superficial homogênea [177].

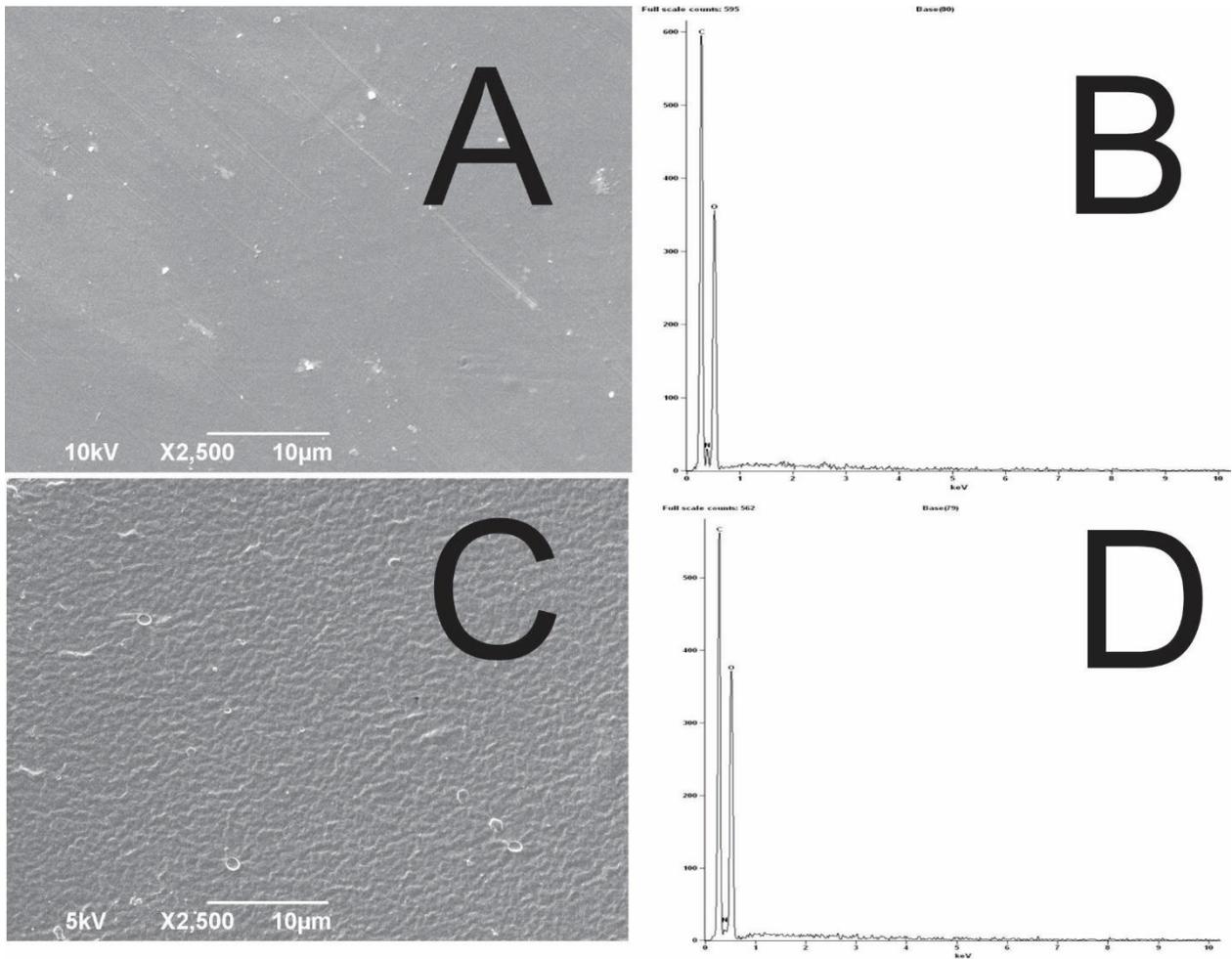


Figura 23. a) Imagem de MEV, b) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI, c) Imagem em 10µm de MEV e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20.

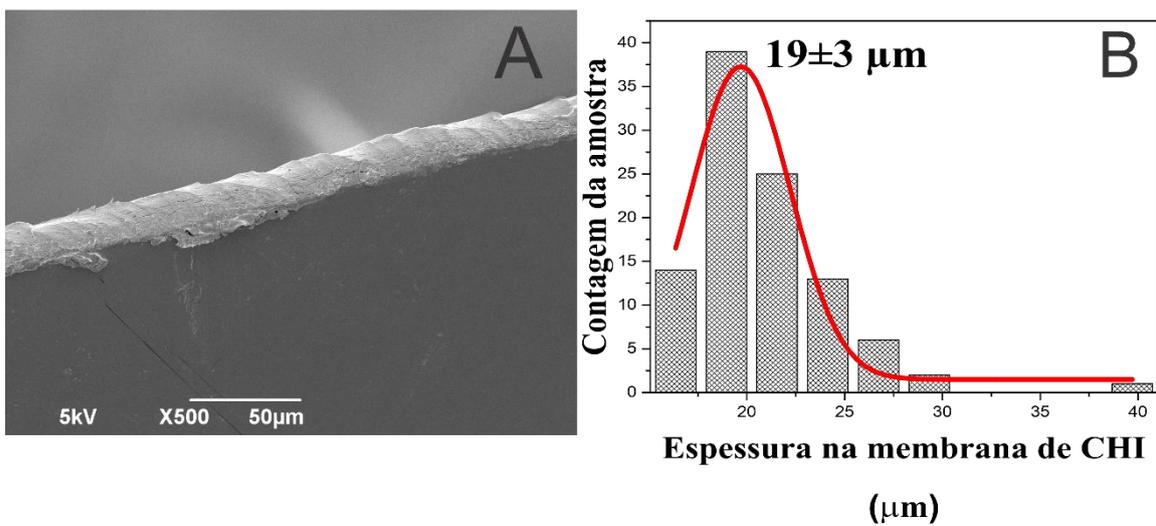


Figura 24. a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI.

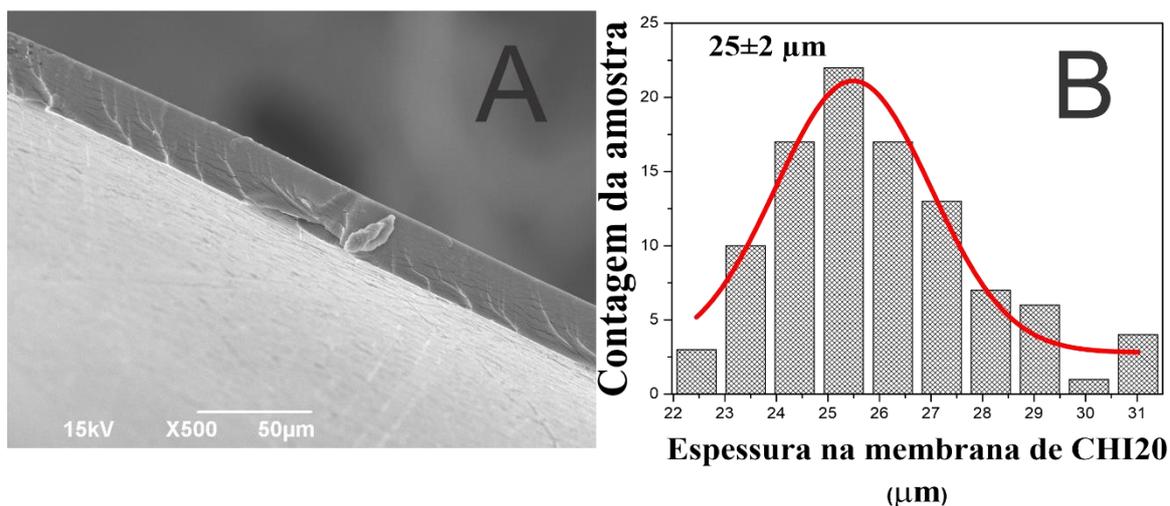


Figura 25. a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20.

Nas Figuras 26, 28 e 30 são apresentadas as micrografias de MEV em aumento de 2500 e 5000x, para as amostras de membranas CHI20ZnO (Figuras 26 a e b), CHI20Ag (Figuras 28 a e b) e CHI20Ag₂O (Figuras 30 a e b), nas quais é possível ver agregados em sua superfície ou *cluster* com formato de folhas sobreposta ou planos desordenados, com valores de diâmetro médio de 4 ± 2 (ver Figura 26c); 12 ± 4 (Figura 28c) e 7 ± 5 μm (Figura 30c), similar ao formato de ZnO apresentado em outros trabalhos [178,179]. Em seguida, os respectivos resultados de EDS apresentam para a amostra de CHI20ZnO (Figura 26d), pico característico de Zn, o qual evidencia a presença superficial das NPsZnO [69]. Logo após, as amostras de CHI20Ag e CHI20Ag₂O (Figuras 28 e 30 d), demonstram picos característicos de Zn e Ag, que evidencia a presença superficial das NPsZnO e NPsAg [180,181]. Os resultados das imagens da seção transversal das amostras de membranas de CHI20ZnO (Figura 27a), CHI20Ag (Figura 29a) e CHI20Ag₂O (Figura 31a) apresentam os valores de diâmetro médio com espessura de 56 ± 6 (Figura 27b); 49 ± 4 (Figura 29b) e 70 ± 7 μm (Figura 31b). As amostras de membranas apresentam uma superfície transversal fraturada e áspera e isso confirma que os nanohíbridos se dispersam homogeneamente na matriz polimérica de CHI [175].

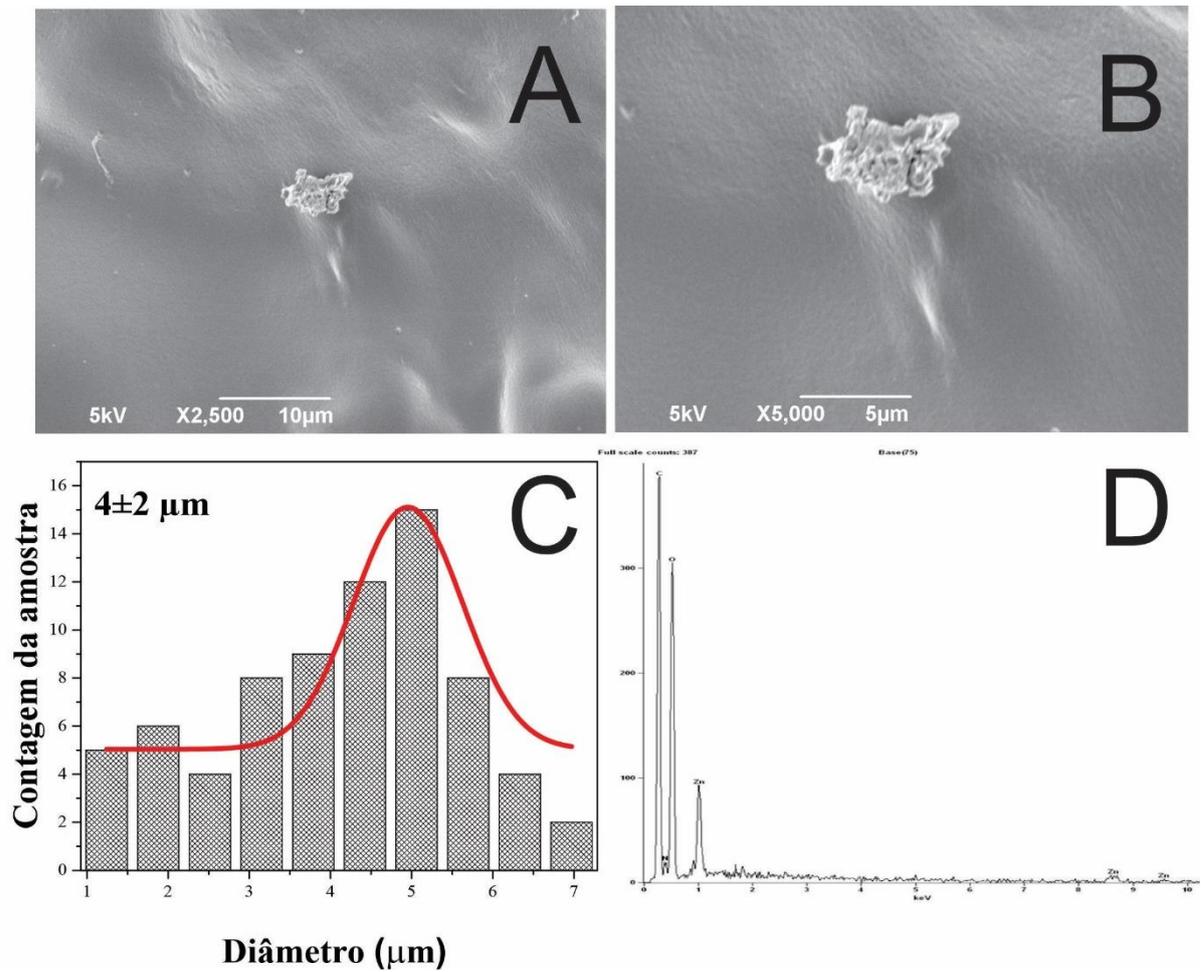


Figura 26. a) Imagens de MEV em 2500x, b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do *cluster* das NPsZnO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20ZnO.

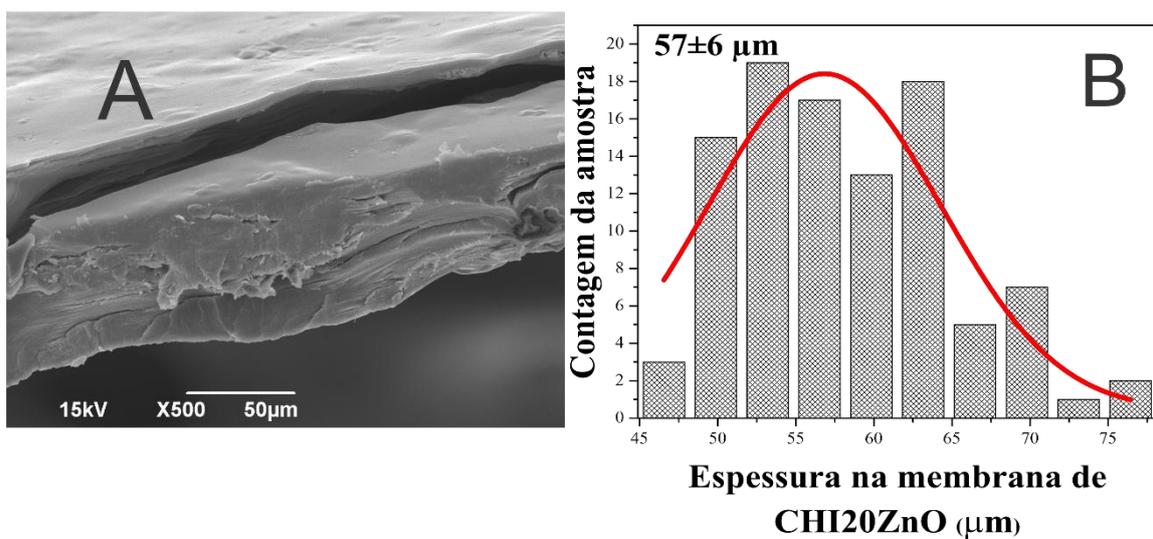


Figura 27 a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20ZnO.

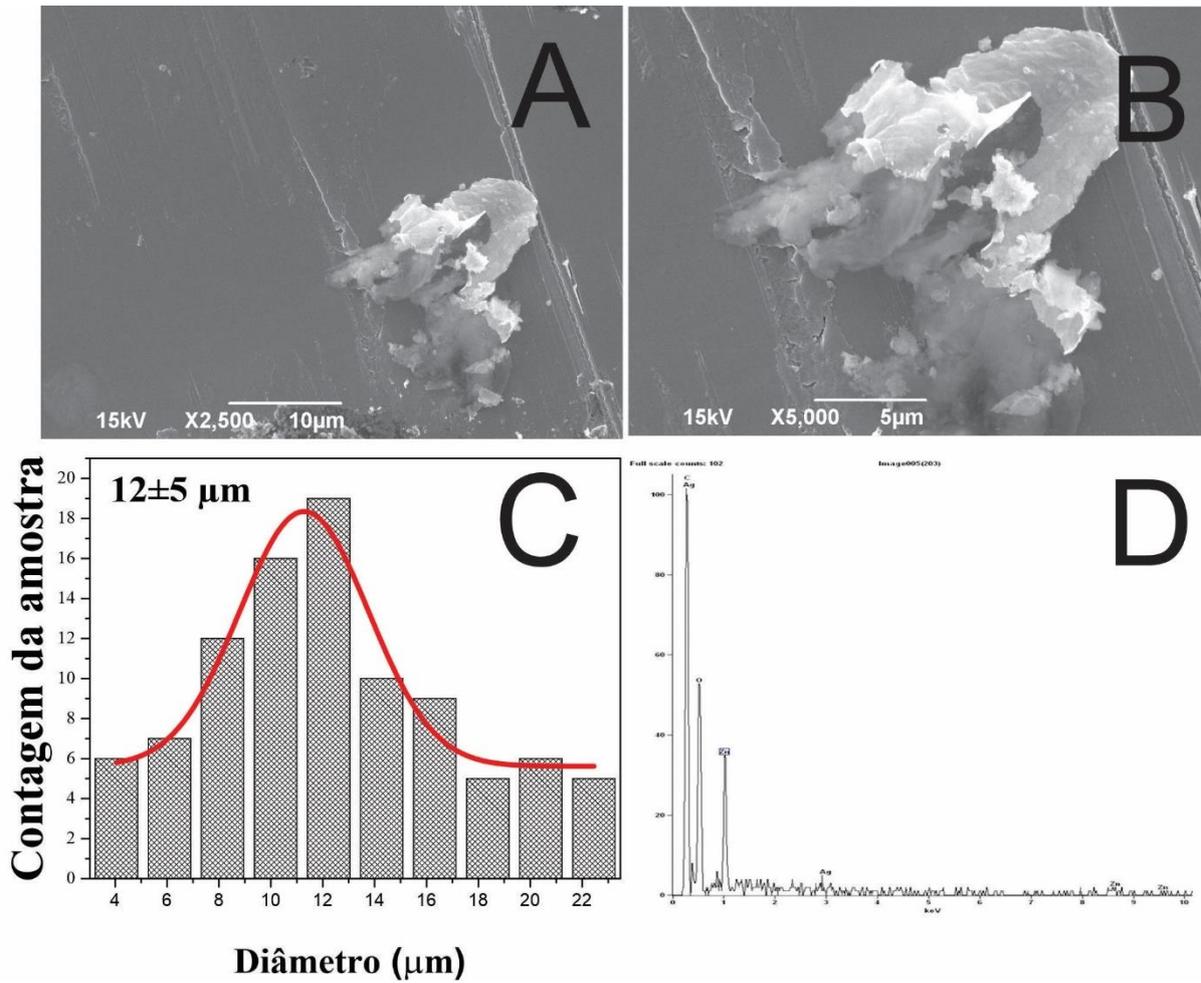


Figura 28. a) Imagens de MEV em 2500x, b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do *cluster* das NPzO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20Ag.

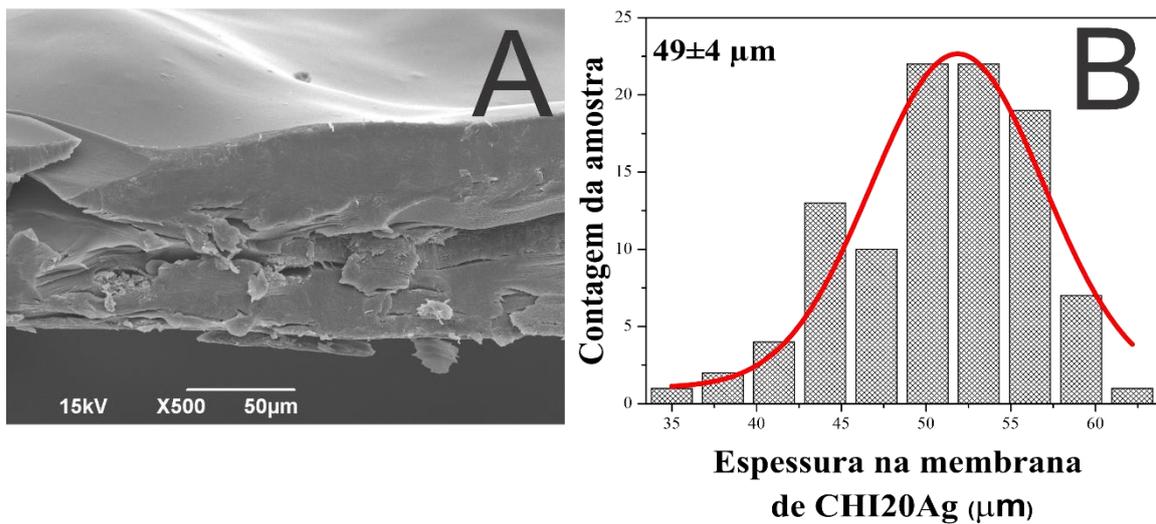


Figura 29. a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20Ag.

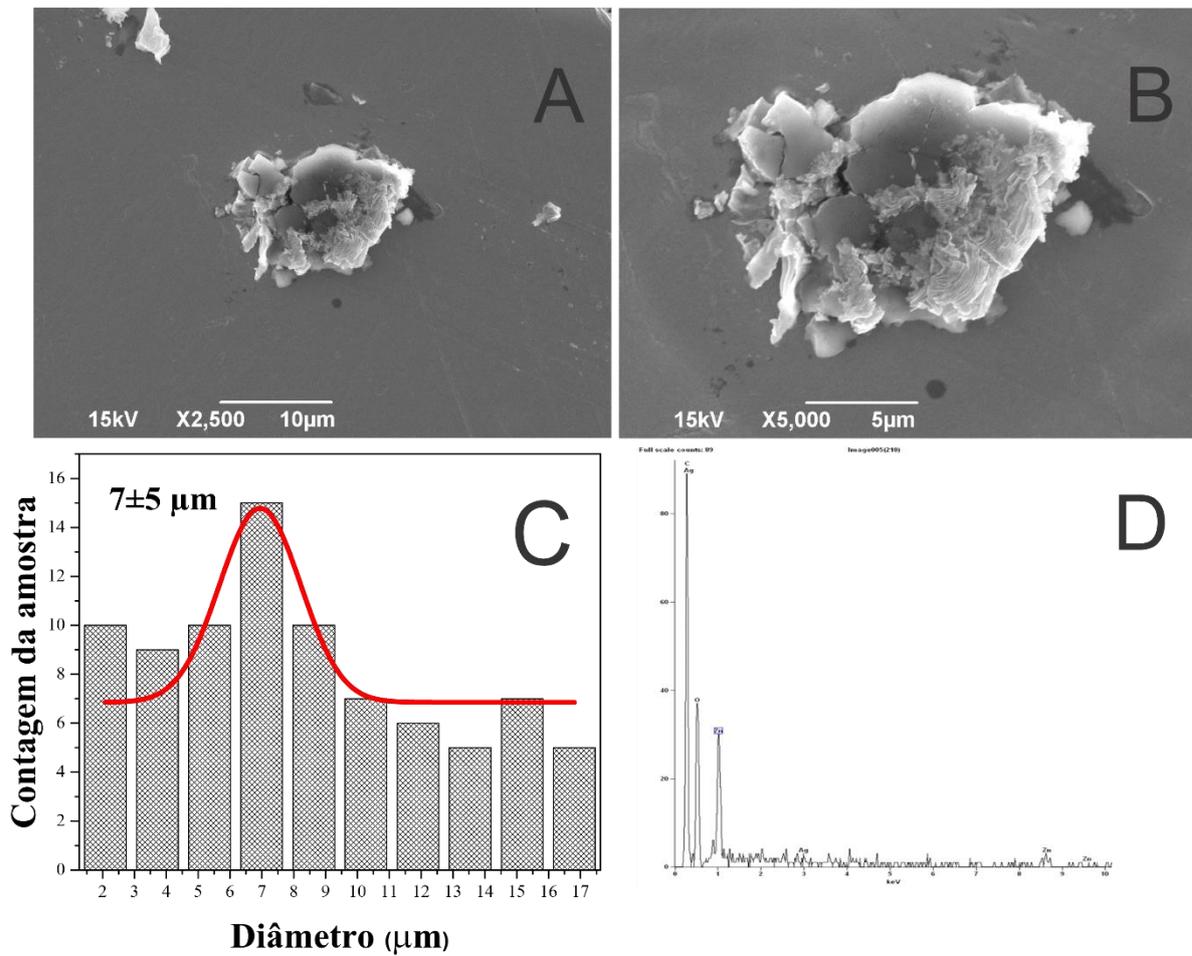


Figura 30. a) Imagens de MEV em 2500x a), b) 5000x, c) Contagem de diâmetro médio do cluster das NPsZnO e d) EDS dos picos de elementos presentes na membrana de CHI20Ag₂O.

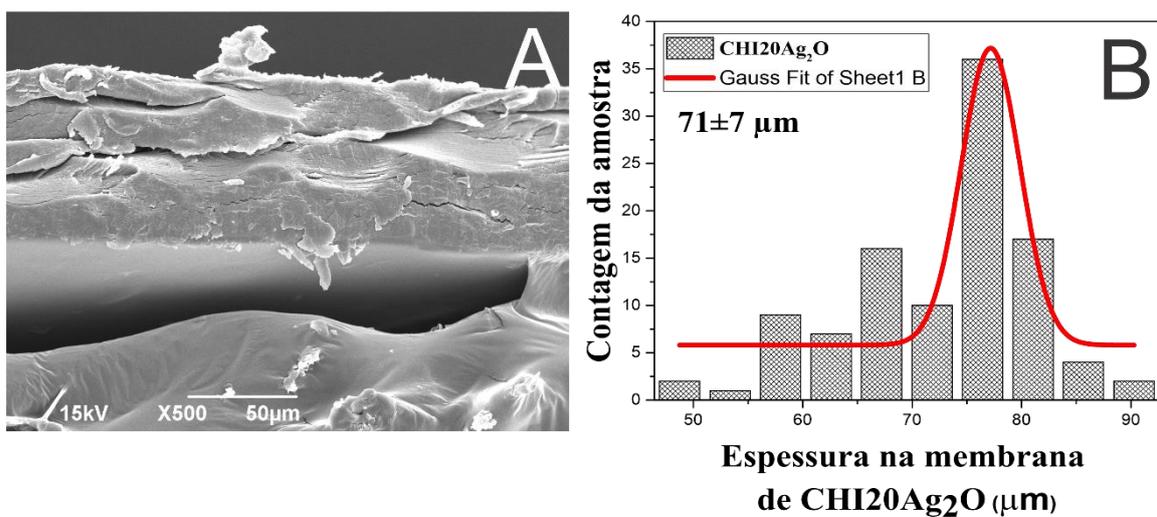


Figura 31. a) Imagem de MEV da seção transversal e b) Espessura na membrana de CHI20Ag₂O.

A técnica de TGA em conjunto com DTG foi empregada para investigar a influência dos nanohíbridos na estabilidade térmica da membrana de CHI com e sem aditivos. As amostras de membranas analisadas incluíram CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O. A CHI apresentou um padrão de degradação em duas etapas, conforme ilustrado na Figura 32. A primeira etapa ocorre a temperaturas inferiores a 100°C, resultando em uma perda de massa de aproximadamente 18%. Essa perda é atribuída à evaporação de água fisicamente adsorvida e/ou água quimicamente adsorvida por meio de ligações de hidrogênio. A segunda etapa de degradação ocorre entre 100°C e 450°C, com uma perda de massa de 37%. Nessa fase, ocorre a liberação de metano e amônia (NH₃) provenientes de uma reação de eliminação entre grupos NH₂ e H. Além disso, há a decomposição da cadeia principal, desidratação dos anéis piranose, e uma reação de abertura de anel que resulta na produção de H₂O, CO e CO₂, juntamente com outros fragmentos provenientes do anel glucosamínico e por fim, acima de 450°C, restos carbonáceos permanecem, constituindo cerca de 44% do material original [175].

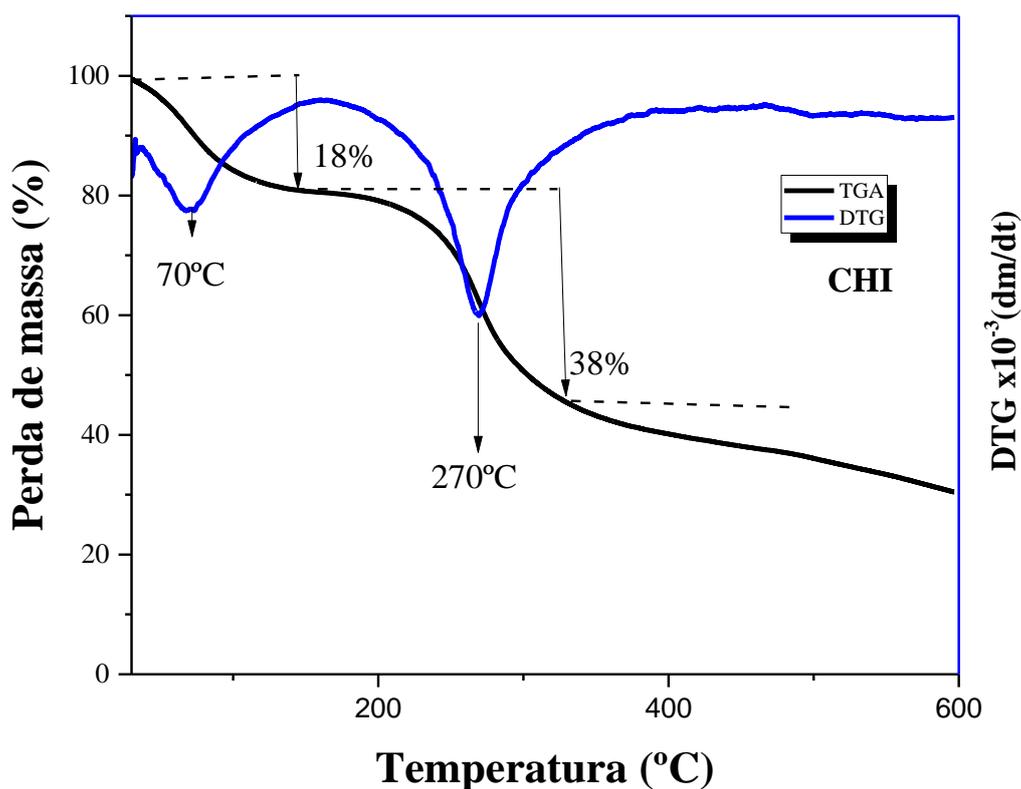


Figura 32. Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI.

Para a amostra de CHI20 apresentado na Figura 33, foram registradas três etapas de degradação de 30 – 100°C, 100-250°C e 250-450°C. A decomposição inicial foi consistente com a evaporação de água livre e ligada dentro da membrana, resultando em uma perda de massa de aproximadamente 23%, a mudança de massa na segunda etapa resultou da decomposição do glicerol com uma perda de peso de 22%, e a perda de massa nesta etapa estava próxima da porcentagem de massa do glicerol na formulação. Em seguida, a degradação das unidades de CHI foi detectada na terceira etapa com perda de massa de 20%. E, finalmente, acima de 450°C, é observada a formação de resíduos carbonáceos, os quais representam aproximadamente 35% da massa do material original. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Debandi e colaboradores [173].

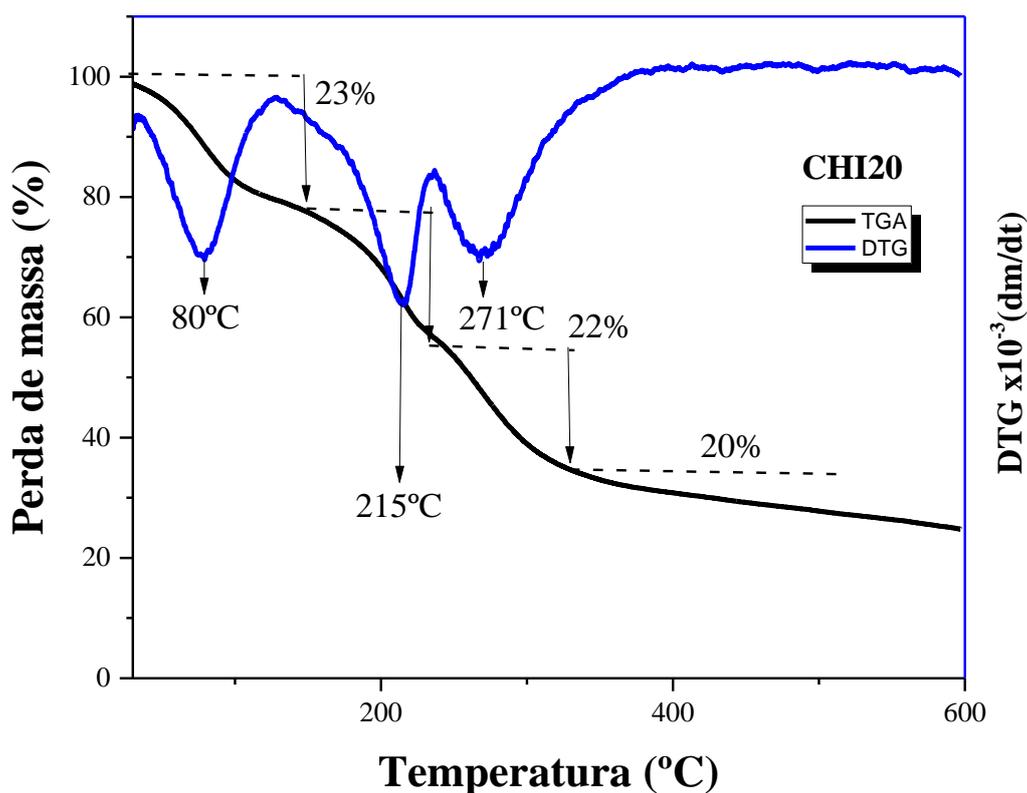


Figura 33. Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20.

Para as amostras de membranas de CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O são apresentados nas Figuras 34, 35 e 36 os resultados de TGA/DTG, os quais apresentam dois principais eventos térmicos, a perda de massa inicial em todas as membranas ocorreu a temperaturas entre 30 e 120 °C, devido à remoção de umidade e material volátil presente nas amostras, com respectivas perdas de 38, 20 e 24%. O segundo evento térmico ocorreu em torno de 120 - 290°C, relacionados à degradação da matriz das membranas, ou seja, decomposição pirolítica de unidades de CHI acetilada ou desacetilada e apresenta perdas de massa de 23, 24 e 31%, respectivamente. Parece haver um efeito catalítico das NPs na decomposição da matriz polimérica uma vez que este evento térmico de perda de massa ocorre em temperaturas menores na presença dessas NPs. E por fim, acima de 400°C, resíduos carbonáceos provenientes das fases orgânicas e inorgânicas das amostras de membranas produzidas permanecem [177, 190].

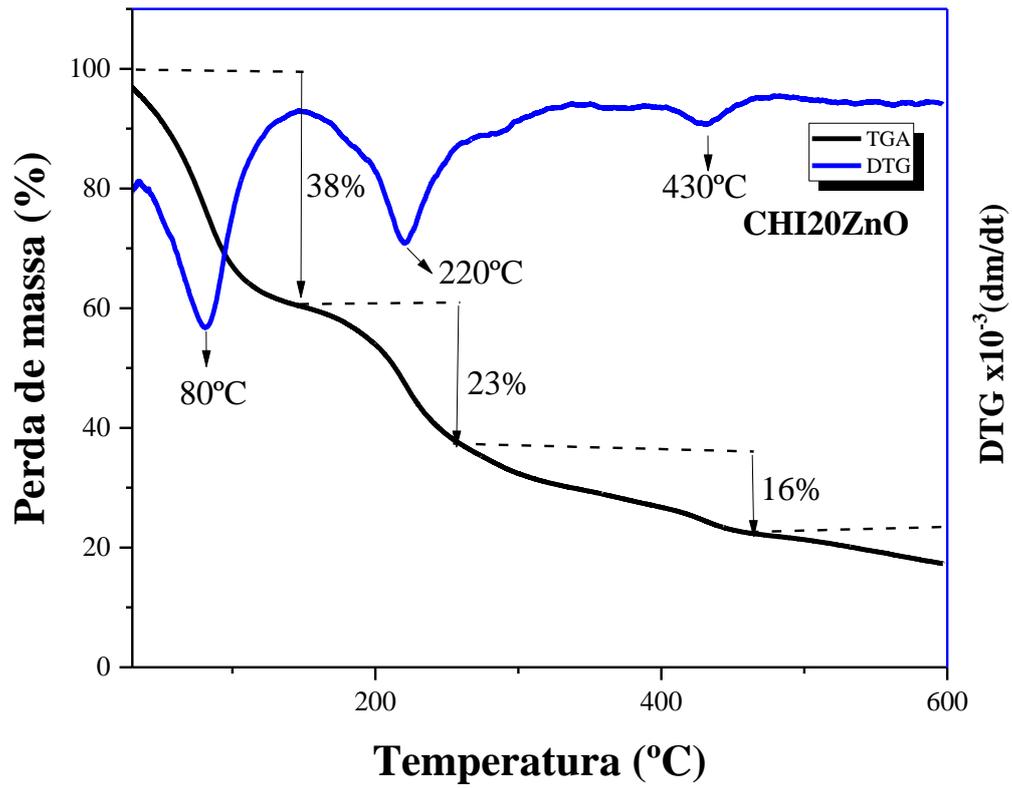


Figura 34. Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20ZnO.

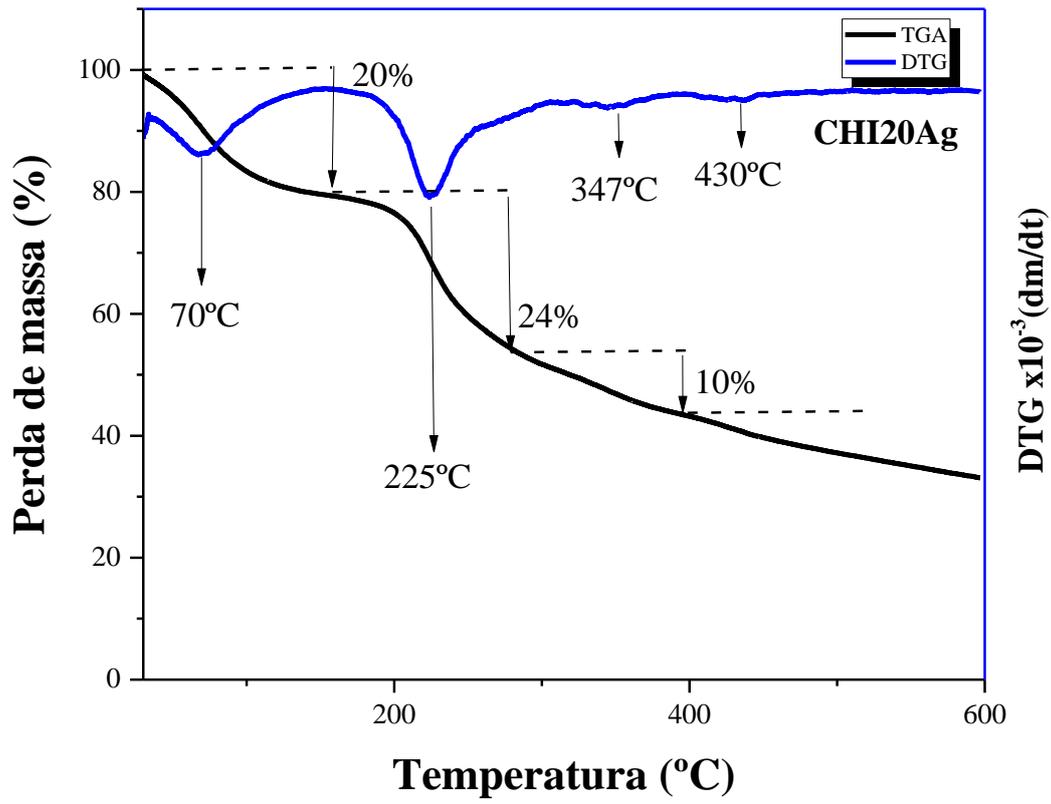


Figura 35. Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20Ag.

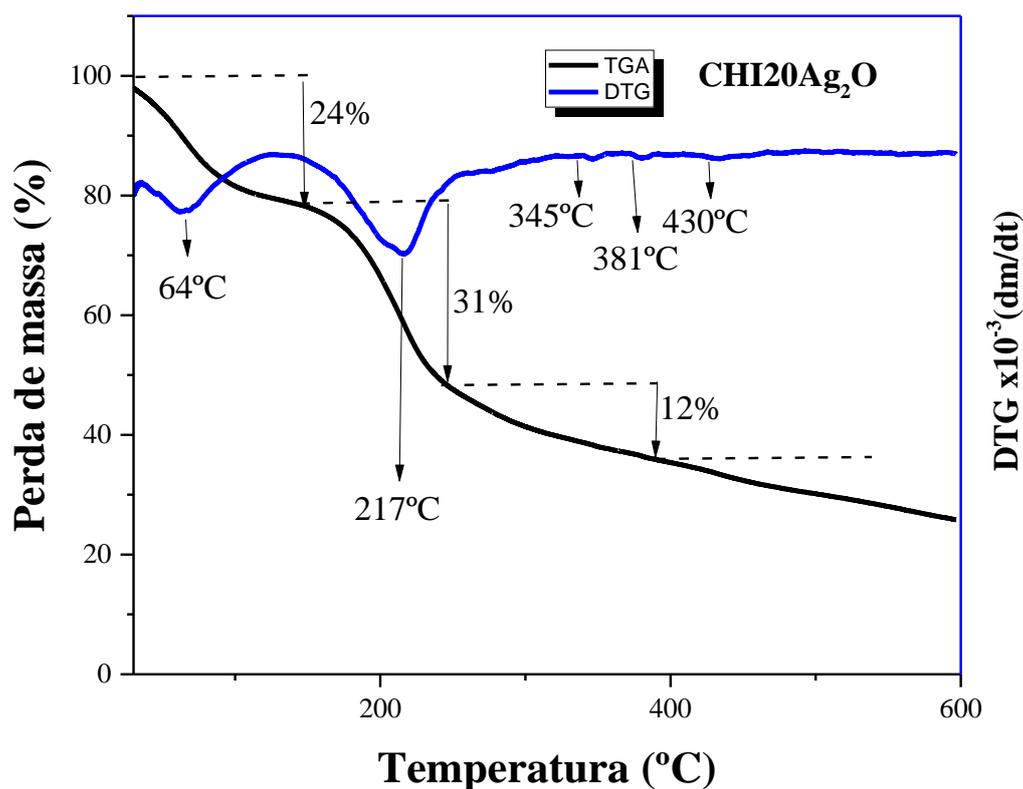


Figura 36. Análise termogravimétrica TGA/DTG da membrana de CHI20Ag₂O.

A molhabilidade das membranas com as NPs incorporadas foi avaliada, e os resultados são ilustrados na Figura 37 e Tabela 08, com valores das medidas da superfície, fundo e a média das amostras de membranas. As imagens representativas de gotas na superfície das membranas são apresentadas nas Figuras 37 a–c. Os valores médios do ângulo de contato ($N = 4$) foram determinados como $93^\circ \pm 4^\circ$ (CHI20ZnO), $91^\circ \pm 2^\circ$ (CHI20Ag) e $95^\circ \pm 1^\circ$ (CHI20Ag₂O). Houve um aumento do ângulo de contato e das características hidrofóbicas das membranas com nanohíbridos em comparação com a amostra de CHI20 ($73^\circ \pm 6^\circ$). Isso está de acordo com o esperado uma vez que à membrana de CHI20 foram adicionados substâncias que predominantemente hidrofóbicas [67,178,183]. No trabalho realizado por Chang e colaboradores [176], destaca-se que o ângulo de contato da água é um indicador crucial para avaliar a hidrofobicidade e a molhabilidade superficial de materiais de embalagem. Esse ângulo é influenciado pela coesão e adesão entre a água e a superfície das membranas. Eles observam que

o aumento do ângulo de contato pode estar relacionado ao molhamento heterogêneo causado pela rugosidade da superfície da membrana.

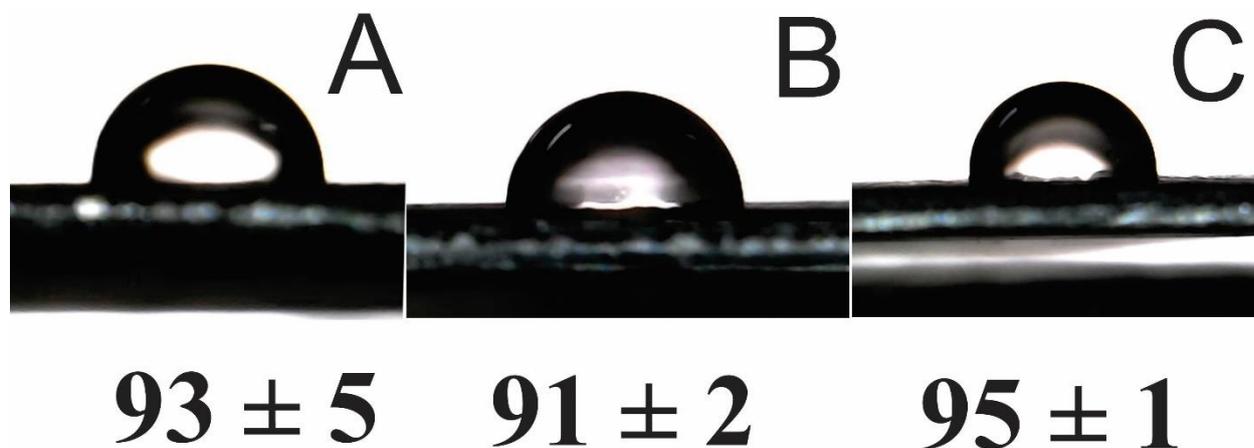


Figura 37. Ângulos de contato representativos de a) CHI20ZnO, b) CHI20Ag e c) CHI20Ag₂O.

Tabela 08. Valores detalhados de ângulo de contato com água das amostras de membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O.

<i>Amostras utilizadas de membranas</i>	Ângulo de contato (superficial) (°)	Ângulo de contato (fundo) (°)	Ângulo de contato (Média) (°)
CHI	96 ± 4	95 ± 6	96 ± 6
CHI20	71 ± 5	74 ± 5	73 ± 6
CHI20ZnO	91 ± 2	95 ± 3	93 ± 4
CHI20Ag	91 ± 2	91 ± 2	91 ± 2
CHI20Ag ₂ O	94,3 ± 0,4	96 ± 1	95 ± 1

As medidas de DRX foram realizadas para avaliar as fases cristalográficas presentes nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O e os padrões de difração estão apresentados na Figura 38. A estrutura amorfa das membranas de CHI e CHI20 é confirmada por um halo amorfo entre 15-30° [184]. Desse modo, as amostras de CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O apresentam picos e planos do ZnO com 2θ iguais a 31,92°; (100); 34,75°; (002); 36,58°; (101); 47,74°; (102); 56,74°; (110); 62,83°; (103); e 68,26; (112), os quais são equivalentes a fase do ZnO tipo Wurtzita (JCPDF ficha 75 no. 36-1451) o que evidencia a presença de NPsZnO nas membranas [70,185]. Para as amostras de membranas CHI20Ag e CHI20Ag₂O além dos picos típicos do ZnO, o pico de difração de pequena intensidade característico das NPsAg em 38,12° aparece. Este pico é característico da difração do plano (111) do arranjo cúbico de face centrada (FCC) da Ag [67]. Obviamente que essa técnica não é a mais apropriada para se detectar a presença das NPsAg e NPsAg₂O, devido às baixas quantidades utilizadas nesse trabalho e a falta de sensibilidade da técnica para detectar tais concentrações em tamanho nanométrico. Resultados semelhantes foram encontrados por Murali e colaboradores [186] que prepararam bionanocompósitos utilizando CHI/gelatina com diferentes concentrações de NPsZnO carregadas com Ag.

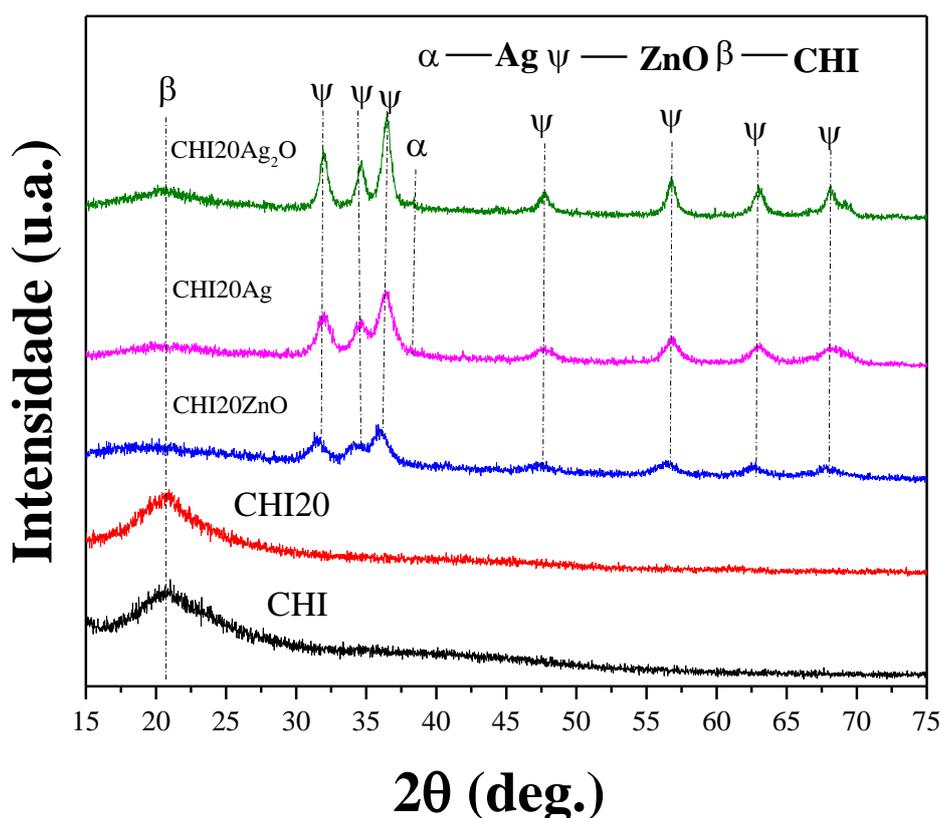


Figura 38. Os padrões de DRX das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O.

As medidas de PVA e TVA foram realizadas nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O. As membranas de CHI e CHI20ZnO apresentaram os menores valores de PVA ($8,4 \times 10^{-11} \pm 1 \times 10^{-12} \text{ gm}^{-1}\text{d}^{-1}\text{Pa}^{-1}$) e ($8,3 \times 10^{-11} \pm 2 \times 10^{-12} \text{ gm}^{-1}\text{d}^{-1}\text{Pa}^{-1}$), enquanto as demais amostras de membrana demonstraram valores mais elevados, com CHI20 ($8,7 \times 10^{-11} \pm 9 \times 10^{-13} \text{ gm}^{-1}\text{d}^{-1}\text{Pa}^{-1}$), CHI10Ag ($9,8 \times 10^{-11} \pm 9 \times 10^{-12} \text{ gm}^{-1}\text{d}^{-1}\text{Pa}^{-1}$) e CHI20Ag₂O ($8,9 \times 10^{-11} \pm 5,3 \times 10^{-12} \text{ gm}^{-1}\text{d}^{-1}\text{Pa}^{-1}$) após 7 dias, respectivamente. No entanto, as amostras de CHI20Ag e CHI20Ag₂O não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), indicando que essas membranas têm características semelhantes de permeabilidade ao vapor de água, mas diferem das membranas CHI, CHI20 e CHI20ZnO. Na Figura 39, são apresentados os PVA das respectivas amostras produzidas.

No estudo conduzido por Debandi *et al.* [173], foi observado que o teor de GLI teve um impacto significativo nas propriedades de barreira à água das membranas obtidas. No entanto,

existem relatos contraditórios sobre a influência da adição de GLI em membranas de CHI, dependendo da concentração de GLI, da massa molecular e do grau de desacetilação do polímero CHI. No contexto deste trabalho, à medida que a concentração de GLI aumentou, o PVA da membrana também aumentou, o que está em concordância com vários relatos [187,188]. O aumento observado no PVA com a adição de GLI foi resultado do aumento do volume livre entre as cadeias poliméricas, devido à diminuição das forças intermacromoleculares atrativas, resultando em uma matriz polimérica mais permeável.

Em um estudo conduzido por Jiao *et al.* [189], que explorou uma membrana composta com base em cloridrato de cianoguanidina de CHI (CBg) e PVP como revestimento conformável para produtos frescos, observou-se um aumento no PVA devido à maior concentração de PVP. Segundo eles, isso pode estar relacionado aos maiores valores de lacunas, espaços e vazios apresentados na seção transversal da superfície da membrana observada por MEV. Dessa forma, as membranas de CHI20Ag e CHI20Ag₂O apresentaram os maiores resultados de PVA provavelmente por apresentar maiores valores de lacunas, vazios ou espaços na seção transversal da superfície da membrana conforme resultados de MEV apresentados anteriormente.

Na Tabela 09, são apresentados os valores de TVA das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O após 24 horas, seguindo o mesmo padrão anteriormente estabelecido para a PVA (ver Figura 39). As amostras CHI20Ag ($78 \pm 7 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) e CHI20Ag₂O ($72 \pm 4 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) não apresentaram diferença significativa entre os valores médios obtidos ($p > 0,05$) após 24 horas. As amostras de CHI ($68 \pm 1 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$), CHI20 ($70 \pm 1 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) e CHI20ZnO ($66 \pm 2 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) apresentaram uma taxa maior, sem significância estatística entre eles. Além disso, é destacado que as membranas produzidos apresentaram valores de TVA próximos aos curativos comerciais para a pele, como, por exemplo, $50 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$ (*Bard* hidrogel) e $76 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$ (*Dermiflex* hidrocoloide, *Johnson & Johnson*) [190].

Tabela 09. Demonstração dos valores da TVA das amostras nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag, CHI20Ag₂O e o TVA de alguns curativos comerciais.

Amostras de membranas	TVA ($\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) 24h (n=3)	Autor Wu [190]	TVA ($\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) 24h (n=6)
CHI	68 ± 1	1) Hidrocolóide <i>Dermiflex Johnson & Johnson</i>	76 ± 5
CHI20	70 ± 1	2) Hidrogel <i>Bard</i>	50 ± 19
CHI20ZnO	66 ± 2	3) Hidrocolóide	
CHI20Ag	78 ± 7	<i>Duoderm Convatec Ltd</i>	120 ± 19
CHI20Ag ₂ O	72 ± 4		

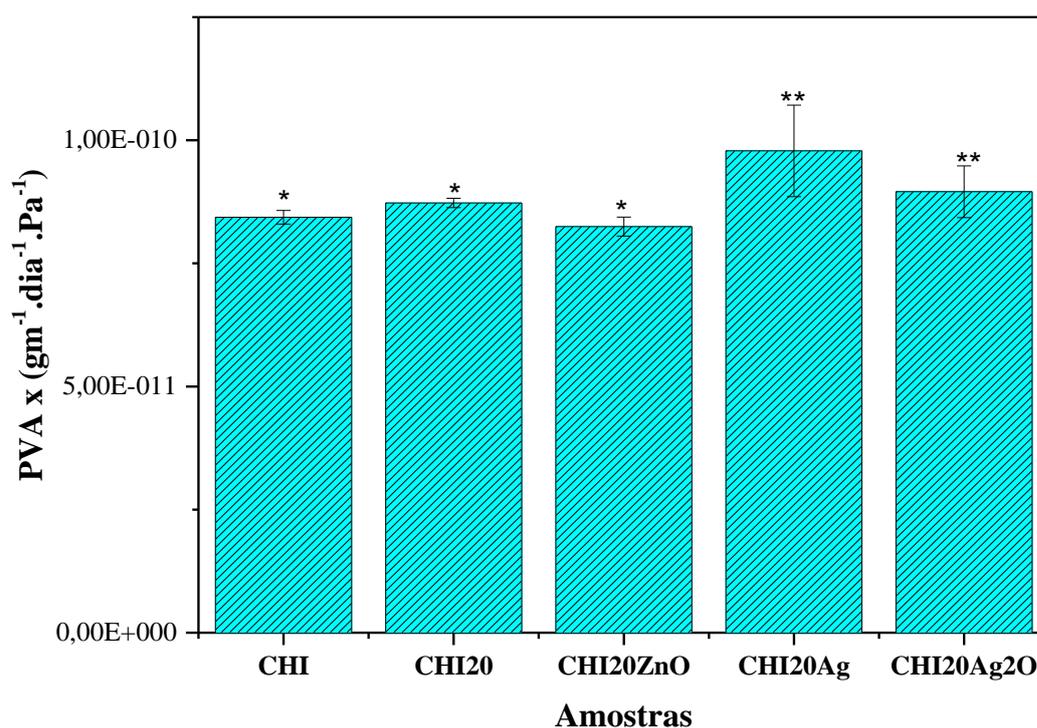


Figura 39. PVA das amostras nas membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O. As amostras de membranas possuem simbologia (*) para maior significância pelo teste ANOVA com ($p < 0,05$) ou variação de PVA e (**) para nenhuma significância pelo teste ANOVA com ($p < 0,05$) ou variação (PVA).

5.2.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O

5.2.3.1 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA NAS AMOSTRAS DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS COM OS NANOHÍBRIDOS.

A atividade antimicrobiana das membranas foi avaliada contra algumas cepas conhecidas usando um método convencional de difusão em ágar, e os resultados são mostrados na Figura 40. Todas as membranas demonstraram efeito antimicrobiano em suas superfícies contra os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Observou-se que o diâmetro do halo para a membrana de CHI foi de 6 ± 1 e 6 ± 2 mm, sem diferença significativa ($p > 0,05$), apresentando características distintas das demais amostras de membranas. Isso ocorre porque a CHI pode interagir com as paredes celulares carregadas negativamente dos microrganismos [176].

A membrana CHI20 apresentou um halo de 10 ± 1 e 8 ± 1 mm, e com a adição dos nanohíbridos para as amostras de membranas CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O, os valores foram de 11 ± 2 e 9 ± 2 mm, 13 ± 1 e 10 ± 1 mm, e 15 ± 1 e 17 ± 2 mm, respectivamente. A presença dos nanohíbridos ampliou a atividade antimicrobiana das amostras estudadas, e a amostra de membrana CHI20Ag₂O não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) do halo do grupo de controle utilizado com valores de 17 ± 1 e 19 ± 1 mm [191].

No trabalho desenvolvido por Li e colaboradores [181], apresenta que os diâmetros das colônias de bactérias na membrana de CHI puro e nas membranas de CHI/Ag/ZnO com diferentes proporções de massa de Ag e ZnO, sob efeito de luz nas amostras. Dessa forma, com o aumento dos teores de Ag e ZnO, o diâmetro das colônias de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e levedura diminuiu gradualmente. No entanto, as membranas de CHI/Ag/ZnO não foram tão eficazes na inibição do crescimento de *Aspergillus* quanto na inibição do crescimento de outros microorganismos.

Lade e sua equipe [192], desenvolveu uma membrana de CHI/GLI/ácido gálico/timol-NPsAg. Foram desenvolvidos ensaios antibactericida utilizando contra *E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus* e *S. pasteurii*. E apresentaram a zona de inibição máxima de 4, 6, 8 e 10 mm contra os

patógenos. No trabalho descrito por Indumathi *et al.* [183], foram desenvolvidas membranas com CHI, celulose e NPsZnO. A zona de inibição das resistências bacterianas foi significativamente aprimorada pela adição de NPsZnO na membrana de CHI/celulose e em comparação com o CHI puro. Este resultado destaca a eficácia da membrana modificada na inibição do crescimento bacteriano, sugerindo seu potencial para aplicações antimicrobianas.

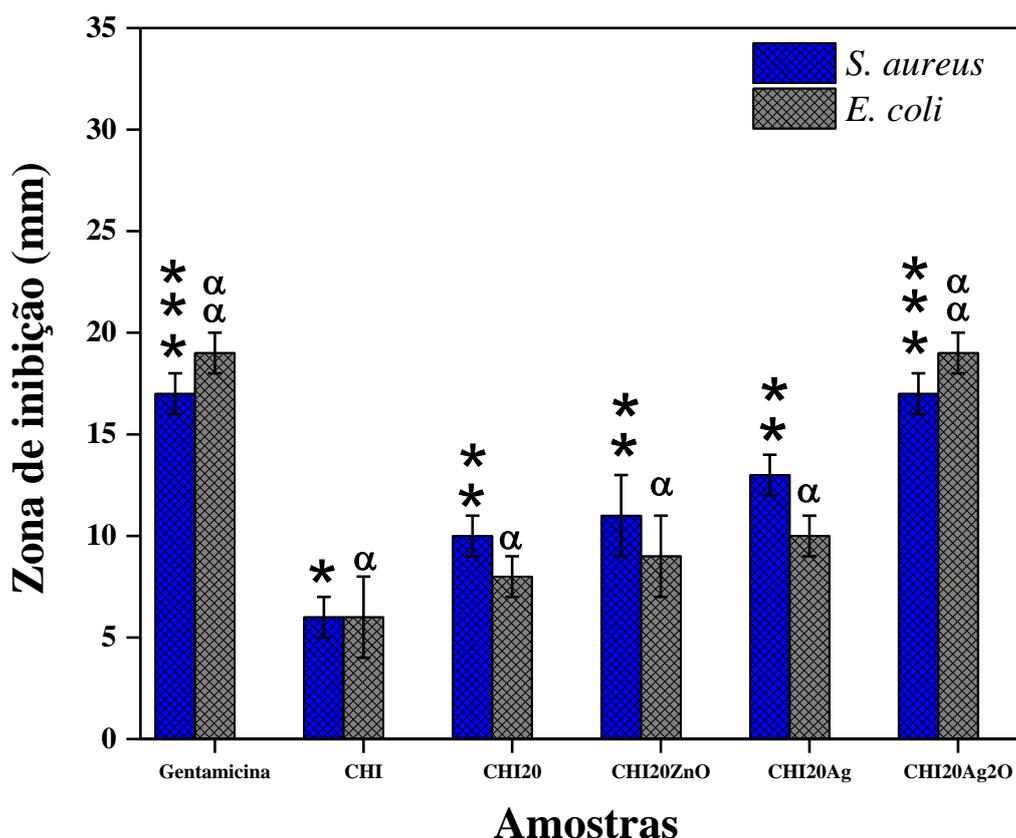


Figura 40. Demonstração dos resultados da atividade antimicrobiana das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O e a gentamicina controle positivo contra *E. coli* e *S. aureus*.

Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foram identificadas, indicadas por asteriscos (* e ***) para *S. aureus* e (α e α α α) para *E. Coli* que representam níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

A análise da atividade antimicrobiana promoveu uma avaliação substancial, englobando a determinação do CIM para as amostras das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O. Conforme evidenciado na Tabela 10, as amostras em análise manifestaram uma

eficácia notável na atividade antimicrobiana em relação a todas as cepas testadas. Destaca-se especialmente a notável atividade dessas membranas de CHI20Ag e CHI20Ag₂O contra *S. aureus* e *E. coli*, com valores de 25 e 50 mg/mL. Nesse sentido, apresenta uma eficiência em relação às amostras de membranas sem os nanohíbridos com CHI e CHI20 [192,193].

Nos trabalhos de Chandrasekarana e sua equipe [51] e Chowdhuri e colaboradores [193], foram feitos testes de atividade antibacteriana com NPsZnO em matriz de CHI contra vários, organismos patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S. typhi*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus*) e o CIM encontrado foi menor que o estabelecido para as nossa amostras de CHI20Ag e CHI20Ag₂O indicando que a presença de NPsAg e NPsAg₂O na superfície de ZnO gerou um efeito sinérgico de ação antimicrobiana.

Tabela 10. Apresenta os valores de inibição antimicrobiana específicos para cada cepa testada de CIM nas amostras das membranas de CHI, CHI20, CHI20ZnO, CHI20Ag e CHI20Ag₂O.

<i>Amostra utilizada</i>	Bactérias utilizadas	
	<i>S. aureus (mg/mL)</i>	<i>E coli (mg/mL)</i>
CHI	100	100
CHI20	100	100
CHI20ZnO	50	50
CHI20Ag	25	50
CHI20Ag ₂ O	25	50

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo demonstrou os avanços significativos no desenvolvimento e caracterização de nanohíbridos de ZnO/Ag ou ZnO/Ag₂O, bem como na conjugação eficaz desses nanomateriais em membranas poliméricas de CHI com sucesso. A síntese verde das NPsZnO, utilizando amido como agente quelante, foi otimizada, visando condições ideais de produção. As etapas subsequentes envolveram a preparação *in situ* das NPsAg ou NPsAg₂O nas NPsZnO, por meio de métodos de fotorredução e hidrotermal, seguida de uma abrangente caracterização utilizando diversas técnicas analíticas. A formulação adequada da membrana polimérica de CHI foi estabelecida, incluindo a determinação da quantidade de plastificante GLI. A incorporação bem-sucedida dos nanohíbridos nas membranas de CHI foi realizada, seguida por uma caracterização físico-química abrangente por meio de diversas técnicas espectroscópicas, térmicas, mecânicas e de imagem. Os nanohíbridos produzidos foram avaliados quanto à viabilidade celular em células macrófagos J774, antioxidantes e antidiabéticas. Evidenciando a potencial biocompatibilidade dos materiais desenvolvidos. Além disso, as propriedades bactericidas, foram testadas *in vitro* nos nanohíbridos e membranas produzidas, demonstrando promissoras aplicações biomédicas. Esses resultados consolidam a eficácia da abordagem adotada, destacando a relevância e o potencial impacto desses nanomateriais e membranas na área de biomateriais e terapias avançadas.

CAPÍTULO VII

***PERSPECTIVAS PARA
TRABALHOS FUTUROS***

7. TRABALHOS FUTUROS

- Análise de XPS para as amostras de nanohíbridos de ZnO, ZnOAg e ZnOAg₂O.
- Adicionar maiores concentrações de plastificante (GLI) na membrana de CHI
- Análise de FTIR para as amostras de membranas produzidas.
- Teste biológicos *in vitro* de citotoxicidade, antioxidantes e antidiabéticas para as membranas produzidas
- Teste mecânico de tração para as membranas com nanocompósitos
- Testes biológicos com avaliação *in vivo* para os nanocompósitos e membranas produzidos para propostos curativos de pele

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DAS, S.; BAKER, A.B. "Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 4, 2016.
- [2] WHITTAM, A.J.; MAAN, Z.N.; DUSCHER, D.; et al. "Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing", *Advances in Wound Care*, v. 5, (2), pp. 79–88, 2016.
- [3] SEN, C.K.; GORDILLO, G.M.; ROY, S.; et al. "Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy", *Wound Repair and Regeneration*, v. 17, (6), pp. 763–771, 2009.
- [4] FAROKHI, M.; MOTTAGHITALAB, F.; FATAHI, Y.; et al. "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings", *Trends in Biotechnology*, v. 36, (9), pp. 907–922, 2018.
- [5] MADNI, A.; KOUSAR, R.; NAEEM, N.; et al. "Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering", *Journal of Bioresources and Bioproducts*, v. 6, (1), pp. 11–25, 2021.
- [6] FENG, P.; LUO, Y.; KE, C.; et al. "Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, pp. 650598, 2021.
- [7] SALEHI, E.; KHAJAVIAN, M.; SAHEBJAMEE, N.; et al. "Advances in nanocomposite and nanostructured chitosan membrane adsorbents for environmental remediation: A review", *Desalination*, v. 527, pp. 115565, 2022.
- [8] AFONSO, C.R.; HIRANO, R.S.; GASPAR, A.L.; et al. "Biodegradable antioxidant chitosan films useful as an anti-aging skin mask", *International journal of biological macromolecules*, v. 132, pp. 1262–1273, 2019.
- [9] CARONI, J.G.; DE ALMEIDA MATTOS, A.V.; FERNANDES, K.R.; et al. "Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties", *Polymer Bulletin*, v. 78, (8), pp. 4297–4312, 2021.

- [10] AKAKURU, O.U.; LOUIS, H.; UWAOMA, R.; et al. "Novel highly-swellable and pH-responsive slow release formulations of clotrimazole with chitosan-g-PEG/starch microparticles", *Reactive and Functional Polymers*, v. 135, pp. 32–43, 2019.
- [11] ZHENG, K.; XIE, J. "Composition-Dependent Antimicrobial Ability of Full-Spectrum Au_xAg_{25-x} Alloy Nanoclusters", *ACS Nano*, v. 14, (9), pp. 11533–11541, 2020.
- [12] FAN, X.; YAHIA, L.; SACHER, E. "Antimicrobial Properties of the Ag, Cu Nanoparticle System", *Biology*, v. 10, (2), pp. 137, 2021.
- [13] ZHENG, K.; SETYAWATI, M.I.; LEONG, D.T.; et al. "Antimicrobial silver nanomaterials", *Coordination Chemistry Reviews*, v. 357, pp. 1–17, 2018.
- [14] BOGDAN, J.; ZARZYŃSKA, J.; PŁAWIŃSKA-CZARNAK, J. "Comparison of Infectious Agents Susceptibility to Photocatalytic Effects of Nanosized Titanium and Zinc Oxides: A Practical Approach", *Nanoscale Research Letters*, v. 10, (1), pp. 309, 2015.
- [15] BHAT, S.S.; QURASHI, A.; KHANDAY, F.A. "ZnO nanostructures based biosensors for cancer and infectious disease applications: Perspectives, prospects and promises", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 86, pp. 1–13, 2017.
- [16] MIRON, A.; GIURCANEANU, C.; MIHAI, M.M.; et al. "Antimicrobial Biomaterials for Chronic Wound Care", *Pharmaceutics*, v. 15, (6), pp. 1606, 2023.
- [17] RASHMI, B.N.; HARLAPUR, S.F.; AVINASH, B.; et al. "Facile green synthesis of silver oxide nanoparticles and their electrochemical, photocatalytic and biological studies", *Inorganic Chemistry Communications*, v. 111, pp. 107580, 2020.
- [18] BORGES ROSA DE MOURA, F.; ANTONIO FERREIRA, B.; HELENA MUNIZ, E.; et al. "Antioxidant, anti-inflammatory, and wound healing effects of topical silver-doped zinc oxide and silver oxide nanocomposites", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 617, pp. 121620, 2022.

- [19]MADHUMITHA, G.; ELANGO, G.; ROOPAN, S.M. "Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, (2), pp. 571–581, 2016.
- [20]AGARWAL, H.; SHANMUGAM, V. "A review on anti-inflammatory activity of green synthesized zinc oxide nanoparticle: Mechanism-based approach", *Bioorganic Chemistry*, v. 94, pp. 103423, 2020.
- [21]PENG, Y.; ZHOU, H.; WU, Y.; et al. "A new strategy to construct cellulose-chitosan films supporting Ag/Ag₂O/ZnO heterostructures for high photocatalytic and antibacterial performance", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 609, pp. 188–199, 2022.
- [22]THIAGARAJAN, P.; SANGAPPA, M. "Combating drug resistant pathogenic bacteria isolated from clinical infections, with silver oxide nanoparticles", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 77, (2), pp. 151, 2015.
- [23]CHEN, Z.-Y.; GAO, S.; ZHANG, Y.-W.; et al. "Antibacterial biomaterials in bone tissue engineering", *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, (11), pp. 2594–2612, 2021.
- [24]ROJO, L.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, L.; AGUILAR, M.R.; et al. "Antimicrobial polymeric biomaterials based on synthetic, nanotechnology, and biotechnological approaches", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 76, pp. 102752, 2022.
- [25]PIEJKO, M.; RADZIUN, K.; BOBIS-WOZOWICZ, S.; et al. "Adipose-Derived Stromal Cells Seeded on Integra® Dermal Regeneration Template Improve Post-Burn Wound Reconstruction", *Bioengineering*, v. 7, (3), pp. 67, 2020.
- [26]VOWDEN, K.; VOWDEN, P. "Understanding exudate management and the role of exudate in the healing process", *British Journal of Community Nursing*, v. 8, (Sup5), pp. S4–S13, 2003.
- [27]FESTAS, A.; RAMOS, A.; DAVIM, J. "Medical devices biomaterials – A review", *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, v. 234, (1), pp. 218–228, 2020.

- [28] SHAH, S.A.; SOHAIL, M.; KHAN, S.; et al. "Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 139, pp. 975–993, 2019.
- [29] HE, W.; BENSON, R. "Polymeric Biomaterials", In: *Applied Plastics Engineering Handbook*. Elsevier; 2017:145–164.
- [30] HASIRCI, N.; HASIRCI, V., Eds. "*Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissue*", Boston, MA: Springer US : Imprint : Springer; 2004.
- [31] SALEHI, E.; DARAEI, P.; ARABI SHAMSABADI, A. "A review on chitosan-based adsorptive membranes", *Carbohydrate Polymers*, v. 152, pp. 419–432, 2016.
- [32] CROISIER, F.; JÉRÔME, C. "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering", *European Polymer Journal*, v. 49, (4), pp. 780–792, 2013.
- [33] BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; et al. "Preparation, characterization and evaluation of glycerol plasticized chitosan/PVA blends for burn wounds", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 124, pp. 155–162, 2019.
- [34] BRUNA, T.; MALDONADO-BRAVO, F.; JARA, P.; et al. "Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications", *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, (13), pp. 7202, 2021.
- [35] GUDKOV, S.V.; BURMISTROV, D.E.; SEROV, D.A.; et al. "A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles", *Frontiers in Physics*, v. 9, pp. 641481, 2021.
- [36] MOHAMMADI ARVANAG, F.; BAYRAMI, A.; HABIBI-YANGJEH, A.; et al. "A comprehensive study on antidiabetic and antibacterial activities of ZnO nanoparticles biosynthesized using *Silybum marianum* L seed extract", *Materials Science and Engineering: C*, v. 97, pp. 397–405, 2019.
- [37] DAS, D.; NATH, B.C.; PHUKON, P.; et al. "Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of antioxidant and cytotoxic activity", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 111, pp. 556–560, 2013.

- [38] GALIANO, F.; BRICEÑO, K.; MARINO, T.; et al. "Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications", *Journal of Membrane Science*, v. 564, pp. 562–586, 2018.
- [39] ROSSI, M.; CUBADDA, F.; DINI, L.; et al. "Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends", *Trends in Food Science & Technology*, v. 40, (2), pp. 127–148, 2014.
- [40] SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. "The present and future of nanotechnology in human health care", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 3, (1), pp. 20–31, 2007.
- [41] ROCO, M.C.; MIRKIN, C.A.; HERSAM, M.C. "Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study", *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, (3), pp. 897–919, 2011.
- [42] SU, S.; KANG, P.M. "Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine", *Nanomaterials*, v. 10, (4), pp. 656, 2020.
- [43] KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, (1), pp. 1–18, 2010.
- [44] LUZURIAGA, M.A.; SHAHRIVARKEVISHAHI, A.; HERBERT, F.C.; et al. "Biomaterials and nanomaterials for sustained release vaccine delivery", *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 13, (6), pp. e1735, 2021.
- [45] KALPANA, V.N.; DEVI RAJESWARI, V. "A Review on Green Synthesis, Biomedical Applications, and Toxicity Studies of ZnO NPs", *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2018, pp. 1–12, 2018.
- [46] XU, J.; HUANG, Y.; ZHU, S.; et al. "A review of the green synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and their prospects for application in antibacterial textiles", *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 16, pp. 155892502110462, 2021.
- [47] ISLAM, F.; SHOHAG, S.; UDDIN, MD.J.; et al. "Exploring the Journey of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) toward Biomedical Applications", *Materials*, v. 15, (6), pp. 2160, 2022.

- [48]ZEGHOUD, S.; HEMMAMI, H.; BEN SEGHIR, B.; et al. "A review on biogenic green synthesis of ZnO nanoparticles by plant biomass and their applications", *Materials Today Communications*, v. 33, pp. 104747, 2022.
- [49]MEDINA CRUZ, D.; MOSTAFAVI, E.; VERNET-CRUA, A.; et al. "Green nanotechnology-based zinc oxide (ZnO) nanomaterials for biomedical applications: a review", *Journal of Physics: Materials*, v. 3, (3), pp. 034005, 2020.
- [50]NAGARAJAN, S.; ARUMUGAM KUPPUSAMY, K. "Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India", *Journal of Nanobiotechnology*, v. 11, (1), pp. 39, 2013.
- [51]CHANDRASEKARAN, S.; ANUSUYA, S.; ANBAZHAGAN, V. "Anticancer, anti-diabetic, antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: A comparative analysis", *Journal of Molecular Structure*, v. 1263, pp. 133139, 2022.
- [52]SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; et al. "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism", *Nano-Micro Letters*, v. 7, (3), pp. 219–242, 2015.
- [53]KHORSAND ZAK, A.; ABD. MAJID, W.H.; MAHMOUDIAN, M.R.; et al. "Starch-stabilized synthesis of ZnO nanopowders at low temperature and optical properties study", *Advanced Powder Technology*, v. 24, (3), pp. 618–624, 2013.
- [54]PATIL, A.P.; KAPADNIS, K.H. "Antibacterial Applications of Biosynthesized AgNPs: A Short Review (2015-2020)", *Material Science Research India*, v. 18, (2), pp. 143–153, 2021.
- [55]DAS, C.G.A.; KUMAR, V.G.; DHAS, T.S.; et al. "Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 27, pp. 101593, 2020.
- [56]FLORES-LÓPEZ, L.Z.; ESPINOZA-GÓMEZ, H.; SOMANATHAN, R. "Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review", *Journal of Applied Toxicology*, v. 39, (1), pp. 16–26, 2019.

- [57]RANI, N.; GOSWAMI, N.; YADAV, S.; et al. "Biosynthesis of hydrophilic zinc oxide nanoparticles using *Plumeria obtusa* and *Tabernaemontana divaricata* flower extract for antidiabetic treatment", *Chemical Papers*, v. 76, (8), pp. 5051–5062, 2022.
- [58]MAHEO, A.R.; VITHIYA B, S.M.; ARUL PRASAD T, A.; et al. "Cytotoxic, Antidiabetic, and Antioxidant Study of Biogenically Improved *Elsholtzia blanda* and Chitosan-Assisted Zinc Oxide Nanoparticles", *ACS Omega*, v. 8, (12), pp. 10954–10967, 2023.
- [59]MALIK, A.R.; SHARIF, S.; SHAHEEN, F.; et al. "Green synthesis of RGO-ZnO mediated *Ocimum basilicum* leaves extract nanocomposite for antioxidant, antibacterial, antidiabetic and photocatalytic activity", *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 26, (2), pp. 101438, 2022.
- [60]MANASA, D.J.; CHANDRASHEKAR, K.R.; PAVAN KUMAR, M.A.; et al. "Proficient synthesis of zinc oxide nanoparticles from *Tabernaemontana heyneana* Wall. via green combustion method: Antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, anticancer and photocatalytic activities", *Results in Chemistry*, v. 3, pp. 100178, 2021.
- [61]AL-RADADI, N.S.; ABDULLAH; FAISAL, S.; et al. "Zingiber officinale driven bioproduction of ZnO nanoparticles and their anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-Alzheimer, anti-oxidant, and anti-microbial applications", *Inorganic Chemistry Communications*, v. 140, pp. 109274, 2022.
- [62]BALACHANDAR, R.; NAVANEETHAN, R.; BIRUNTHA, M.; et al. "Antibacterial activity of silver nanoparticles phytosynthesized from *Glochidion candolleianum* leaves", *Materials Letters*, v. 311, pp. 131572, 2022.
- [63]ROBKHOB, P.; GHOSH, S.; BELLARE, J.; et al. "Effect of silver doping on antidiabetic and antioxidant potential of ZnO nanorods", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 58, pp. 126448, 2020.
- [64]BARWANT, M.; UGALE, Y.; GHOTEKAR, S.; et al. "Eco-friendly synthesis and characterizations of Ag/AgO/Ag₂O nanoparticles using leaf extracts of *Solanum elaeagnifolium* for antioxidant, anticancer, and DNA cleavage activities", *Chemical Papers*, v. 76, (7), pp. 4309–4321, 2022.

- [65] IQBAL, Y.; RAOUF MALIK, A.; IQBAL, T.; et al. "Green synthesis of ZnO and Ag-doped ZnO nanoparticles using *Azadirachta indica* leaves: Characterization and their potential antibacterial, antidiabetic, and wound-healing activities", *Materials Letters*, v. 305, pp. 130671, 2021.
- [66] HOSSEIN MOHAMMADI, A.; SOBHANI-NASAB, A.; NEJATI, M.; et al. "Preparation and characterization of CuO, Ag₂O and ZnO nanoparticles and Investigation of their antibacterial and anticancer properties on HCT-116 and C26 cells", *Inorganic Chemistry Communications*, v. 149, pp. 110404, 2023.
- [67] SILVA, M.R.P.D.; MATOS, R.S.; MONTEIRO, M.D.S.; et al. "Exploiting the Physicochemical and Antimicrobial Properties of PHB/PEG and PHB/PEG/ALG-e Blends Loaded with Ag Nanoparticles", *Materials*, v. 15, (21), pp. 7544, 2022.
- [68] BAGHERI, M.; VALIDI, M.; GHOLIPOUR, A.; et al. "Chitosan nanofiber biocomposites for potential wound healing applications: Antioxidant activity with synergic antibacterial effect", *Bioengineering & Translational Medicine*, v. 7, (1), pp. e10254, 2022.
- [69] QIU, B.; XU, X.; DENG, R.; et al. "Construction of chitosan/ZnO nanocomposite film by in situ precipitation", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 122, pp. 82–87, 2019.
- [70] ANDRADE, G.R.S.; NASCIMENTO, C.C.; LIMA, Z.M.; et al. "Star-shaped ZnO/Ag hybrid nanostructures for enhanced photocatalysis and antibacterial activity", *Applied Surface Science*, v. 399, pp. 573–582, 2017.
- [71] MAHRSI, M.I.; CHOUCHENE, B.; GRIES, T.; et al. "Novel ZnO/Ag nanohybrids prepared from Ag⁺-doped layered zinc hydroxides as highly active photocatalysts for the degradation of dyes and Ciprofloxacin", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 671, pp. 131643, 2023.
- [72] RIBEIRO LOPES, J.; AZEVEDO DOS REIS, R.; ALMEIDA, L.E. "Production and characterization of films containing poly(hydroxybutyrate) (PHB) blended with esterified alginate (ALG-e) and poly(ethylene glycol) (PEG)", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 134, (1), pp. app.44362, 2017.

- [73] BHUMKAR, D.R.; POKHARKAR, V.B. "Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note", *AAPS PharmSciTech*, v. 7, (2), pp. E138–E143, 2006.
- [74] ASTM D882-10. "Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting", ASTM International; 2009.
- [75] TURKY, A.O.; BARHOUM, A.; MOHAMEDRASHAD, M.; et al. "Enhanced the structure and optical properties for ZnO/PVP nanofibers fabricated via electrospinning technique", *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v. 28, (23), pp. 17526–17532, 2017.
- [76] SADEGHI, K.; SHAHEDI, M. "Physical, mechanical, and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer/chitosan/nano-ZnO (ECNZn) nanocomposite films incorporating glycerol plasticizer", *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 10, (1), pp. 137–147, 2016.
- [77] KALIA, S.; DHIMAN, V.; TEKOU CAROL T., T.; et al. "Antibacterial activities of Bi-Ag co-doped cobalt ferrite and their ZnO/Ag nanocomposite/s", *Inorganic Chemistry Communications*, v. 150, pp. 110382, 2023.
- [78] ZEYREK ONGUN, M.; OGUZLAR, S.; KARTAL, U.; et al. "Energy harvesting nanogenerators: Electrospun β -PVDF nanofibers accompanying ZnO NPs and ZnO@Ag NPs", *Solid State Sciences*, v. 122, pp. 106772, 2021.
- [79] FATIMAH, I. "Green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Parkia speciosa* Hassk pods assisted by microwave irradiation", *Journal of Advanced Research*, v. 7, (6), pp. 961–969, 2016.
- [80] RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. "Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction", *Physica B: Condensed Matter*, v. 192, (1–2), pp. 55–69, 1993.
- [81] ROISNEL, T.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, J. "WinPLOT: A Windows tool for powder diffraction pattern analysis"; 2001:123.
- [82] CAGLIOTI, G.; PAOLETTI, A.; RICCI, F.P. "Choice of collimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction", *Nuclear Instruments*, v. 3, (4), pp. 223–228, 1958.

- [83] ZHAO, T.; JIANG, L. "Contact angle measurement of natural materials", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 161, pp. 324–330, 2018.
- [84] STANDARD, A. "E96/E96M-05.", *Standard test method for water vapor transmission of material*, 2005.
- [85] MARTELLI, M.R.; BARROS, T.T.; DE MOURA, M.R.; et al. "Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films", *Journal of Food Science*, v. 78, (1), pp. N98–N104, 2013.
- [86] JORGENSEN, J.H.; HINDLER, J.F.; RELLER, L.B.; et al. "New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria", *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, (2), pp. 280–286, 2007.
- [87] SANTOS, P.A.L.D.; SANTOS, L.C.D.; COSTA, R.D.A.; et al. "Perfil químico e atividade antimicrobiana de abarema cochliacarpos", *Research, Society and Development*, v. 11, (4), pp. e22911427226, 2022.
- [88] FLICK, A.L.; BARK, C.J.; HARRELL, J.H. "Serum Amylase Values by the Caraway Method in Hospitalized Patients and Normal Controls", *American Journal of Clinical Pathology*, v. 53, (4), pp. 458–461, 1970.
- [89] BLOIS, M.S. "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical", *Nature*, v. 181, (4617), pp. 1199–1200, 1958.
- [90] MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, v. 65, (1–2), pp. 55–63, 1983.
- [91] WANG, R.; LI, M.; LIU, J.; et al. "Dual modification manipulates rice starch characteristics following debranching and propionate esterification", *Food Hydrocolloids*, v. 119, pp. 106833, 2021.

- [92] KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. "Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, (14), pp. 3912–3918, 2002.
- [93] SILVA, M.R.P.; MATOS, R.S.; PINTO, E.P.; et al. "Advanced Microtexture Evaluation of Dextran Biofilms Obtained from Low Cost Substrate Loaded with *Maytenus rigida* Extract", *Materials Research*, 2020.
- [94] MATOS, R.S.; ATTAH-BAAH, J.M.; MONTEIRO, M.D.S.; et al. "Effect of the amapá-latex chelating agent contents on the microstructure and photocatalytic properties of ZnO nanoparticles", *Journal of Materials Research and Technology*, v. 22, pp. 2673–2689, 2023.
- [95] MATOS, R.; ATTAH-BAAH, J.; MONTEIRO, M.; et al. "Evaluation of the Photocatalytic Activity of Distinctive-Shaped ZnO Nanocrystals Synthesized Using Latex of Different Plants Native to the Amazon Rainforest", *Nanomaterials*, v. 12, (16), pp. 2889, 2022.
- [96] FERREIRA, N.S.; SASAKI, J.M.; SILVA JR, R.S.; et al. "Visible-Light-Responsive Photocatalytic Activity Significantly Enhanced by Active [$V_{Zn} + V_{O}^{+}$] Defects in Self-Assembled ZnO Nanoparticles", *Inorganic Chemistry*, v. 60, (7), pp. 4475–4496, 2021.
- [97] AHMED, L.; S. FADHIL, E.; F. MOHAMMED, A. "Effect of silver doping on structural and photocatalytic circumstances of ZnO nanoparticles", *Iraqi Journal of Nanotechnology*, (1), pp. 13–20, 2020.
- [98] GAIKWAD, S.S.; CHOUDHARI, V.P. "Efficacy and Safety of Combination Therapy of Zinc and Silver Oxide Nanoparticles in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats", *International Journal Of Pharmaceutical Research And Allied Sciences*, v. 11, (3), pp. 1–10, 2022.
- [99] QIAO, Y.; WANG, B.; JI, Y.; et al. "Thermal decomposition of castor oil, corn starch, soy protein, lignin, xylan, and cellulose during fast pyrolysis", *Bioresource Technology*, v. 278, pp. 287–295, 2019.

- [100] XIONG, G.; PAL, U.; SERRANO, J.G.; et al. "Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective", *physica status solidi c*, v. 3, (10), pp. 3577–3581, 2006.
- [101] KHAN, S.B.; FAISAL, M.; RAHMAN, M.M.; et al. "Low-temperature growth of ZnO nanoparticles: Photocatalyst and acetone sensor", *Talanta*, v. 85, (2), pp. 943–949, 2011.
- [102] LOGANATHAN, S.; MANIMARAN, K.; MUTAMIMURUGAN, K.; et al. "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) by *Pterolobium hexapetalum* (Roth) Santapau & Wagh Aqueous Leaf Extract and Its Assessment of Biocompatible, Antibacterial, DPPH Radical Scavenging, Anticancer and Larvicidal Activities: An Effective Eco-Friendly Approach", In Review; 2022.
- [103] PANT, H.R.; PANT, B.; SHARMA, R.K.; et al. "Antibacterial and photocatalytic properties of Ag/TiO₂/ZnO nano-flowers prepared by facile one-pot hydrothermal process", *Ceramics International*, v. 39, (2), pp. 1503–1510, 2013.
- [104] BALA, N.; SAHA, S.; CHAKRABORTY, M.; et al. "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity", *RSC Advances*, v. 5, (7), pp. 4993–5003, 2015.
- [105] VASANTHARAJ, S.; SATHIYAVIMAL, S.; SENTHILKUMAR, P.; et al. "Enhanced photocatalytic degradation of water pollutants using bio-green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs)", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, (4), pp. 105772, 2021.
- [106] FU, L.; FU, Z. "Plectranthus amboinicus leaf extract–assisted biosynthesis of ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity", *Ceramics International*, v. 41, (2), pp. 2492–2496, 2015.
- [107] AZIZ, S.B.; ABDULLAH, O.GH.; SABER, D.R.; et al. "Investigation of Metallic Silver Nanoparticles through UV-Vis and Optical Micrograph Techniques", *International Journal of Electrochemical Science*, v. 12, (1), pp. 363–373, 2017.
- [108] WU, Q.; SI, M.; ZHANG, B.; et al. "Strong damping of the localized surface plasmon resonance of Ag nanoparticles by Ag₂O", *Nanotechnology*, v. 29, (29), pp. 295702, 2018.

- [109] WHANG, T.-J.; HSIEH, M.-T.; CHEN, H.-H. "Visible-light photocatalytic degradation of methylene blue with laser-induced Ag/ZnO nanoparticles", *Applied Surface Science*, v. 258, (7), pp. 2796–2801, 2012.
- [110] KACZMARSKA, K.; GRABOWSKA, B.; SPYCHAJ, T.; et al. "Effect of microwave treatment on structure of binders based on sodium carboxymethyl starch: FT-IR, FT-Raman and XRD investigations", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 199, pp. 387–393, 2018.
- [111] SHUME, W.M.; MURTHY, H.C.A.; ZEREFFA, E.A. "A Review on Synthesis and Characterization of Ag₂O Nanoparticles for Photocatalytic Applications", *Journal of Chemistry*, v. 2020, pp. 1–15, 2020.
- [112] LOPES DE ALMEIDA, W.; FERREIRA, N.S.; RODEMBUSCH, F.S.; et al. "Study of structural and optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by an eco-friendly tapioca-assisted route", *Materials Chemistry and Physics*, v. 258, pp. 123926, 2021.
- [113] SAWADA, H.; WANG, R.; SLEIGHT, A.W. "An Electron Density Residual Study of Zinc Oxide", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 122, (1), pp. 148–150, 1996.
- [114] SUH, I.-K.; OHTA, H.; WASEDA, Y. "High-temperature thermal expansion of six metallic elements measured by dilatation method and X-ray diffraction", *Journal of Materials Science*, v. 23, (2), pp. 757–760, 1988.
- [115] NIGGLI, P. "XII. Die Kristallstruktur einiger Oxyde I", *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials*, v. 57, (1–6), pp. 253–299, 1922.
- [116] LI, P.; ZHANG, H.; LI, Z.; et al. "Effect of surfactants on morphology, structure and photoluminescence properties of Eu-doped ZnO microsphere", *Optoelectronics Letters*, v. 16, (4), pp. 293–297, 2020.
- [117] SAFARDOUST-HOJAGHAN, H.; SALAVATI-NIASARI, M.; AMIRI, O.; et al. "Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of carbon quantum dots-decorated ZnO nanoparticles", *Ceramics International*, v. 47, (4), pp. 5187–5197, 2021.

- [118] HALDORAI, Y.; VOIT, W.; SHIM, J.-J. "Nano ZnO@reduced graphene oxide composite for high performance supercapacitor: Green synthesis in supercritical fluid", *Electrochimica Acta*, v. 120, pp. 65–72, 2014.
- [119] GANDHI, V.; GANESAN, R.; ABDULRAHMAN SYEDAHAMED, H.H.; et al. "Effect of Cobalt Doping on Structural, Optical, and Magnetic Properties of ZnO Nanoparticles Synthesized by Coprecipitation Method", *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 118, (18), pp. 9715–9725, 2014.
- [120] BABITHA, N.; PRIYA, L.S.; CHRISTY, S.R.; et al. "Enhanced Antibacterial Activity and Photo-Catalytic Properties of ZnO Nanoparticles: *Pedaliium Murex* Plant Extract-Assisted Synthesis", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 19, (5), pp. 2888–2894, 2019.
- [121] JAYASEELAN, C.; RAHUMAN, A.A.; KIRTHI, A.V.; et al. "Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 90, pp. 78–84, 2012.
- [122] CHEMINGUI, H.; MISSAOUI, T.; MZALI, J.C.; et al. "Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs): antibacterial and photocatalytic activities", *Materials Research Express*, v. 6, (10), pp. 1050b4, 2019.
- [123] SURESH, S.; KARTHIKEYAN, S.; JAYAMOORTHY, K. "Spectral investigations to the effect of bulk and nano ZnO on peanut plant leaves", *Karbala International Journal of Modern Science*, v. 2, (2), pp. 69–77, 2016.
- [124] SINGH, R.P.; RAMARAO, P. "Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles", *Toxicology Letters*, v. 213, (2), pp. 249–259, 2012.
- [125] SHARMA, G.; KALRA, S.K.; TEJAN, N.; et al. "Nanoparticles based therapeutic efficacy against *Acanthamoeba*: Updates and future prospect", *Experimental Parasitology*, v. 218, pp. 108008, 2020.

- [126] YE, C.; ZHU, Z.; LI, X.; et al. "ZIF-8 derived TiO₂/ZnO heterostructure decorated with AgNPs as SERS sensor for sensitive identification of trace pesticides", *Journal of Alloys and Compounds*, v. 901, pp. 163675, 2022.
- [127] PATIL, S.S.; MALI, M.G.; TAMBOLI, M.S.; et al. "Green approach for hierarchical nanostructured Ag-ZnO and their photocatalytic performance under sunlight", *Catalysis Today*, v. 260, pp. 126–134, 2016.
- [128] WU, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, Y.; et al. "Light-induced ZnO/Ag/rGO bactericidal photocatalyst with synergistic effect of sustained release of silver ions and enhanced reactive oxygen species", *Chinese Journal of Catalysis*, v. 40, (5), pp. 691–702, 2019.
- [129] LUNGU, M.-V.; VASILE, E.; LUCACI, M.; et al. "Investigation of optical, structural, morphological and antimicrobial properties of carboxymethyl cellulose capped Ag-ZnO nanocomposites prepared by chemical and mechanical methods", *Materials Characterization*, v. 120, pp. 69–81, 2016.
- [130] ZHOU, J.; ZHAO, F.; WANG, Y.; et al. "Size-controlled synthesis of ZnO nanoparticles and their photoluminescence properties", *Journal of Luminescence*, v. 122–123, pp. 195–197, 2007.
- [131] GAWADE, V.V.; GAVADE, N.L.; SHINDE, H.M.; et al. "Green synthesis of ZnO nanoparticles by using *Calotropis procera* leaves for the photodegradation of methyl orange", *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v. 28, (18), pp. 14033–14039, 2017.
- [132] ANEESH, P.M.; VANAJA, K.A.; JAYARAJ, M.K. "Synthesis of ZnO nanoparticles by hydrothermal method", In: Gaburro Z, Cabrini S, eds. San Diego, California, USA; 2007:66390J.
- [133] NGUYEN, V.; VU, V.; NGUYEN, T.; et al. "Antibacterial Activity of TiO₂- and ZnO-Decorated with Silver Nanoparticles", *Journal of Composites Science*, v. 3, (2), pp. 61, 2019.
- [134] ALHOKBANY, N.; AHAMAD, T.; ALSHEHRI, S.M. "Fabrication of highly porous ZnO/Ag₂O nanoparticles embedded in N-doped graphitic carbon for photocatalytic degradation of tetracycline", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 10, (3), pp. 107681, 2022.

- [135] FOULADI-FARD, R.; AALI, R.; MOHAMMADI-AGHDAM, S.; et al. "The surface modification of spherical ZnO with Ag nanoparticles: A novel agent, biogenic synthesis, catalytic and antibacterial activities", *Arabian Journal of Chemistry*, v. 15, (3), pp. 103658, 2022.
- [136] STECKIEWICZ, K.P.; CIECIÓRSKI, P.; BARCIŃSKA, E.; et al. "Silver Nanoparticles as Chlorhexidine and Metronidazole Drug Delivery Platforms: Their Potential Use in Treating Periodontitis", *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 17, pp. 495–517, 2022.
- [137] GOWRIBOY, N.; KALAIVIZHI, R. "Optical properties containing of bioinspired Ag₂O nanoparticles anchored on CA/PES polymer membrane shows an effective adsorbent material", *Optik*, v. 259, pp. 168935, 2022.
- [138] FESSAS, D.; SCHIRALDI, A. "Water properties in wheat flour dough I: classical thermogravimetry approach", *Food Chemistry*, v. 72, (2), pp. 237–244, 2001.
- [139] RUDNIK, E.; MATUSCHEK, G.; MILANOV, N.; et al. "Thermal stability and degradation of starch derivatives", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 85, (2), pp. 267–270, 2006.
- [140] LIU, X.; WANG, Y.; YU, L.; et al. "Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions", *Starch - Stärke*, v. 65, (1–2), pp. 48–60, 2013.
- [141] YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; et al. "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis", *Fuel*, v. 86, (12–13), pp. 1781–1788, 2007.
- [142] TOGNETTI, L.; MARTINELLI, C.; BERTI, S.; et al. "Bacterial skin and soft tissue infections: review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment: A collaboration between dermatologists and infectivologists", *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 26, (8), pp. 931–941, 2012.
- [143] FUNG, H.B.; CHANG, J.Y.; KUCZYNSKI, S. "A Practical Guide to the Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections:", *A Practical Guide to the Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections*, v. 63, (14), pp. 1459–1480, 2003.

- [144] THATOI, P.; KERRY, R.G.; GOUDA, S.; et al. "Photo-mediated green synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of two mangrove plant species, *Heritiera fomes* and *Sonneratia apetala* and investigation of their biomedical applications", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 163, pp. 311–318, 2016.
- [145] PANDEY, M.; SINGH, M.; WASNIK, K.; et al. "Targeted and Enhanced Antimicrobial Inhibition of Mesoporous ZnO–Ag₂O/Ag, ZnO–CuO, and ZnO–SnO₂ Composite Nanoparticles", *ACS Omega*, v. 6, (47), pp. 31615–31631, 2021.
- [146] SINGH, G.; SINGH, G.; DAMARLA, K.; et al. "Gelatin-Based Highly Stretchable, Self-Healing, Conducting, Multiadhesive, and Antimicrobial Ionogels Embedded with Ag₂O Nanoparticles", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 5, (8), pp. 6568–6577, 2017.
- [147] SAJJAD, S.; UZAIR, B.; SHAUKAT, A.; et al. "Synergistic evaluation of AgO₂ nanoparticles with ceftriaxone against CTXM and blaSHV genes positive ESBL producing clinical strains of Uropathogenic *E. coli*", *IET Nanobiotechnology*, v. 13, (4), pp. 435–440, 2019.
- [148] NARAYANAN, P.M.; WILSON, W.S.; ABRAHAM, A.T.; et al. "Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against Human Pathogens", *BioNanoScience*, v. 2, (4), pp. 329–335, 2012.
- [149] YAN, D.; YIN, G.; HUANG, Z.; et al. "Cellular Compatibility of Biomaterialized ZnO Nanoparticles Based on Prokaryotic and Eukaryotic Systems", *Langmuir*, v. 27, (21), pp. 13206–13211, 2011.
- [150] NEJABATDOUST, A.; ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A. "Functionalization of ZnO Nanoparticles by Glutamic Acid and Conjugation with Thiosemicarbazide Alters Expression of Efflux Pump Genes in Multiple Drug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains", *Microbial Drug Resistance*, v. 25, (7), pp. 966–974, 2019.
- [151] ALAVI, M.; NOKHODCHI, A. "Synthesis and modification of bio-derived antibacterial Ag and ZnO nanoparticles by plants, fungi, and bacteria", *Drug Discovery Today*, v. 26, (8), pp. 1953–1962, 2021.

- [152] KHATAMI, M.; VARMA, R.S.; ZAFARNIA, N.; et al. "Applications of green synthesized Ag, ZnO and Ag/ZnO nanoparticles for making clinical antimicrobial wound-healing bandages", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 10, pp. 9–15, 2018.
- [153] EL-BELELY, E.F.; FARAG, M.M.S.; SAID, H.A.; et al. "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) Using *Arthrospira platensis* (Class: Cyanophyceae) and Evaluation of their Biomedical Activities", *Nanomaterials*, v. 11, (1), pp. 95, 2021.
- [154] ASOK, A.; GHOSH, S.; MORE, P.A.; et al. "Surface defect rich ZnO quantum dots as antioxidants inhibiting α -amylase and α -glucosidase: a potential anti-diabetic nanomedicine", *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, (22), pp. 4597–4606, 2015.
- [155] FAISAL, S.; JAN, H.; SHAH, S.A.; et al. "Green Synthesis of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using Aqueous Fruit Extracts of *Myristica fragrans*: Their Characterizations and Biological and Environmental Applications", *ACS Omega*, v. 6, (14), pp. 9709–9722, 2021.
- [156] MALAIKOZHUNDAN, B.; VINODHINI, J.; KALANJAM, M.A.R.; et al. "High synergistic antibacterial, antibiofilm, antidiabetic and antimetabolic activity of *Withania somnifera* leaf extract-assisted zinc oxide nanoparticle", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, (9), pp. 1533–1547, 2020.
- [157] ALAVI, M.; KARIMI, N.; VALADBEIGI, T. "Antibacterial, Antibiofilm, Antiquorum Sensing, Antimotility, and Antioxidant Activities of Green Fabricated Ag, Cu, TiO₂, ZnO, and Fe₃O₄ NPs via *Protopermaliopsis muralis* Lichen Aqueous Extract against Multi-Drug-Resistant Bacteria", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 5, (9), pp. 4228–4243, 2019.
- [158] AJDARY, M.; NEGAHDARY, M.; CHELONGAR, R.; et al. "The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in in vivo condition", *Advanced Biomedical Research*, v. 4, (1), pp. 69, 2015.

- [159] SHAHZAD SHIRAZI, M.; MORIDI FARIMANI, M.; FOROUMADI, A.; et al. "Bioengineered synthesis of phytochemical-adorned green silver oxide (Ag₂O) nanoparticles via *Mentha pulegium* and *Ficus carica* extracts with high antioxidant, antibacterial, and antifungal activities", *Scientific Reports*, v. 12, (1), pp. 21509, 2022.
- [160] ABOULTHANA, W.M.; OMAR, N.; HASAN, E.; et al. "Assessment of the Biological Activities of Egyptian Purslane (*Portulaca oleracea*) Extract after Incorporating Metal Nanoparticles, in Vitro and in Vivo Study", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 23, (1), pp. 287–310, 2022.
- [161] DULTA, K.; KOŞARSOY AĞÇELI, G.; CHAUHAN, P.; et al. "Ecofriendly Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by *Carica papaya* Leaf Extract and Their Applications", *Journal of Cluster Science*, v. 33, (2), pp. 603–617, 2022.
- [162] SURESH, P.; DOSS, A.; PRAVEEN POLE, R.P.; et al. "Green synthesis, characterization and antioxidant activity of bimetallic (Ag-ZnO) nanoparticles using *Capparis zeylanica* leaf extract", *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023.
- [163] ATHTHANAYAKA, S.; THIRIPURANATHAR, G.; EKANAYAKE, S. "Microwave-assisted phytogenic Ag/Ag₂O/ZnO nanocomposite as a replacement of Ag/Ag₂O and ZnO nanoparticles: A comparative antioxidant study", *Surfaces and Interfaces*, v. 43, pp. 103547, 2023.
- [164] GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A.B.; REGUERA, R.M.; et al. "New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis", *Chemical Society Reviews*, v. 45, (1), pp. 152–168, 2016.
- [165] BAGIROVA, M.; DINPARVAR, S.; ALLAHVERDIYEV, A.M.; et al. "Investigation of antileishmanial activities of *Cuminum cyminum* based green silver nanoparticles on *L. tropica* promastigotes and amastigotes in vitro", *Acta Tropica*, v. 208, pp. 105498, 2020.
- [166] BROWN, D.M.; JOHNSTON, H.J.; GAISER, B.; et al. "A cross-species and model comparison of the acute toxicity of nanoparticles used in the pigment and ink industries", *NanoImpact*, v. 11, pp. 20–32, 2018.

- [167] KERMANIZADEH, A.; GAISER, B.K.; HUTCHISON, G.R.; et al. "An in vitro liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials", *Particle and Fibre Toxicology*, v. 9, (1), pp. 28, 2012.
- [168] MOHANTY, S.; JENA, P.; MEHTA, R.; et al. "Cationic Antimicrobial Peptides and Biogenic Silver Nanoparticles Kill Mycobacteria without Eliciting DNA Damage and Cytotoxicity in Mouse Macrophages", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, (8), pp. 3688–3698, 2013.
- [169] IFUKU, S.; IKUTA, A.; IZAWA, H.; et al. "Control of mechanical properties of chitin nanofiber film using glycerol without losing its characteristics", *Carbohydrate Polymers*, v. 101, pp. 714–717, 2014.
- [170] KUSMONO; ABDURRAHIM, I. "Water sorption, antimicrobial activity, and thermal and mechanical properties of chitosan/clay/glycerol nanocomposite films", *Heliyon*, v. 5, (8), pp. e02342, 2019.
- [171] SABBAH, M.; DI PIERRO, P.; CAMMAROTA, M.; et al. "Development and properties of new chitosan-based films plasticized with spermidine and/or glycerol", *Food Hydrocolloids*, v. 87, pp. 245–252, 2019.
- [172] EPURE, V.; GRIFFON, M.; POLLET, E.; et al. "Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading", *Carbohydrate Polymers*, v. 83, (2), pp. 947–952, 2011.
- [173] MARIA V, D.; BERNAL, C.; FRANCOIS, N.J. "Development of Biodegradable Films Based on Chitosan/Glycerol Blends Suitable for Biomedical Applications", *Journal of Tissue Science & Engineering*, v. 07, (03), 2016.
- [174] LECETA, I.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. "Functional properties of chitosan-based films", *Carbohydrate Polymers*, v. 93, (1), pp. 339–346, 2013.
- [175] COBOS, M.; GONZÁLEZ, B.; FERNÁNDEZ, M.J.; et al. "Study on the effect of graphene and glycerol plasticizer on the properties of chitosan-graphene nanocomposites via in situ green chemical reduction of graphene oxide", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, pp. 599–613, 2018.

- [176] CHANG, X.; HOU, Y.; LIU, Q.; et al. "Physicochemical and antimicrobial properties of chitosan composite films incorporated with glycerol monolaurate and nano-TiO₂", *Food Hydrocolloids*, v. 119, pp. 106846, 2021.
- [177] NGUYEN, T.T.; PHAN, N.T.; TRINH, C.D.; et al. "Glycerol-plasticized chitosan film for the preservation of orange", *Journal of Food Safety*, v. 42, (1), pp. e12943, 2022.
- [178] AL-BELUSHI, M.A.; MYINT, M.T.Z.; KYAW, H.H.; et al. "ZnO nanorod-chitosan composite coatings with enhanced antifouling properties", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 162, pp. 1743–1751, 2020.
- [179] MA, D.; WANG, Q.; LI, T.; et al. "CO catalytic oxidation on Al-doped graphene-like ZnO monolayer sheets: a first-principles study", *Journal of Materials Chemistry C*, v. 3, (38), pp. 9964–9972, 2015.
- [180] WEI, X.; LI, Q.; WU, C.; et al. "Preparation, characterization and antibacterial mechanism of the chitosan coatings modified by Ag/ ZnO microspheres", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, (15), pp. 5527–5538, 2020.
- [181] LI, L.-H.; DENG, J.-C.; DENG, H.-R.; et al. "Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films", *Chemical Engineering Journal*, v. 160, (1), pp. 378–382, 2010.
- [182] JOVANOVIĆ, J.; ĆIRKOVIĆ, J.; RADOJKOVIĆ, A.; et al. "Chitosan and pectin-based films and coatings with active components for application in antimicrobial food packaging", *Progress in Organic Coatings*, v. 158, pp. 106349, 2021.
- [183] INDUMATHI, M.P.; SARAL SAROJINI, K.; RAJARAJESWARI, G.R. "Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 132, pp. 1112–1120, 2019.

- [184] SUSILOWATI, E.; KARTINI, I.; SANTOSA, S.J.; et al. "Effect of glycerol on mechanical and physical properties of silver-chitosan nanocomposite films", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 107, pp. 012041, 2016.
- [185] YILDIRIM, Ö.A.; UNALAN, H.E.; DURUCAN, C. "Highly Efficient Room Temperature Synthesis of Silver-Doped Zinc Oxide (ZnO : Ag) Nanoparticles: Structural, Optical, and Photocatalytic Properties", Klein L, ed. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 96, (3), pp. 766–773, 2013.
- [186] MURALI, S.; KUMAR, S.; KOH, J.; et al. "Bio-based chitosan/gelatin/Ag@ZnO bionanocomposites: synthesis and mechanical and antibacterial properties", *Cellulose*, v. 26, (9), pp. 5347–5361, 2019.
- [187] KOELSCH, C. "Edible water vapor barriers: properties and promise", *Trends in Food Science & Technology*, v. 5, (3), pp. 76–81, 1994.
- [188] HALÁSZ, K.; TÓTH, A.; BÖRCÖK, Z.; et al. "Edible, Antioxiadant Films from Ultrasonically Extracted Plantago psyllium Seed Husk Flour Mucilage", *Journal of Polymers and the Environment*, v. 30, (7), pp. 2685–2694, 2022.
- [189] JIAO, X.; XIE, J.; HAO, M.; et al. "Chitosan Biguanidine/PVP Antibacterial Coatings for Perishable Fruits", *Polymers*, v. 14, (13), pp. 2704, 2022.
- [190] WU, P.; FISHER, A.C.; FOO, P.P.; et al. "In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings", *Biomaterials*, v. 16, (3), pp. 171–175, 1995.
- [191] DE ALMEIDA SOARES, L.; DE AQUINO SANTANA, L.C.L. "Physicochemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Potential of Biodegradable Chitosan-Based Films Containing Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract", *Journal of Polymers and the Environment*, 2023.
- [192] LADE, B.; KAMDI, A.; SHANWARE, A. "Enhanced Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Blended with Gallic Acid and Incorporated with Thymol Silver Nanoparticles", *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 11, (6-S), pp. 53–69, 2021.

- [193] RAY CHOWDHURI, A.; TRIPATHY, S.; CHANDRA, S.; et al. "A ZnO decorated chitosan–graphene oxide nanocomposite shows significantly enhanced antimicrobial activity with ROS generation", *RSC Advances*, v. 5, (61), pp. 49420–49428, 2015.