



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

P²CEM

AMMY MÜLLER SOUZA CARVALHO

**MEMBRANAS DE ALGINATO DE SÓDIO E FIBROÍNA DE SEDA DOPADAS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA: Preparação e Caracterização**

**SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL
DEZEMBRO DE 2022**

AMMY MÜLLER SOUZA CARVALHO

MEMBRANAS DE ALGINATO DE SÓDIO E FIBROÍNA DE SEDA DOPADAS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA: Preparação e Caracterização

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL
DEZEMBRO DE 2022

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

C331m Carvalho, Ammy Müller Souza
Membranas de alginato de sódio e fibroína de seda dopadas com nanopartículas de prata: preparação e caracterização / Ammy Müller Souza Carvalho ; orientador Luís Eduardo Almeida. - São Cristóvão, 2022.
81 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Compostos de sódio. 2. Seda. 3. Nanopartículas. 4. Prata. I. Cristóvão, Luís Eduardo Almeida, Orient. II. Título.

CDU 620

“MEMBRANAS DE ALGINATO DE SÓDIO E FIBROÍNA DE
SEDA DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA:
Preparação e Caracterização”

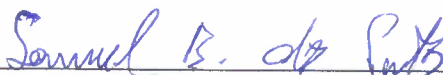
Ammy Müller Souza Carvalho

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS.

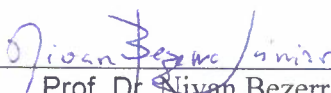
Aprovada por:



Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida



Prof. Dr. Samuel Bruno dos Santos



Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Junior

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL

Dezembro/2022

Dedico esta dissertação

A mim mesma por não ter desistido no meio de tantas desventuras em série, tanto na área acadêmica com experimentos dando errado milhares de vezes, como na vida pessoal, tudo virando de cabeça para baixo e precisando resolver e lidar com um monte de coisas ao mesmo tempo. Além de desencorajamentos em prosseguir com o mestrado por parte de algumas pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

- Primeiramente à Deus por ter me guiado, fortalecido e amparado durante toda essa caminhada cheia de atribulações.
- À minha mãe Gláucia e meu padrasto Richard pelo apoio, incentivo e base. Ao meu namorado Iury por ter sempre me incentivado e apoiado.
- Ao meu Orientador Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.
- À Profa. Dra. Mariana Agostini de Moraes por ter tirado minhas dúvidas quando entrei em contato desesperada porque os experimentos não estavam dando certo.
- À Professora Dra. Iara de Fátima Gimenez por conceder a utilização de seu laboratório (QUIBIOM) para o início da realização do trabalho antes da pandemia.
- Ao grupo de pesquisa de Biomateriais do P²CEM, aos alunos, funcionários e professores do departamento de engenharia de materiais – UFS, em especial Jaqueline, Bianca, Mário, Keyte, Gabi e Jander.
- Ao professor Dr. Samuel Bruno dos Santos do Laboratório de química de produtos naturais e bioquímica – UFS pelos ensaios biológicos.
- À Dra. Roberta Menezes Santos, assistente da coordenação do Centro de Laboratórios de Química Multiusuários – CLQM pelos resultados de TGA.
- A todos os meus amigos e demais pessoas.
- Ao CNPq, CAPES e FAPITEC por todo o apoio e financiamento.
- A todos muito obrigada!!!

RESUMO

Resumo da Dissertação apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (M.S.c.)

MEMBRANAS DE ALGINATO DE SÓDIO E FIBROÍNA DE SEDA DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA: Preparação e Caracterização

Ammy Müller Souza Carvalho

Dezembro/2022

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Lesões provocadas por queimaduras preocupam os médicos devido ao processo infeccioso que ocorre no local. Assim, materiais eco-friendly para uso na área, vem sendo estudados como o alginato de sódio (ALG) e fibroína de seda (FS) que possibilitam a dopagem com nanopartículas de prata (AgNPs), acelerando o processo de cura da pele. Assim, o objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar membranas de ALG e FS dopados com AgNPs para tratamento de queimaduras, nas proporções ALG/FS 100:0, 90/10 e 75/25 sem AgNPs e com 2,5 e 5% (%v) de AgNPs. A morfologia das membranas produzidas mudou com o aumento da percentagem de FS e, também, com a adição de AgNPs. A estabilidade térmica das membranas não foi alterada significativamente com o aumento da percentagem de FS, mas há um ligeiro decréscimo da temperatura de degradação das membranas dopadas com AgNPs, como exemplo as membranas AS reduziram em torno de 31,25%, sugerindo um efeito catalítico das nanopartículas. Os valores de (TVA) e (PVA) encontrados estão na faixa de curativos comerciais tornando-as boas candidatas à curativos de pele e testes preliminares de inibição de crescimento bacteriano indicam resultados positivos para as membranas dopadas com AgNPs, principalmente na percentagem maior de AgNPs utilizada nesse trabalho.

Palavras-chave: Alginato de sódio, Fibroína de seda, Nanopartículas de prata, Queimaduras, Curativos.

ABSTRACT

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

SODIUM ALGINATE AND SILK FIBROIN MEMBRANES DOPED WITH SILVER

NANOPARTICLES: Preparation and characterization

Ammy Müller Souza Carvalho

December 2022

Advisor: Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Department: Materials Science and Engineering

Injuries caused by burns worry doctors due to the infectious process that occurs at the site. Thus, eco-friendly materials for use in the area have been studied, such as sodium alginate (ALG) and silk fibroin (FS) that allow doping with silver nanoparticles (AgNPs), accelerating the skin healing process. Thus, this work aimed to produce and characterize membranes of ALG and FS doped with AgNPs for the treatment of burns, in the proportions ALG/FS 100:0, 90/10 and 75/25 without AgNPs and with 2.5 and 5% (%v) of AgNPs. The morphology of the membranes produced changed with the increase in the percentage of FS and also with the addition of AgNPs. The thermal stability of the membranes was not significantly altered with the increase in the percentage of FS but there is a slight decrease in the degradation temperature of membranes doped with AgNPs, as an example AS membranes reduced around 31.25%, suggesting a catalytic effect of the nanoparticles. The values of (TVA) and (PVA) found are in the range of commercial dressings making them good candidates for skin dressings and preliminary bacterial growth inhibition tests indicate positive results for membranes doped with AgNPs, mainly in the higher percentage of AgNPs used in this work.

Keywords: Sodium alginate, Silk fibroin, Silver nanoparticles, Burns, Wound dressings.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo esquemático das camadas da epiderme. Fonte: Adaptado de Anatomia papel e caneta [23].	17
Figura 2: Corte histológico da pele exibindo as camadas da derme. Fonte: Yoshito (2011). [24].	18
Figura 3: Modelo esquemático dos estágios do processo de cura da pele. Fonte: Adaptado de Wasatch Photonics [29].	20
Figura 4: Tipos de queimadura de pele. Fonte: Adaptado de Phoenix Society for Burn Survivors. [31].	23
Figura 5: Representação da estrutura molecular do alginato de sódio. Fonte: Adaptado de Boraso e colaboradores (2015). [39].	27
Figura 6: Conformações α -hélice, também denominada de seda I (esquerda), e folha- β , também denominada de seda II (direita). Fonte: Bexiga (2014). [42].	29
Figura 7: Mecanismo de ação das nanopartículas de prata contra bactérias. Fonte: Adaptado de Kasithevar e colaboradores (2017). [58].	32
Figura 8: membranas de alginato de sódio (esquerda) e blenda 90/10 (direita). Fonte: Autor (2022).	44
Figura 9: A) Aspecto da suspensão de nanopartículas de prata obtida. A) Espectro UV-Vis da suspensão. Fonte: Autor (2022).	45
Figura 10: Imagens do MET das AgNPs em meio aquoso (acima) e gráfico histograma do diâmetro (nm) das AgNPs (abaixo). Fonte: Autor (2022).	47
Figura 11: Micrografias das membranas produzidas de alginato puro em diferentes magnificações. Fonte: Autor (2022).	48
Figura 12: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- ALG 2,5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	49
Figura 13: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 puro. Fonte: Autor (2022).	50
Figura 14: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 2,5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	51
Figura 15: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	52

Figura 16: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 75/25 puro. Fonte: Autor (2022).	53
Figura 17: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 75/25 2,5% AgNPs e d, e, f- 75/25 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	55
Figura 18: A) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG puro. B) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG 2,5% AgNPs. C) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	58
Figura 19: A) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 puro. B) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 2,5% AgNPs. C) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).	60
Figura 20: A) Gráfico TGA das membranas 75/25 puro e dopadas com 2,5 e 5% de AgNPs. B) Gráfico DTGA das membranas 75/25 puro e dopadas com 2,5 e 5% de AgNPs. Fonte: Autor (2022).	62
Figura 21: Teste de TVA e PVA para as membranas. Fonte: Autor.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes utilizados para cada proporção das membranas.	40
Tabela 2: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para a membrana de alginato pura e dopadas.....	56
Tabela 3: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para as membranas 90/10 pura e dopadas.....	58
Tabela 4: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para as membranas 75/25 pura e dopadas.....	61
Tabela 5: Resultado do ensaio de intumescimento das blendas.	63
Tabela 6: Resultados de transmissão e permeação de vapor d'água para as membranas.	66
Tabela 7: Resultados do teste de atividade microbiana para as membranas puras e dopadas estudadas.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	Pele	16
3.2	Lesões	19
3.3	Queimaduras	22
3.4	Curativos.....	24
3.5	Alginato de sódio.....	26
3.6	Fibroína de seda	28
3.7	Nanopartículas de prata	30
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Síntese das nanopartículas de prata.....	38
5.2	Preparação das soluções de alginato de sódio e fibroína de seda	38
5.2.1	Preparação da solução de alginato de sódio.....	38
5.2.2	Preparação da solução de fibroína de seda	38
5.3	Preparação das Membranas de Alginato e Fibroína da Seda	39
5.4	Estabilização das membranas.....	40
5.5	Caracterização das amostras	41
5.5.1	Espectrofotometria no UV-VIS	41
5.5.2	Microscopia eletrônica de transmissão – MET.....	41

5.5.3	Microscopia eletrônica de varredura – MEV	41
5.5.4	Termogravimetria (TGA)	42
5.5.5	Intumescimento.....	42
5.5.6	Transmissão (TVA) e permeação ao vapor de água (PVA).....	42
5.5.7	Teste <i>in vitro</i> com Bactérias	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
6.1	Aparência física das membranas.....	44
6.2	Caracterizações das nanopartículas de prata	44
6.3	Microscopia eletrônica de varredura – MEV.....	47
6.4	Termogravimetria (TGA)	55
6.5	Teste de intumescimento	62
6.6	Teste de transmissão de vapor de água (TVA) e de permeabilidade (PVA)	64
6.7	Avaliação da atividade microbiana	68
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
8	CONCLUSÕES.....	71

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão encontrado no nosso corpo, a qual atua como um escudo de proteção do organismo contra a entrada de microrganismos, tais como bactérias e fungos, contra a perda de água do sistema e contra agentes nocivos provenientes de fontes externas. Contudo, alguns fatores como cirurgias, acidentes e queimaduras podem acabar alterando a integridade da pele, ocasionando uma lesão nesta, ou seja, uma falha na estrutura que permite o acesso do ambiente externo ao ambiente fisiológico, e conseqüentemente levando à perda de suas funções locais. [1]–[3].

Em uma pele sadia, quando esta sofre algum tipo de injúria, esta passa por quatro processos durante a cicatrização: a hemóstase, a inflamatória, a proliferação, onde ocorre a angiogênese, e por fim, a remodelação. Caso haja alguma anomalia durante essa fase, pode acarretar na formação de uma ferida crônica, a qual pode levar mais de 3 meses no processo de cicatrização, ou de uma cicatrização excessiva com síntese descontrolada de colágeno, que acaba gerando um problema estético com a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloidianas, com aspecto elevado e endurecidas, de coloração que varia da cor rosa à vermelha amarronzada. [4]–[6].

Ainda, devido a fatores como determinadas doenças ou o próprio envelhecimento da pele, a comunicação entre as células da pele e as células responsáveis pelo processo de cicatrização se tornam mais lentas, o que pode acarretar na formação de uma ferida crônica devido ao processo inflamatório continuar ocorrendo, uma vez que as células não respondem corretamente, mantendo a ferida exposta à ação contínua das bactérias. Por esse motivo, para que haja uma boa cicatrização do local afetado, a ferida deve ser limpa manualmente, para que fique livre de uma possível infecção, e posteriormente seja aplicado um curativo sobre a lesão. [7], [8].

Dentre os tipos de lesões que podem acabar infligindo a pele, as lesões por queimadura vêm se mostrando um enorme problema na saúde pública e vêm preocupando médicos a muito tempo, uma vez que vários casos de morte são relatados por ano a pessoas que sofreram desse trauma, principalmente provocados por fontes térmicas, como por conta do contato com líquidos ferventes ou chamas. [9].

Esse tipo de lesão requer um tratamento imediato em razão da intensa infecção gerada no local, uma vez que pode acabar ocasionando uma infecção generalizada caso o tratamento

demore a ser ministrado ou não seja tratado adequadamente, fazendo com que o processo de cura se prolongue e a lesão acabe aumentando, podendo surgir uma lesão crônica no local. [9].

Apesar disso, até um determinado tamanho crítico, a pele lesionada consegue passar pelo processo de cicatrização sozinha, por este ser um órgão bastante vascularizado, possuindo a capacidade de se recuperar sem a necessidade de auxílio externo. Contudo, acima deste, a pele necessitará de assistência para restaurar suas funções e impedir o processo infeccioso, podendo ocorrer através da utilização de enxertos ou curativos. Mesmo sendo uma das melhores opções, o uso de autoenxertos só é possível quando uma pequena área do corpo é afetada, e é por isso que especialistas vem estudando curativos que possam auxiliar no processo de cicatrização da pele. [1], [10].

Dentre a vasta gama de curativos encontrados hoje em dia, existem dois tipos que se destacam devido ao seu uso mais corriqueiro: os curativos secos, como bandagens e gases, e formulações farmacêuticas tópicas, como pomadas antibacterianas, cremes cicatrizantes e soluções. Contudo, devido a diversos fatores, como uma vasta gama de lesões distintas, a necessidade de trocas constantes e uma baixa capacidade de revestir o ferimento, se tornou necessário a utilização de outros materiais para essa função. [11].

Biopolímeros naturais vem sendo bastante estudados para aplicações como curativos devido a estes apresentarem características apropriadas para esse fim, como biocompatibilidade com os tecidos, serem de fontes renováveis, proporcionar um ambiente úmido, aptidão para reparação dos tecidos lesionados estimulando a proliferação celular, além de possibilitar a inclusão de fármacos na matriz e a sua liberação controlada no local, aumentando sua eficácia e apresentarem a possibilidade de serem biodegradáveis tanto no meio fisiológico quanto no meio ambiente. [3], [12]–[14].

Além disso, biopolímeros provenientes de fontes naturais apresentam a vantagem de propiciar a cicatrização de feridas e de conseguir simular a matriz extracelular mais adequadamente. Dentre eles, o alginato de sódio e a fibroína da seda vem apresentando características promissoras para uso como curativos de pele. [3], [12]–[14].

O alginato de sódio é um polímero de cadeia linear extraído das paredes celulares de algas marinhas marrons. Ele é utilizado em aplicações na engenharia de tecidos por apresentar algumas características tais como: ser atóxico ao organismo, biodegradável, possuir uma boa

capacidade de absorção de exsudato¹, reduzir a infecção bacteriana no local da lesão e ser de baixo custo. O alginato de sódio é muito utilizado em associação com outros polímeros, como ácido hialurônico, colágeno e quitosana, uma vez que este apresenta algumas desvantagens ao utilizá-lo sozinho, como seus filmes apresentarem baixas propriedades mecânicas ou quando em contato com a água mostrarem ter uma rápida dissolução, características que são desvantajosas ao uso como curativos de pele. [3], [15]–[18].

A fibroína de seda é uma proteína polimérica produzida pelo bicho da seda em forma de fibras e é um dos mais atraentes materiais para uso na área de biomateriais, devido à suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradação lenta, alta resistência à tensão, possui uma flexibilidade ideal para algumas aplicações biomédicas, altamente estáveis termicamente, produz reação inflamatória mínima e de baixo custo. Como o alginato, também é utilizada em associação com outros polímeros, como quitosana, quitina e Poli (álcool vinílico) (PVA), proporcionando, dentre outros, melhorias em suas propriedades mecânicas. [2], [3], [15], [19].

Uma das formas de melhorar estes curativos é associando os mesmos com fármacos, em geral, antibióticos. No entanto, o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) vem se destacando no uso como eficiente agente bactericida por não apresentar o fenômeno da resistência que algumas bactérias apresentam em relação à antibióticos comuns. [20].

Na literatura, trabalhos abordando o tema ainda são escassos. Assim, esse trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de membranas de alginato de sódio e fibroína de seda em variadas proporções, dopadas com nanopartículas de prata visando o tratamento de lesões provocadas por queimaduras.

¹ Exsudato se refere a saída de líquidos orgânicos através das paredes e membranas celulares, tanto de animais quanto de plantas, por lesão ou por inflamação. No caso de exsudação sanguínea por ferimento há passagem de proteínas do plasma, leucócitos, plaquetas e hemácias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Produzir e caracterizar membranas de alginato de sódio e fibroína da seda dopadas com nanopartículas de prata com intenção que se possa ser aplicado no tratamento de queimaduras de pele.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor porcentagem de nanopartículas de prata entre 2,5 e 5% para as membranas nas proporções de alginato de sódio e fibroína da seda estudadas.
- Estabelecer as propriedades físico-químicas das membranas produzidas utilizando diversas técnicas.
- Realizar teste de viabilidade do material como curativo de pele: Testes bacteriostático.
- Comparar o desempenho do material produzido com os de outros materiais já estabelecidos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Pele

A pele, a qual é considerada como o maior órgão do corpo humano, compreendendo uma área medindo em torno de 1,5 a 2 m² em um jovem adulto possuindo estatura mediana, constitui, juntamente com as unhas, pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas, 16% do total de seu peso corporal. A pele é composta por apenas duas camadas: a epiderme e a derme. [21], [22].

A epiderme, a camada mais externa e que fica exposta a ações do ambiente, é formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado proveniente do ectoderma, uma camada que reveste o embrião durante o seu desenvolvimento. A epiderme pode variar nas diferentes regiões do corpo, como por exemplo, a região da pálpebra, apresentando características como pele macia, pelos e pele delicados, enquanto que na região das sobrancelhas os pelos se tornam mais grossos e a pele mais espessa. [21], [22].

Essa variação mantém-se em torno de 0,07 a 0,12 mm de espessura, denominada pele fina, contudo, existem locais como solas dos pés e as palmas das mãos em que ocorre um espessamento localizado, variando entre 0,8 a 1,4 mm de espessura, denominada pele grossa, podendo aumentar com uso mais frequente dessas regiões. [21], [22].

A epiderme é dividida em cinco zonas distintas morfológicamente, como mostra o esquema da Figura 1: A zona mais interna, o estrato basal, é responsável pela divisão celular (mitose) e distribuição destas para as outras áreas da epiderme; após vem o estrato espinhoso, responsável pela coesão das camadas da epiderme e resistência ao atrito. [21], [22].

O estrato granuloso vem a seguir e é encarregado de prolongar a vida das células superficiais a essa região, liberando grânulos revestidos por membranas no espaço extracelular, atuando como uma barreira impermeabilizante contra os fluidos ricos em nutrientes que aceleram sua morte; acima deste vem o estrato lúcido, presente apenas na pele grossa, onde suas células achatadas possuem filamentos de queratina paralelamente orientados à superfície da pele e de forma compacta; e por fim, estrato córneo, a zona superficial da pele, composta por várias células achatadas sem núcleos ou organelas, preenchidas por queratina dentro de uma matriz amorfa. [21], [22].

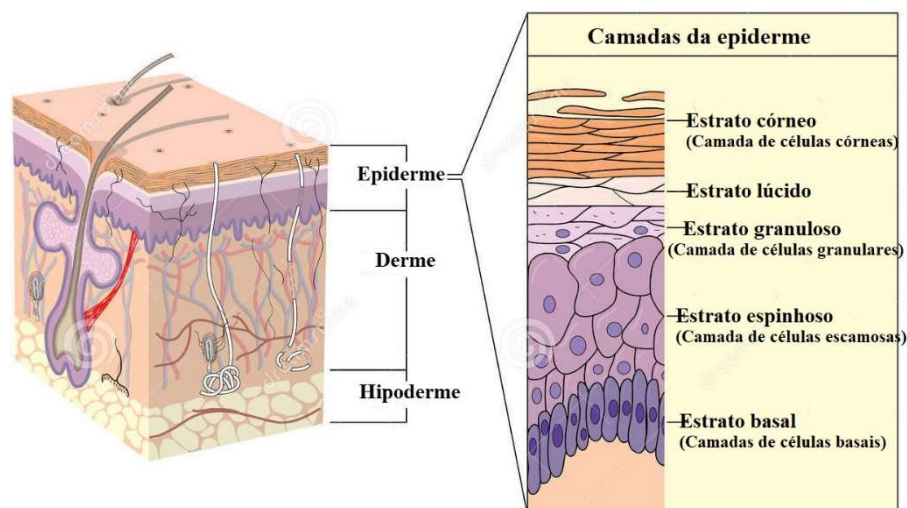


Figura 1: Modelo esquemático das camadas da epiderme. Fonte: Adaptado de Anatomia papel e caneta [23].

Devido às diferentes características referentes a cada camada que forma a epiderme, esta acaba por possuir inúmeras funções. Dentre elas, identificam-se: uma eficiente barreira contra a entrada de bactérias no organismo, uma boa barreira contra a perda de água e de calor do corpo para o meio externo e a uma boa capacidade de absorção de determinados produtos químicos, como os fármacos, através de suas camadas. [21].

Diferente de sua vizinha epiderme, a derme, camada localizada logo abaixo desta, é originária do mesoderma e é formada por um tecido conjuntivo não modelado e denso, o qual é constituído, em sua maioria, por várias redes de fibras elásticas (elastinas) e fibras de colágeno do tipo I (fibrilas), ambas sintetizadas pelos fibrócitos que compõem a derme. Essa rede de fibras elásticas e de colágeno formam uma estrutura de sustentação para a epiderme e liga a estrutura da pele à hipoderme. Também estão localizados na derme nervos e órgãos sensoriais, além de inúmeros vasos sanguíneos e linfáticos, os quais são responsáveis pela nutrição das células da epiderme. [21], [22].

A espessura da camada da derme é maior quando comparada com a da epiderme, variando entre 0,6 mm, em regiões de pele fina como as pálpebras, e 3 mm, em regiões de pele grossa como na sola dos pés e nas palmas das mãos. Normalmente essa camada é mais espessa em indivíduos masculinos do que em femininos e nas regiões dorsais preferivelmente do que nas ventrais. [22].

A derme é formada por duas camadas: a camada papilar e a camada reticular. Como podemos analisar pela Figura 2, a camada papilar está localizada mais à superfície da derme e

tem como função aumentar a área de contato entre a derme e a epiderme através de fibras de ancoragem constituídas de colágeno do tipo VII, o que resulta num aumento da resistência da pele. Essa camada também se encarrega de atividades como nutrição das células da epiderme e regulação da temperatura do corpo através de alças capilares, encontradas em toda a interface epiderme-derme. Já a camada reticular é responsável por proporcionar resistência e elasticidade à pele, devido a esta ser formada por uma rede de fibras grossas de colágeno do tipo I intimamente emaranhadas com fibras grossas elásticas, resultando nessa propriedade. [21], [22].



Figura 2: Corte histológico da pele exibindo as camadas da derme. Fonte: Yoshito (2011). [24].

Devido às características individuais de cada camada que forma a pele, o conjunto destas determina certas funções para este órgão, como regulação da temperatura do corpo, excreção pelas glândulas sudoríparas, percepção de sensações do meio ambiente como tato e paladar, absorção de raios ultravioletas provenientes do sol para sintetizar a vitamina D e, por fim, funciona como a primeira linha de defesa do organismo contra lesões, dessecação e invasão bacteriana. [22].

3.2 Lesões

Uma lesão é definida como uma ruptura da continuidade da pele e pode ocorrer através do ataque de patógenos, lesões mecânicas do tecido, exposição ao calor intenso e a determinadas substâncias químicas, podendo apresentar-se com tamanhos, formas e profundidades diversos. Quando um agente provocador inflige na pele algum tipo de ferimento, se inicia o processo inflamatório do local, passando pelas etapas de rubor, tumor, calor e dor. [21], [25].

Primeiramente, os vasos sanguíneos locais recebem mais sangue do que os não atingidos devido a mediadores bioquímicos da inflamação liberados no local, dentre elas a serotonina, a histamina e a bradicinina, que são responsáveis por dilatar os vasos e permitir um fluxo de sangue maior, ocasionando na vermelhidão da área. Esses mediadores químicos são produzidos por células localizadas próximas aos vasos, as quais foram impulsionadas a produzi-los devido a lesão que ocorreu no local. [21], [25], [26].

Algum tempo depois, o sangue coagula e isola o ferimento através dos fios de fibrina que ligam ambos os lados, permitindo, assim, que o plasma sanguíneo flua dos vasos sanguíneos para a área, ocorrendo o inchaço do local. Essa fase também é conhecida como hemóstase. [21], [25].

Na fase da inflamação, do plasma, neutrófilos e os monócitos surgem para fagocitar o tecido lesado, as impurezas e bactérias que conseguiram penetrar nesse tempo, até a chegada de outros leucócitos que usarão suas enzimas para ajudar a limpar o local. Nessa etapa, o líquido que se forma é denominado de exsudato. [25].

Terminado o processo de limpeza, fibroblastos são formados no local a partir de células mesenquimais, onde irão produzir os componentes que irão compor a matriz extracelular. Estas células são responsáveis por produzir no interior de seu corpo celular uma proteína polissacarídea, que será liberada na área, as quais irão se agrupar para formar fibras de colágeno. Nessa etapa, o colágeno tem a importante função de atuar como rede de sustentação e rigidez da cicatriz, onde seu desempenho irá depender do processo de hidroxilação da lisina e prolina, as quais durante a biossíntese do colágeno irão estabilizar a tripla hélice do colágeno, denominado procolágeno, e da oxigenação das células. [26], [27].

Nessa fase, os fibroblastos irão produzir e ao mesmo degradar o colágeno do local. Inicialmente a taxa de síntese será maior que a de degradação durante aproximadamente 4 semanas para depois começar a cair até se igualar com a taxa de degradação, dando início à fase

de maturação ou remodelamento do colágeno. A rede formada irá, aos poucos, unir as bordas da lesão, levando em torno de 14 dias. [25], [26].

Durante esse processo, é formado o tecido de granulação, composto por elementos como colágeno, fibroblastos e novos vasos sanguíneos formados durante o processo de angiogênese. Esse tecido é bastante delicado por apresentar muitos espaços vazios, além de possuir uma coloração avermelhada. [28].

Após o fechamento, inicia-se o processo de maturação do colágeno, onde ocorre um realinhamento das fibras desse colágeno, que tinham como características iniciais apresentarem uma orientação paralela à pele e ser de espessura fina, sendo agora dispostas ao longo das linhas de tensão e aumentando suas ligações cruzadas nas cadeias, aumentando sua resistência. O processo de maturação pode durar de meses a até anos, dependendo da gravidade da lesão inicial e dos fatores já mencionados. [26], [28].

Os fibroblastos então se diferenciam em miofibroblastos, que são responsáveis pelo fechamento da lesão e logo após sofrem apoptose, ou seja, a morte programada das células. Agora, as células epiteliais superficiais deslocam-se por baixo do coágulo e iniciam o processo de multiplicação, isolando superficialmente a cicatriz de tecido conjuntivo com tecido epitelial da pele. Todo o processo resumido está esquematizado na Figura 3. [25], [28].



Figura 3: Modelo esquemático dos estágios do processo de cura da pele. Fonte: Adaptado de Wasatch Photonics [29].

As lesões podem ser classificadas de acordo com a complexidade com que ocorrem (feridas simples e complexas) e quanto ao tempo de cicatrização (feridas agudas e crônicas). As feridas simples são aquelas que acometem o tecido de modo superficial e que não apresentam problemas durante seu processo de recuperação, passando pelos processos de hemóstase, inflamação, proliferação celular e remodelagem tecidual. [21], [25].

Já as feridas complexas, são aquelas que acometem o tecido de modo mais profundo e extenso, as quais acabam necessitando de determinados recursos para que os processos de recuperação da pele consigam ser efetivados, podendo representar uma ameaça ao membro em que está localizada e ao portador caso não seja tratada, uma vez que processos inflamatórios podem ocasionar febre e fraqueza ao paciente e sem o tratamento adequado, pode acabar evoluindo para uma ferida crônica. [21], [25].

A classificação quanto ao tempo tem relação com o intervalo de tempo em que essas lesões conseguirão se recuperar totalmente. As feridas agudas conseguem terminar o processo cicatricial em média em 15 dias, a depender de cada organismo. Contudo, quando esse processo acaba se estendendo por mais de alguns meses, significa que o processo inflamatório não consegue ser detido utilizando métodos convencionais devido ao seu formato e/ou localização, deixando a ferida exposta à ação contínua de bactérias. Nesse caso, a ferida aguda evolui para uma ferida crônica, podendo também representar uma ameaça ao paciente, caso um tratamento adequado não seja ministrado a tempo. [21], [25].

Esse retardo na evolução do processo de cura da pele pode ser provocado por diversas fatores, dentre eles aqueles que podem estar relacionados ao estado da lesão, como o grau de oxigenação que aquele local está recebendo para que processos como a angiogênese e proliferação de fibroblastos se desenvolvam de forma adequada, ou também associados ao grau de infecção que se instaura no local que, caso não seja tratada, podem acabar formando um biofilme bacteriano que acabam apresentando uma maior resistência ao tratamento utilizando antibióticos, levando ao aumento da gravidade da lesão. [30].

Outros fatores que também podem acabar dificultando a regeneração da pele seriam aqueles relacionados ao próprio indivíduo, como o fator idade, uma vez que indivíduos mais velhos acabam apresentando respostas do organismo um pouco mais lentas, o que acaba provocando alterações características nas fases da cicatrização; alimentação, visto que indivíduos que possuem uma alimentação mais saudável possuem mais nutrientes em seu corpo que impactarão positivamente na cicatrização; obesidade, a qual provoca diversas complicações durante a cicatrização, como a abertura de pontos provocado pelo aumento da tensão nas bordas da lesão, o que acaba provocando novo sangramento e uma possível nova infecção e possuir um menor fluxo de sangue e oxigênio no tecido adiposo subcutâneo; e por último, a diabetes, que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo e afeta a cicatrização de diversas formas, como a presença de substâncias pro-inflamatórias, que acabam sendo mais propensos à infecção e ao surgimento de uma infecção crônica sistêmica. [30].

Por esses motivos, ferimentos provocados por queimaduras vêm preocupando médicos a muito tempo, uma vez que, caso não seja tratado corretamente, o processo de cura pode se prolongar e a lesão aumentar, podendo evoluir para um ferimento crônico, devido ao processo bacteriano que ocorre junto com a inflamação.

3.3 Queimaduras

As queimaduras são falhas na continuidade da pele, que produzem uma quantidade grande de exsudato por ocasionar uma infecção bacteriana intensa, devido a exposição desta a diversas fontes, como: térmicas, como ao fogo, vapores ou líquidos quentes; radioativas, como micro-ondas, raios X ou luz ultravioleta; químicas, como exposição a ácidos ou bases fortes e fontes elétricas ou devido à passagem de uma corrente elétrica pelo corpo. [9].

Dentre estas, as mais frequentes e, dependendo da extensão atingida, pode inclusive levar o paciente à óbito caso não receba atendimento emergencial imediato, são as queimaduras por fontes térmicas. Dentre as medidas necessárias de atendimento, são realizados um atendimento pulmonar, caso a queimadura tenha atingido a região do tronco, restauração hídrica e uma medida de controle microbiano no local afetado.[9].

Essas lesões podem ser classificadas de duas maneiras: através da análise da profundidade do tecido afetado e através da porcentagem da área total atingida do tecido, também conhecida como TBSA (total body surface area – área total da superfície corporal). No primeiro modo, as lesões são diferenciadas em quatro graus de queimaduras: primeiro, segundo, terceiro e quarto grau, como foi ilustrado na Figura 4. [9], [10], [31].

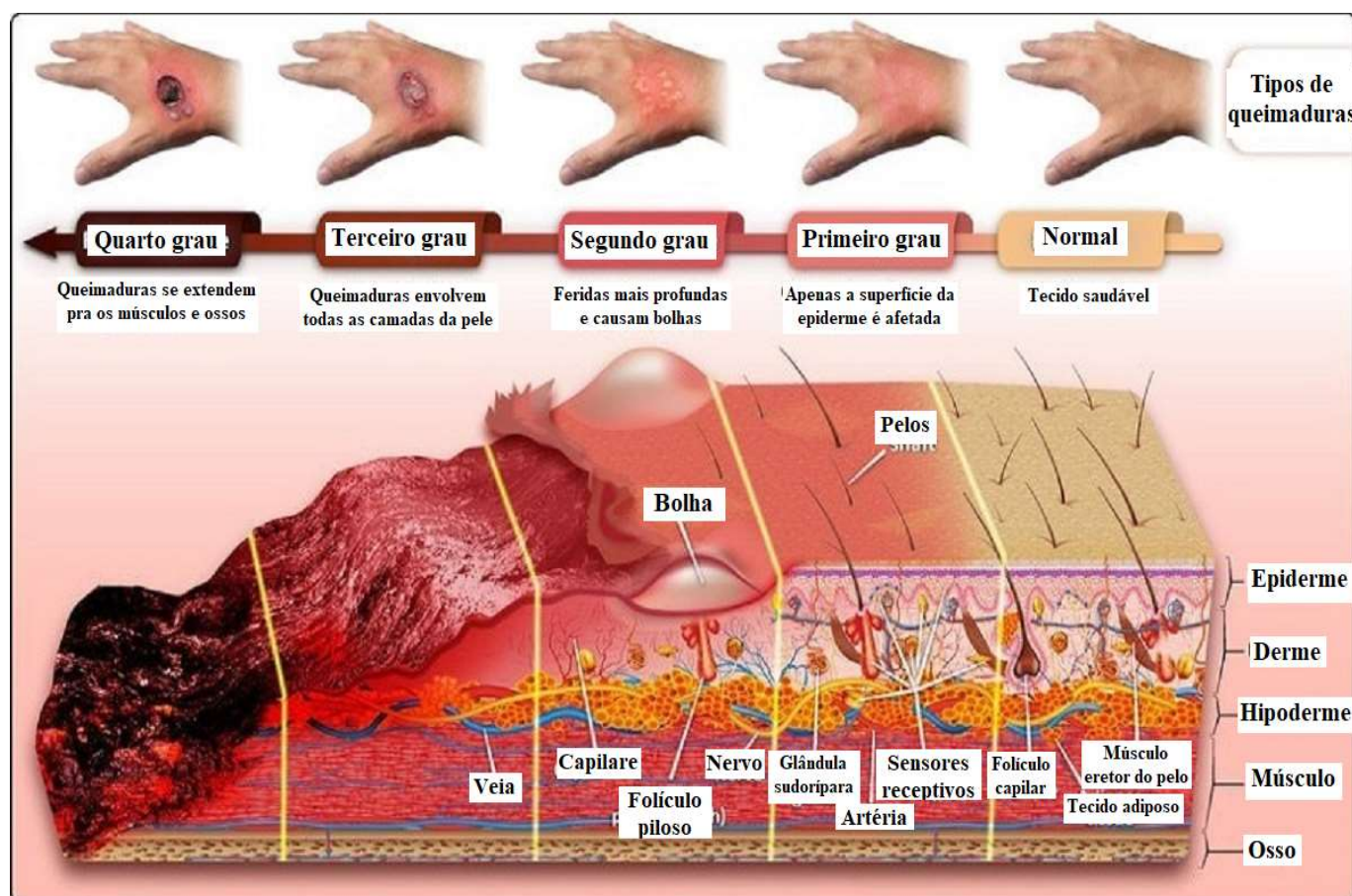


Figura 4: Tipos de queimadura de pele. Fonte: Adaptado de Phoenix Society for Burn Survivors. [31].

As queimaduras de primeiro grau são aquelas que atingem apenas a epiderme, ou seja, são danos causados apenas na superfície da pele, e apresentam características como dor, vermelhidão e secar no local. As queimaduras de segundo grau são aquelas que alcançam uma profundidade um pouco maior, atingindo, além da epiderme, a camada superior da derme (camada papilar), e as vezes a camada mais interna da derme (camada reticular), apresentando como características formação de bolhas na pele, uma coloração branca ou amarela do local e aspecto úmido. [9], [10].

As queimaduras de terceiro grau são aquelas que a extensão do dano causado acaba destruindo toda a epiderme e derme, atingindo a hipoderme, onde o local acaba apresentando uma aparência enrugada e rígida, semelhante ao couro, e que durante o processo de cicatrização desenvolve cicatrizes fibrosas. Por fim, as queimaduras de quarto grau são aquelas que além de atingir as camadas da pele, atingem também outros tecidos como músculos, tendões e até ossos,

apresentando uma coloração enegrecida. É o tipo mais grave de queimadura, o qual apresenta um tempo maior de tratamento e requer um processo de reabilitação posterior a longo prazo a fim de evitar cicatrizes que incapacitam o membro ou outro tipo de morbidade que possa acontecer. [9], [10].

No segundo modo de avaliar as lesões por queimaduras, permite-se comparar a gravidade do ferimento de uma criança em relação a um adulto, comparando a porcentagem da área afetada e avaliando se esse dado apresenta algum risco de mortalidade para o indivíduo. Porém esse modo de avaliação não é muito observado em pesquisas. [9].

Dependendo do tamanho da lesão e sua gravidade, a pele pode passar pelo processo de cicatrização sem precisar de auxílio externo, passando pelas etapas de hemóstase (onde o sangue coagula e isola o ferimento), inflamatória (onde os leucócitos fagocitam o tecido lesado e bactérias presentes, é uma fase crucial para que ocorra a cicatrização pois caso a infestação de bactérias não seja controlada, o processo inflamatório não cessará, passando para as demais fases), de proliferação (responsável por unir as bordas da lesão) e a última de remodelação (onde a cicatriz produz mais elastina e colágeno durante um ano ou mais). [9].

Assim, é de importância vital que as lesões sejam tratadas no início para que seu quadro não se agrave e possa garantir possibilidade de regeneração do tecido sem perdas de funções do órgão. Nesse contexto, utiliza-se habitualmente curativos com o propósito de auxiliar no processo de cicatrização das feridas, ao servir de barreira contra infecções bacterianas, manter a umidade e a oxigenação do local e auxiliar na regeneração dos tecidos da epiderme e derme. [21].

3.4 Curativos

A pele tem como função, dentre tantas, atuar como uma barreira protetora contra a entrada de bactérias e vírus e contra a exposição do organismo a ambientes nocivos. Contudo, ela pode facilmente perder sua integridade devido a ação de vários agentes externos, como queimaduras, ocasionando uma lesão no local. Como esta é bastante vascularizada, o defeito causado na pele pode se regenerar sem auxílio até um tamanho crítico. [1], [10], [12], [32].

Acima deste, para que o defeito passe pelo processo de cicatrização sem a formação de uma cicatriz grave que provoque dificuldade motora posterior e desfiguração estética, é necessário o uso de um curativo no local para auxiliar na regeneração e reparação dos tecidos que foram afetados. O curativo acaba atuando como uma barreira física, mas permeável, à

passagem de oxigênio e umidade e contra a entrada de microrganismos no sistema, além de eliminar aqueles que já se implantaram no local. [1], [10], [12], [32].

Para o tratamento de lesões por queimaduras, os métodos convencionais fazem uso de sulfadiazina de prata em creme, que é aplicada com o auxílio de algodão e gazes. Contudo, este método possui algumas desvantagens como necessitar de substituição no mínimo uma vez ao dia, chegando a mais de uma troca por dia dependendo do nível de exsudato produzido, aumentando a produção de lixo hospitalar. [33].

Também, durante as trocas, devido à aderência do material à pele, acaba provocando dores, além de possivelmente haver uma retirada de parte do tecido recém formado, provocando a reabertura do ferimento e um novo sangramento e, com isso, uma possível nova infecção. Há também a impossibilidade de molhar o local ao banhar-se e, em alguns casos, necessitar de uma pessoa especializada para realizar as trocas diárias. [33].

Observando tais pontos negativos, pesquisas na área começaram a ser desenvolvidas a fim de se obter melhores curativos que não necessitem de trocas regulares, ao possibilitar que o material que o compõe possa ser reabsorvido pelo organismo, auxiliando no processo de cicatrização, melhorando o conforto do paciente ao usá-lo, diminuindo a produção de resíduos hospitalares, o que pode provocar riscos tanto ao meio ambiente como para quem vive nas redondezas e possibilitando a aplicação e absorção de fármacos no local. [34].

O uso de curativos interativos, ou seja, aqueles que estimulam o processo de cicatrização de ferimentos devido a estes serem capazes de remover o tecido lesionado, manter uma umidade adequada no local (o que acaba minimizando a dor devido a umidade proteger as terminações nervosas que foram expostas e acelerar o processo de angiogênese), proteger o local da invasão bacteriana e prevenir a formação e o crescimento de biofilmes bacterianos, são mais vantajosos para serem utilizados para esse fim do que os convencionais. Alguns materiais que podem ser utilizados como curativos passivos incluem hidrogéis, filmes transparentes de poliuretano e alginato de sódio. [32], [35], [36].

Outra classe de curativos utilizados em queimaduras são os curativos bioativos, os quais são impregnados com substâncias ativas que agem rapidamente no local como agentes bactericidas ou antibióticos. Alguns componentes que podem ser utilizados para esse fim incluem a prata, o mel e o azul de metileno. [10], [32], [36], [37].

O tratamento de queimaduras costuma ser complicado de resolver devido à grande quantidade de exsudato produzido, o que, para alguns tipos de curativo, acaba apresentando um grau de dificuldade de fixação e de conseguir uma formabilidade adequada. No caso de lesões por queimaduras que apresentem uma gravidade maior, como de segundo grau em

diante, é necessário também que o curativo utilizado apresente uma estrutura que mimetize a estrutura observada na pele ou suporte e permita sua regeneração. [10], [32], [36], [37].

Com o passar do tempo, os curativos vêm adquirindo cada vez mais funções, com a finalidade de favorecer o máximo possível as condições locais necessárias para permitir a cicatrização da lesão sem que haja complicações decorrentes do processo, com o mínimo de cicatriz provocada e no menor tempo possível. [10], [32], [38].

Nos últimos anos, pesquisas nessa área utilizando biopolímeros de fontes naturais, renováveis e biodegradáveis vem ganhando força, e dentre os vários materiais utilizados estão o alginato de sódio, a fibroína de seda e as nanopartículas de prata, normalmente em associação com outros polímeros de fontes naturais ou sintéticas. Contudo, estudos onde o alginato de sódio está associado apenas à fibroína de seda, são mais escassos na literatura, incluindo os que incorporam as nanopartículas de prata na membrana. [10], [32], [38].

3.5 Alginato de sódio

O alginato é um polissacarídeo de cadeia linear que pode ser extraído através de fontes bacterianas, como as *Pseudomonas* e *Azotobacter*, uma rota economicamente ainda pouco viável para que possa ser usada comercialmente, e a partir de algas marinhas marrons, a rota mais usual de extração, e que são facilmente encontradas em regiões costeiras, como a *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborean* e *Ascophyllum nodosum*. [15], [16].

As algas são extraídas de seu habitat natural, pois o processo de cultivo dessas algas em cativeiro ainda é caro. O alginato é responsável por determinadas propriedades das algas, como flexibilidade e rigidez, além de assegurar que estas mantenham sua umidade quando expostas ao sol no período de maré baixa. [15], [16].

O alginato é composto por dois tipos diferentes de ácido: o primeiro é flexível e de cadeia linear, o β -D-manurônico e o segundo apresenta uma estrutura conformacional mais rígida, o α -L-gulurônico. Esses ácidos podem se encontrar ligados através de ligações covalentes ao longo da cadeia do alginato de forma alternada ou por meio de blocos, os quais podem estar agrupados em três grupos diferentes: blocos MM, blocos GG e blocos GM. [15], [16].

Os blocos MM, constituídos apenas por monômeros do ácido manurônico e que podem assumir uma conformação de hélice dupla, blocos GG, constituídos apenas por monômeros do ácido gulurônico e que podem assumir uma conformação de hélice tripla quando sais de sódio estão presentes no meio ou hélice dupla quando sais de cálcio estão presentes no meio, e blocos

GM, constituídos por monômeros alternados dos dois tipos de ácidos, como pode ser visualizado melhor através da estrutura do alginato representado na Figura 5. [15], [16].

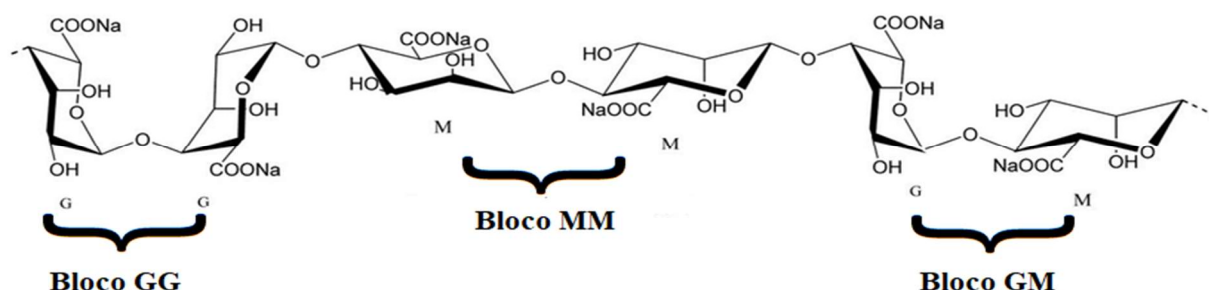


Figura 5: Representação da estrutura molecular do alginato de sódio. Fonte: Adaptado de Boraso e colaboradores (2015). [39].

A sequência de ligações dos monômeros, assim como a proporção de cada um desses ácidos na cadeia acaba gerando propriedades físicas diferentes para o alginato. Esses fatores podem variar devido à época do ano em que ocorre a extração, a espécie de alga utilizada, da idade das algas e do local onde ela se encontra.[15], [16].

O alginato vem sendo utilizado em aplicações biomédicas devido a este possuir excelentes propriedades para uso na área, como não toxicidade quando em contato com o meio fisiológico, biocompatibilidade com uma variedade de células, ser biodegradável, possui alto caráter hidrofílico para absorção de exsudato (diminuindo as trocas de curativos), capacidade ideal de transmissão de vapor, promover hemóstase (auxiliando na cicatrização de lesões), mantém o ambiente úmido, reduz o processo de infecção bacteriana no local, ser de baixo custo, conseguir formar membranas fortes devido a sua alta massa molecular e cadeia linear, e possuir a capacidade de formar gel. [3], [15]–[18].

Devido a essas características, esse material vem sendo utilizado como um biomaterial para as mais diversas aplicações na área de engenharia de tecidos, como na utilização como matriz de suporte para cultura de células, matriz de encapsulamento de proteínas e células vivas, reparação de cartilagem, como carreador de diversos agentes terapêuticos, como fármacos, células transplantadas e proteínas que irão auxiliar no processo de regeneração do tecido lesionado, devido a sua capacidade de gelificação e na produção de curativos. [2], [40].

Na área de reparação de tecidos, o alginato vem sendo muito utilizado como curativo por auxiliar no processo de cicatrização de feridas crônicas e de queimaduras, uma vez que esse material é capaz de fornecer um ambiente úmido necessário para estimular a formação do novo tecido e diminuição da dor no local, reduz o processo de infecção bacteriana, que também auxilia em uma recuperação mais rápida e promover a hemóstase, ou seja, a interrupção do sangramento. [16], [17].

Curativos de alginato já são vendidos comercialmente, contudo, quando composto apenas pelo alginato, este apresenta algumas desvantagens, como acabar provocando o ressecamento do local das lesões quando a quantidade de exsudato é reduzida durante o tratamento da lesão, por este ser altamente hidrofílico, e também, quando nesse estado, ser de difícil remoção e apresentar odor fétido. [41].

Como o alginato puro se dissolve facilmente em água ou quando o meio se encontra em condições alcalinas ou neutras, utilizá-lo em processos de tratamento de lesões onde o meio é aquoso seria impossível. Assim, este necessita passar por um tratamento anterior para contornar essa situação, como reticulá-lo com íons cálcio e assim obter uma cadeia mais rígida e com menos pontos reativos que possam se ligar com a água. [41].

3.6 Fibroína de seda

Um dos tipos de fibras naturais que existe em maior abundância, a fibroína de seda é produzida naturalmente por alguns artrópodes, dentre eles o escorpião, a pulga, a aranha e o bicho da seda, possuindo propriedades diferentes entre si por ocorrer uma mudança na sequência de aminoácidos entre suas cadeias. As sedas que são mais utilizadas pelos pesquisadores são as produzidas pelo bicho da seda e pelas aranhas, contudo, dentre eles as mais utilizadas são as do bicho da seda (*Bombyx mori*) devido à sua maior produção e dificuldade de criação das aranhas em ambientes confinados.[15].

A cadeia da fibroína da seda é composta pela sequência de aminoácidos alanina, serina, glicina e tirosina, Figura 6, que se estruturam de modo a formar uma estrutura semicristalina, onde a região cristalina é responsável pelas propriedades mecânicas de tensão das fibras e a região amorfa é responsável por suas propriedades físicas, como retenção de umidade. [15], [38].

Essa cadeia pode se enovelar sobre si mesma em três diferentes tipos de estrutura terciária: *folha- β* , também denominada de seda II, é a conformação que apresenta maior grau de estabilidade devido à ligação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, *α -hélice* e um

enovelamento que ocorre de forma aleatória, que também podem ser denominados de seda I, as quais são solúveis em água, o que, para determinadas aplicações, como na produção de curativos dérmicos, não é adequado. [15], [38].

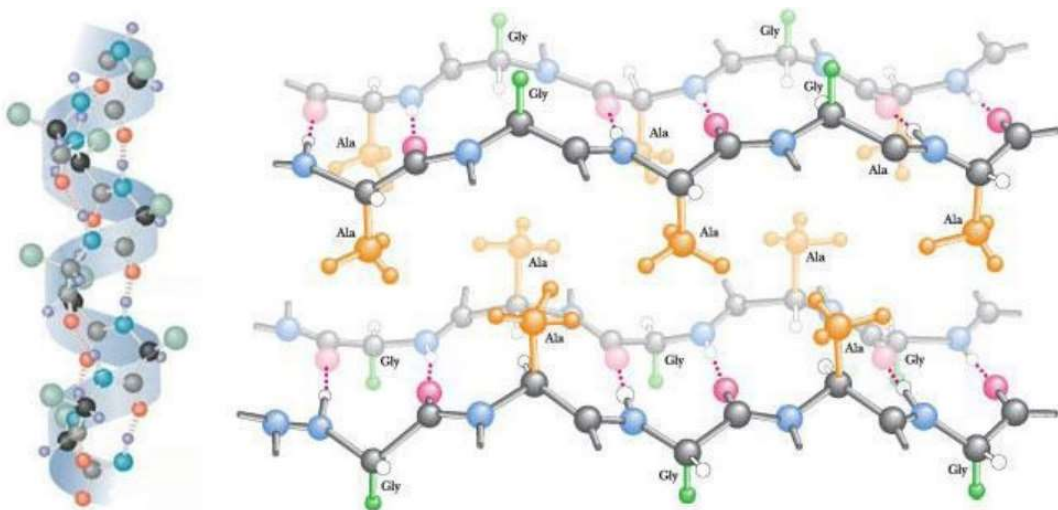


Figura 6: Conformações α -hélice, também denominada de seda I (esquerda), e folha- β , também denominada de seda II (direita). Fonte: Bexiga (2014). [42].

Para isso, alguns métodos são propostos para induzir a transformação de conformação da fibroína seda I para seda II, dentre eles, o uso de altas temperaturas, alguns solventes orgânicos ou ainda o uso de tensão de cisalhamento. Contudo, filmes feitos apenas com fibroína de seda que passaram por esse processo de mudança de conformação se tornam muito quebradiços quando estão no estado seco. Nesse caso, é necessária a utilização de um outro polímero em conjunto com a fibroína para superar esse problema, como o alginato de sódio.[38].

O uso da fibroína da seda para fins biomédicos data do século 19, uma vez que usavam esse material em suturas, mas sua relevância para essa área só foi estudada mais a fundo tempos depois. Hoje em dia, esse material é um dos mais atraentes e promissores na área de biomateriais, devido a suas propriedades, como biocompatibilidade adequada, permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio, boa estabilidade, apresenta compatibilidade com o sangue, se biodegrada lentamente, possui flexibilidade e elasticidade ideal para algumas aplicações biomédicas. [2], [3], [15], [43].

Além disso, possui alta resistência à tensão, altamente estáveis termicamente (começando apenas a se degradar quando atinge temperaturas acima de 150°C), promove o

processo de cicatrização de ferimentos ao auxiliar os fibroblastos e células epidérmicas a aderir, disseminar e proliferar na superfície do material, quando em contato com o corpo produz uma mínima reação inflamatória, apresenta resistência a microrganismos, permite a esterilização do material e possui um baixo custo de obtenção. [2], [3], [15], [43].

3.7 Nanopartículas de prata

Segundo a American Society of Testing and Materials (ASTM), nanopartículas são denominadas como partículas ultrafinas que possuem 2 ou 3 dimensões com comprimento que varia em torno de 1-100 nm. Essas partículas ultrafinas, as quais podem se encontrar em meio a uma suspensão aquosa, apresentam propriedades melhoradas ou até mesmo distintas de quando este mesmo material se encontra em uma escala macro. [44]–[46].

Essa mudança em suas propriedades se deve ao fato de o meio interagir de forma diferente com as partículas, devido estas apresentarem uma razão superfície/volume maior do que quando em escala macro, e isso induz a uma mudança de suas propriedades físicas, químicas ou eletrônicas em virtude da superfície apresentar um defeito de descontinuidade do material, ou seja, os átomos da superfície não apresentam todas as ligações necessárias para que permaneçam estáveis, o que faz com que a superfície apresente uma maior energia do que no bulk (interior do material). [44]–[46].

Além do tamanho, outros fatores podem provocar mudanças em suas propriedades, como o formato das partículas (como esféricas, prismáticas, dendríticas, bastões, etc.), o modo como elas estão distribuídas no meio, seu grau de cristalinidade ou a fase em que se encontra. Alguns métodos podem ser utilizados em conjunto para se determinar as características morfológicas das nanopartículas obtidas, como através da técnica de microscopia eletrônica, dentre elas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). [34], [45], [47].

Por meio destas técnicas, obtêm-se informações sobre como essas nanopartículas estão agregadas, seu tamanho médio e formato, e através de métodos espectroscópicos, dentre elas, a espectroscopia RAMAN e a espectrofotometria no UV-Vis, as quais fazem o uso de uma determinada característica própria das nanopartículas metálicas, a banda de ressonância plasmônica de superfície (BRPS). [34], [45], [47].

Segundo Mie (1908), esse fenômeno pode ser explicado devido a interação de uma onda eletromagnética polarizada com uma partícula condutora, como Ti, Fe, Au, Ag e Zn, onde os elétrons da camada de valência da partícula absorvem essa energia em uma dada frequência e

são excitados para a banda de condução, tornando-se elétrons livres que oscilam no sentido contrário ao da onda incidente. [48]–[51].

Esse movimento oscilatório de cargas constante acaba provocando o aparecimento de um dipolo induzido e de um campo elétrico, o qual é responsável por restaurar o equilíbrio provocado pela oscilação dos elétrons livres. A união desses dois fenômenos acaba resultando na formação da banda de ressonância plasmônica. [48]–[51].

Através da utilização dessas técnicas, além de se poder corroborar um forte indício da obtenção de uma suspensão de nanopartículas metálicas e da determinação de seus fatores morfológicos, elas também são importantes para, através desses resultados, dependendo da aplicabilidade das nanopartículas, avaliar o nível de toxicidade desses elementos à saúde e ao meio ambiente.[47].

Para as nanopartículas de prata, seu nível de toxicidade, quando utilizado em contato com células de animais e humanas, depende de alguns fatores, dentre eles a morfologia adquirida pelas partículas, a concentração presente na suspensão e seu tamanho. Relatos mostram que na antiguidade romanos e gregos utilizavam esse metal para tratamentos diversos, devido a este apresentar um bom desempenho na ação contra uma variedade de bactérias e na atuação como antibiótico. [36], [52], [53].

Hoje em dia, a prata voltou a estar em destaque nas pesquisas relacionadas ao tratamento de queimaduras, lesões e ferimentos que apresentem infecção bacteriana em maior ou menor grau devido à descoberta da resistência bacteriana à ação de alguns antibióticos e devido à evolução da ciência no ramo da nanotecnologia, a qual possibilitou a modificação das propriedades químicas, ópticas e físicas de um material através da modificação destes. [36], [52], [53].

Esse metal vem sendo mais utilizado na área de biomateriais de duas maneiras: como sais de prata em conjunto com compostos que quando em contato com os fluidos biológicos produz a prata iônica no local (Ag^+), e na forma de prata elementar, que pode ser representada pelas nanopartículas de prata e pela prata coloidal. [52].

As nanopartículas de prata (AgNPs) vêm sendo amplamente utilizadas para desenvolver uma nova geração de curativos bactericidas potentes, devido a estas terem provado ser resistentes a um amplo espectro de bactérias, dentre elas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), além de bactérias multirresistentes e hospitalares, as quais causam várias mortes por ano devido às infecções hospitalares. [10], [54]–[57].

Isso ocorre devido às AgNPs se ligarem às proteínas presentes na membrana bacteriana e se difundirem através desta, conseguindo se ligar às suas organelas e proteínas, culminando com a interrupção da função das organelas, ocasionando um bloqueio da respiração celular, mudando a morfologia da membrana e terminando na morte da bactéria. [10], [54]–[57].

Ademais, como durante o processo ocorre também a desnaturação do RNA e DNA bacteriano, acaba também interrompendo o processo de multiplicação destas, cessando o crescimento do biofilme. Devido ao processo de atuação das AgNPs, é mais difícil que as bactérias acabem desenvolvendo algum tipo de resistência a atuação dessas. A Figura 7 apresenta uma esquematização do processo que levaria à morte da bactéria através da ação nas nanopartículas de prata. [10], [54]–[57].

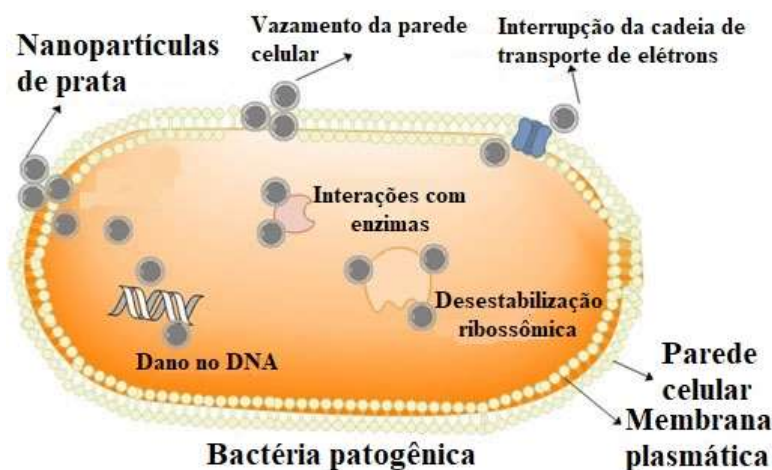


Figura 7: Mecanismo de ação das nanopartículas de prata contra bactérias. Fonte: Adaptado de Kasithevar e colaboradores (2017). [58].

Embora a prata venha sendo utilizada no tratamento de doenças inflamatórias a muitos anos, devido ao uso mais corriqueiro na atualidade das nanopartículas de prata em diversas áreas de consumo, como na área têxtil, embalagem de alimentos e produtos médicos, graças à descoberta de suas excelentes propriedades bacterianas, térmicas, ópticas e elétricas e estabilidade química, muitos pesquisadores vem estudando ao longo dos anos seu impacto quando em contato com a natureza, em relação aos resíduos contendo nanopartículas de prata, como seu impacto sobre a própria saúde humana.[47], [59]–[62].

Curativos utilizados no tratamento de ferimentos agudos e crônicos incorporados com nanopartículas de prata vem sendo objeto de estudo de alguns pesquisadores e, embora os testes

in vitro indiquem que a depender da concentração utilizada estas podem apresentar efeitos carcinogênicos, citotóxicos, inibem a proliferação celular e genotóxicas, muitos estudos in vivo contrariam esses resultados. [34], [47], [59]–[62].

Estudos in vivo mostram resultados promissores como uma rápida cicatrização de feridas acometidas com infecção bacteriana, proporciona uma melhor adesão do material ao local da lesão e combate a atividade inflamatória no local, impedindo que a lesão acabe apresentando um agravamento do seu estado inicial. Segundo a NORMA ASTM E-2180 [63], a quantidade adequada de AgNPs para o organismo humano sem que ocasione perigo de que ocorra intoxicação seria de 120 µg. [34], [47], [59]–[62].

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após sofrer um trauma por queimadura, para que a pele repare essa lesão e retome sua integridade física, é de fundamental importância que esta passe por um bom processo de cicatrização. Uma vez não curada corretamente, o ferimento pode evoluir para uma ferida crônica, a qual não responde corretamente aos tratamentos convencionais, o que acaba por prejudicar a mobilidade do indivíduo, ou formar um quelóide ou uma cicatriz hipertrófica, devido ao crescimento excessivo de tecido cicatricial no local. [4].

Devido aos diversos problemas e sofrimento causados à pessoa que foi afetada e aos custos relacionados a isso, diversas pesquisas vêm sendo realizadas ao redor do mundo a fim de aprimorar os curativos utilizados atualmente, reduzindo o tempo de cicatrização da pele, as trocas diárias ou ainda reduzindo o impacto ambiental causado pelo acúmulo de curativos jogados no meio ambiente ao longo do tempo.

Nos últimos anos, pesquisas nessa área utilizando biopolímeros de fontes naturais, renováveis e biodegradáveis vem ganhando força, e dentre os vários materiais utilizados estão o alginato de sódio, a fibroína de seda e as nanopartículas de prata, normalmente em associação com outros polímeros de fontes naturais ou sintéticas. Contudo, estudos onde o alginato de sódio está associado apenas à fibroína de seda, são mais escassos na literatura, incluindo os que incorporam as nanopartículas de prata na membrana. [10], [32], [38].

Alguns pesquisadores enfatizam as propriedades desses materiais para uso como curativos para lesões de queimaduras na forma de membranas. Kolev, Vassileva e Georgiev (2017) relataram que o alginato de sódio é muito utilizado no tratamento de queimaduras devido ao seu caráter homeostático e que este apresenta uma efetividade maior quando na forma de um material poroso do que em gel. Além também de possuir a capacidade de liberação controlada de fármacos, síntese de nanopartículas e remoção de resíduos, como os materiais estudados por Rahimi e colaboradores (2019) e Kaygusuz e colaboradores (2017). [64]–[66].

Vários pesquisadores vêm unindo essas propriedades ideais do alginato de sódio para curativos que auxiliem no processo de recuperações de lesões com as de outros polímeros naturais, o que vem apresentando bons resultados, como os obtidos por Yang e colaboradores (2019). No trabalho desses pesquisadores, estes produziram arcabouços de alginato de sódio, fibroína da seda e ácido hialurônico que, ao ser usado em queimaduras de terceiro grau em ratos, promoveram uma melhor reconstrução da pele, ao proporcionar uma maior deposição de colágeno no local, além de favorecer um processo de cicatrização mais rápido ao dar suporte à adesão e proliferação de células de fibroblastos. [1].

Em relação à fibroína de seda, como bem sabemos, seu uso na área médica já é relatado a muito tempo, contudo, suas propriedades foram sendo melhor estudadas e descobertas tempos depois. Hoje em dia, esse material é um dos mais atraentes e promissores na área de biomateriais para uso em diversas aplicações, como na construção de arcabouços de nanocompósito de fibroína de seda/quitina/nanopartículas de prata que foram utilizados no estudo de Mehrabani e colaboradores (2018) devido a fibroína em associação com a quitina acabar proporcionando uma estrutura de elevada porosidade, elevada propriedade antimicrobiana e propriedades mecânicas compatíveis com o uso. [19].

A fibroína também vem sendo muito utilizada na área de curativos associada com outros polímeros a fim de melhorar as propriedades de um determinado material que apresenta alguma limitação para uso como curativo, como os hidrogéis à base de alginato estudados por Ghalei e colaboradores (2018). Os pesquisadores verificaram que mesmo possuindo propriedades visadas para uso biomédico, como possibilitar o transporte de diversos agentes, como fármacos, proteínas e aminoácidos, devido à sua estrutura de gel formar uma trama de cadeias interpenetrantes, esta não permite adesão celular e possui propriedades mecânicas baixas. A fibroína foi então adicionada ao hidrogel por este conjunto apresentar semelhança com as estruturas do tecido humano, além de melhorar as propriedades mecânicas e interações células-matriz do hidrogel. [2].

Gu e colaboradores (2013) também precisaram combinar fibroína de seda com quitosana devido às membranas deste material puro apresentarem baixas propriedades mecânicas, graças a estrutura semicristalina, tornando-os frágeis. A quitosana utilizada também precisou passar por um processo de reticulação com alginato dialdeído (ADA), a fim de aumentar a durabilidade do filme e sua estabilidade. A membrana obtida poderia assim atender aos requisitos para atuar como um curativo para auxiliar na recuperação da pele. [12].

Assim, devido ao alginato de sódio e a fibroína de seda apresentarem tais características promissoras para uso como curativos, como foi apresentado em vários estudos, alguns pesquisadores estão voltando seus olhos para a busca por materiais ecologicamente corretos (eco-friendly) para substituir os atuais que são utilizados de origem sintética. [67].

Algumas pesquisas foram iniciadas na área utilizando os dois polímeros, como no trabalho de Moraes e colaboradores (2013), onde estes produziram blendas de alginato de sódio com fibroína de seda e comprovaram que essa membrana possuía propriedades adequadas para um curativo de alto desempenho no tratamento de queimaduras, como boa capacidade de intumescimento, flexibilidade e capacidade de troca de vapor pela membrana. [67].

Além disso, no ano seguinte, Moraes e colaboradores (2014) estudaram como os dois elementos interagiam entre si na blenda e perceberam que, dependendo da porcentagem de cada um na membrana, como os dois polímeros eram semimiscíveis entre si, quando a solução de alginato de sódio era produzida com água destilada acabava ocasionando uma separação de fase macroscópica, com formação de fibrilas de FS, podendo ser observada num microscópio óptico. [38], [68].

Esse fato também foi observado por Lopes e colaboradores (2018) [68], mas quando a solução era produzida com uma solução de NaOH 0,1M, ocorria uma separação de fase microscópica, com formação de FS globulares, onde poderia ser estudada a possibilidade de utilizar como carreador de fármacos ou nanopartículas. [38], [68].

Interações entre sistemas de proteínas como a FS e polissacarídeos como o ALG são complexas e essa separação de fases entre esses materiais podem ser explicadas devido ambos os polímeros serem carregados negativamente, ocasionando uma repulsão eletrostática. Quando esses polímeros estão em solução aquosa, na separação de fases a fibroína assume uma forma de fibrila, ou seja, aumenta as interações entre FS-FS, predominando a estrutura de Silk II, sendo mais estável e com menos sítios ativos para interação. Quando estes estão em solução alcalina com o NaOH, ainda ocorre repulsão entre as cadeias mas diminuem as interações entre FS-FS, predominando a estrutura de Silk I, sendo menos estável e com mais sítios ativos para interação. [38], [68].

As nanopartículas de prata são amplamente utilizadas na área de curativos devido à sua atividade bactericida e bacteriostática, uma vez que estas conseguem atuar até contra as bactérias e fungos mais resistentes, diferente de alguns fármacos, o que acaba acelerando o processo de cura do local da lesão. [69].

Khatami e colaboradores (2018) estudaram bandagens de algodão impregnadas com nanopartículas de prata e óxido de zinco sintetizadas através do café e da *Prosopis fratta*, uma planta nativa da região. As bandagens de algodão foram impregnadas com uma suspensão líquida contendo essas nanopartículas, onde foram divididas em três grupos: um contendo apenas Ag, outro contendo apenas ZnO e o terceiro contendo uma mistura de Ag/ZnO, e tiveram suas propriedades antimicrobianas estudadas in vitro, obtendo resultados melhores para as bandagens com solução de nanopartículas de prata. Os pesquisadores concluíram que há um potencial enorme na utilização dessas bandagens no tratamento de feridas que são sensíveis a infecções, devido à ação antimicrobiana da prata, como feridas causadas por diabetes ou queimaduras. [69].

Além disso, alguns estudos, como no de Mohseni e colaboradores (2019), mostram que as AgNPs auxiliam na re-epitelização, no fechamento de ferimentos e na deposição de colágeno no local devido ao aumento na porção de átomos na superfície e por motivo de estas possuírem uma elevada área superficial. Ainda, quando comparada com a sulfadiazina de prata (SP), as nanopartículas de prata apresentaram uma maior biocompatibilidade com as células de fibroblastos, o que acelerou o processo de angiogênese, re-epitelização e remodelação do tecido, cicatrizando mais rápido a lesão total infligida nos ratos do estudo. [36], [54], [56], [57].

Contudo, a taxa de adição de nanopartículas de prata no sistema deve ser estudada com cautela, uma vez que esta pode ser tóxica para as células, como os fibroblastos, o que acaba diminuindo a viabilidade celular no local e a biocompatibilidade do material, necessitando encontrar um equilíbrio entre as duas partes. [36], [54], [56], [57].

Na engenharia tecidual, a prata vem sendo incorporada em diversos meios, como hidrogéis [55], curativos [54], [57] e arcabouços [19], [56]. No trabalho de Nešović e colaboradores (2019), eles conseguiram fazer um hidrogel onde este liberaria uma quantidade grande de nanopartículas de prata num primeiro momento, com a intenção de prevenir infecções bacterianas iniciais, e depois essa liberação iria acontecer de maneira mais lenta, a fim de manter o local da lesão estéril por um período maior, favorecendo o processo de recuperação do local. [55], [56].

Outro exemplo de aplicação pode ser visto no trabalho de Balakrishnan e Thambusamy (2019), onde estes observaram em seu estudo que a adição de AgNPs e riboflavina aos arcabouços de PVA / β -CD influenciam em sua taxa de degradação, além de proteger os arcabouços da penetração de água. [55], [56].

Diante de todas as características apresentados sobre os materiais que serão utilizados e das lacunas deixadas pelas poucas pesquisas voltadas para o estudo destes em conjunto, foi construído um projeto de pesquisa de curativos no formato de membranas utilizando alginato de sódio e fibroína de seda dopadas com nanopartículas de prata.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Síntese das nanopartículas de prata

Inicialmente, todas as vidrarias foram descontaminadas com água régia, pois contaminantes podem ocasionar a aglomeração das nanopartículas, já que atuam como sítios de nucleação durante a síntese, ocasionando um aumento do diâmetro da partícula, podendo sair da faixa de Mie, o qual indica que nanopartículas metálicas apresentam uma banda de ressonância plasmon na faixa de 380-420 nm. [34], [44].

A síntese das nanopartículas de prata foi feita pelo método de redução do nitrato de prata através do ácido ascórbico ($6,0 \times 10^{-4}$ M), utilizando-se o citrato de sódio ($3,0 \times 10^{-3}$ M) como estabilizador. Tipicamente, 8,0 mL de solução aquosa de ácido ascórbico e citrato de sódio foi ajustada para pH 10,5 com NaOH 0,1 M. Em seguida, a essa solução, foi adicionado 0,08 mL de AgNO_3 0,1 M e o meio reacional foi posto em banho-maria a 30°C em agitação de 900 rpm por 15 min. Nesse tempo, ocorreu a alteração da cor da solução de incolor para amarelo e depois marrom amarelado. [70].

5.2 Preparação das soluções de alginato de sódio e fibroína de seda

5.2.1 Preparação da solução de alginato de sódio

A solução de alginato de sódio (ALG) foi preparada dissolvendo-se uma massa de ALG em um volume de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, para se obter uma concentração de ALG de 2% m/v. A massa de alginato foi adicionada ao volume apropriado da solução de NaOH, sendo dissolvida ao máximo utilizando um bastão de vidro, obtendo-se um gel transparente, mas não homogêneo e, após a adição, foi deixado em repouso por dois dias para a completa hidratação do alginato. Após este tempo, a solução foi agitada em agitador magnético da Kasvi por 40 minutos para garantir a completa homogeneização da solução.

5.2.2 Preparação da solução de fibroína de seda

Inicialmente preparou-se uma solução ternária 1:2:8 molar de cloreto de cálcio, etanol e água destilada, a fim de solubilizar a fibroína na forma de pó. Para isso, 68g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

foram dissolvidos em 66,7 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 54 mL de etanol à solução e 100 mL da solução resultante foi transferida para um sistema previamente montado (figura 2), onde foi aquecida e estabilizada a 85°C, iniciando-se a agitação. A fibroína de seda foi pesada para se obter uma concentração de 5% m/v em relação à solução ternária, e começou a ser adicionada pausadamente, ficando com um tempo máximo em aquecimento, a partir do momento de adição inicial, de 1h30min, para evitar a degradação desta.

A solução foi filtrada à vácuo, para remoção de impurezas e fibroína não dissolvida no processo, e em seguida dialisada, com a finalidade de remoção do cálcio presente na solução, uma vez que quando em contato com a solução de alginato de sódio inicia o processo de reticulação instantânea. A troca da água destilada ocorreu a cada 24h durante um período de 3 dias e a solução foi armazenada na geladeira, a fim de retardar o processo de gelificação. Após a diálise, foi determinada a concentração da solução final de fibroína de seda por gravimetria, ou seja, pesa-se um certo volume da solução dialisada final e evapora-se o solvente, em seguida pesa-se o pó restante e determina-se a percentagem m/v da solução de FS. Fora obtido uma solução de concentração 1% m/v de FS.

5.3 Preparação das Membranas de Alginato e Fibroína da Seda

As membranas de ALG/FS foram preparadas nas proporções em massa de 100:0, 90:10 e 75:25 de acordo com o trabalho de Moraes *et al.* (2014). [38]. Além disso, a todas essas proporções, foram feitas também membranas com 2,5% e 5% de AgNPs, todas em três preparações independentes.

Para as membranas sem AgNPs, volumes apropriados de soluções de ALG para preparar as membranas (vide Tabela 1) foram colocadas em um béquer e, em seguida, foi adicionado 0,4 mL de glicerina que atua como plastificante nas membranas. Em seguida, a mistura foi agitada em agitador magnético a 60 rpm durante 10 minutos. Ainda em agitação e depois de homogeneizada a glicerina, um determinado volume de FS foi adicionado, onde a mistura foi agitada em agitador magnético a 60 rpm durante 15 minutos. Após a agitação, a solução foi vertida em uma placa de Petri de poliestireno de 90 x 15 mm, coberta com filme plástico perfurado e posto em estufa a 33°C de 5 a 7 dias.

Para as membranas contendo AgNPs, o procedimento foi o mesmo acrescentando uma outra etapa de adição das nanopartículas à solução dos biopolímeros e agitando por mais 20 min a 30 rpm antes de verter a solução na placa de Petri.

Tabela 1: Volumes utilizados para cada proporção das membranas.

SA/SF	Volume SA	Volume fibroína	Volume AgNPs
100:0	25 mL	0 mL	0 mL
100:0 + 2,5% AgNps	25 mL	0 mL	0,625 mL
100:0 + 5% AgNps	25 mL	0 mL	1,25 mL
90:10	22,5 mL	5 mL	0 mL
90:10 + 2,5% AgNps	22,5 mL	5 mL	0,6875 mL
90:10 + 5% AgNps	22,5 mL	5 mL	1,375 mL
75:25	18,75mL	12,5 mL	0 mL
75:25 + 2,5% AgNps	18,75mL	12,5 mL	0,7812 mL
75:25 + 5% AgNps	18,75mL	12,5 mL	1,5625 mL

Fonte: Autor (2022).

5.4 Estabilização das membranas

Como tanto o alginato de sódio como a fibroína de seda são materiais solúveis quando em contato com a água e o meio ao qual as membranas estarão em contato, a pele, é rica em água e o processo de cicatrização da pele também depende muito da presença dessa substância, foi necessário utilizar uma solução que fosse capaz de estabilizar os grupos funcionais do SA e SF e deixá-las menos solúveis quando em contato com a água. Nesse caso, foi utilizada a solução adaptada de Paiva (2009) por De Moraes (2014), que consiste em uma solução de H_2SO_4 0,1 M em etanol 50%, ou seja, foi produzida uma solução de etanol 50% em água e depois calculado o volume que seria necessário ser pipetado do ácido sulfúrico concentrado para que ao ser adicionado à solução de etanol 50%, este tivesse a concentração desejada de 0,1 M. [38], [71].

Após a evaporação dos solventes na estufa, as membranas se encontravam aderidas ao fundo das placas de petri, sendo soltas com o auxílio de uma espátula. Então em cada placa foram pipetados 20 mL da solução estabilizadora, volume suficiente para cobrir bem as membranas, onde foram deixadas submersas por 24h, depois lavadas com água destilada e deixadas submersas em 20 mL de água destilada por mais 24h para comprovação da estabilização das membranas.

5.5 Caracterização das amostras

5.5.1 Espectrofotometria no UV-VIS

Os espectros de absorção na região do UV-VIS da amostra de nanopartículas de prata produzidas foram medidos utilizando cubetas de quartzo no espectrofotômetro da Perkin Elmer modelo Lambda 45. Foi realizada uma varredura na região de 300-600 nm em temperatura ambiente.

5.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão – MET

A análise das nanopartículas no MET foi obtida através de um microscópio JEOL modelo 2100 operado em uma voltagem de 200 kV, através do gotejamento das nanopartículas em suspensão em uma tela de cobre recoberta por formva e uma camada de carbono, e posto na estufa a 50°C para evaporação do solvente.

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

A morfologia da superfície das membranas foi estudada utilizando um microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM 6390LV/LGS com uma tensão de aceleração de 10-20 kV, onde as membranas foram previamente metalizadas uma vez que polímeros não são condutores.

5.5.4 Termogravimetria (TGA)

A análise térmica dos polímeros na blenda foi avaliada através do equipamento Shimadzu, Modelo: TGA-50, em uma faixa de temperatura de 25-500°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e utilizando uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

5.5.5 Intumescimento

O grau de intumescimento (GI) foi determinado gravimetricamente onde amostras de 2,5 cm de diâmetro das membranas foram pesadas secas (**w_i**) e em seguida foram imersas em 100 mL de água destilada e pesadas nos tempos de 15, 30 e 60 minutos (**w_f**). O intumescimento (%) foi calculado através da Equação 1.

$$GI = \frac{w_f - w_i}{w_i} \times 100 \quad (1)$$

5.5.6 Transmissão (TVA) e permeação ao vapor de água (PVA)

A transmissão e permeabilidade ao vapor de água (TVA) e (PVA) foram determinadas de acordo com ASTM E 96M (2005), onde as amostras foram presas em um recipiente com área de permeação de 12,85 cm² contendo o dessecante cloreto de cálcio anidro em um dessecador contendo solução aquosa saturada de NaCl, a 75% de umidade relativa. As amostras foram pesadas a cada 24 h, durante 5 dias. A TVA foi determinada através da Equação 2 e PVA através da Equação 3, sendo: **Δm** a variação da massa em gramas, **Δt** o tempo em dias, **A** área de teste, em m²; **S** a pressão de saturação do vapor d'água (Pa) e **R1-R2** a diferença de umidade relativa, em %.

$$TVA = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A} \quad (2)$$

$$PVA = \frac{TVA}{S \cdot (R1 - R2)} \quad (3)$$

5.5.7 Teste *in vitro* com Bactérias

Foram ainda realizados testes da atividade microbiana através do método de Santos et al. (2022) modificado. Culturas Overnight ($35^{\circ}\text{C} \pm 2$) em 5 mL de caldo Brian Heart Infusion (BHI) foram ajustados para padrão 0,5 de Mac Farland, 100 μL foram inoculados em placas de Petri contendo 4 mm Ágar Muller-Hinton (pH 7,2-7,4) previamente solidificado e semeado usando alça de Drigalsky, onde discos das membranas com 1 cm^2 (controle negativo) foram postos sobre a superfície do meio contendo os microrganismos. O controle positivo foi utilizado o antimicrobiano gentamicina 10 $\mu\text{g/mL}$ - 120 $\mu\text{g/mL}$ com atividade conhecida para cepas padrão ATCC. A atividade antimicrobiana será avaliada pela mensuração dos halos de inibição, em milímetros.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Aparência física das membranas

As soluções de alginato puro e das blendas produzidas neste trabalho possuíam um aspecto transparente apenas ficando ligeiramente amarelado com a adição das nanopartículas de prata, intensificando a coloração com o aumento da concentração de nanopartículas. Após a secagem das soluções e produção das membranas, desde as de alginato puro até as blendas e dopadas com nanopartículas, estas apresentaram uma aparência que variou do transparente até um levemente leitoso amarelado com o aumento da fibroína e das nanopartículas, além de possuírem um aspecto liso, uniforme e serem bastante flexíveis, como mostra a Figura 8 a seguir.



Figura 8: membranas de alginato de sódio (esquerda) e blenda 90/10 (direita).

Fonte: Autor (2022).

6.2 Caracterizações das nanopartículas de prata

Ao produzir uma suspensão de nanopartículas de prata, esta apresenta uma cor característica que é decorrente do tamanho das partículas que foram formadas durante o procedimento. Esta cor pode variar desde o amarelo que indicam partículas na escala nanométrica até chegar na cor prata na escala macroscópica quando há aglomeração dessas partículas. Obviamente que suspensões na cor amarela são as desejáveis já que indicam

partículas de prata em tamanhos nanométricos menores. A suspensão de nanopartículas de prata produzidas nesse trabalho, possuía uma coloração amarela amarronzada (vide Figura 9), o que poderia indicar um possível grau de aglomeração das nanopartículas. [72].

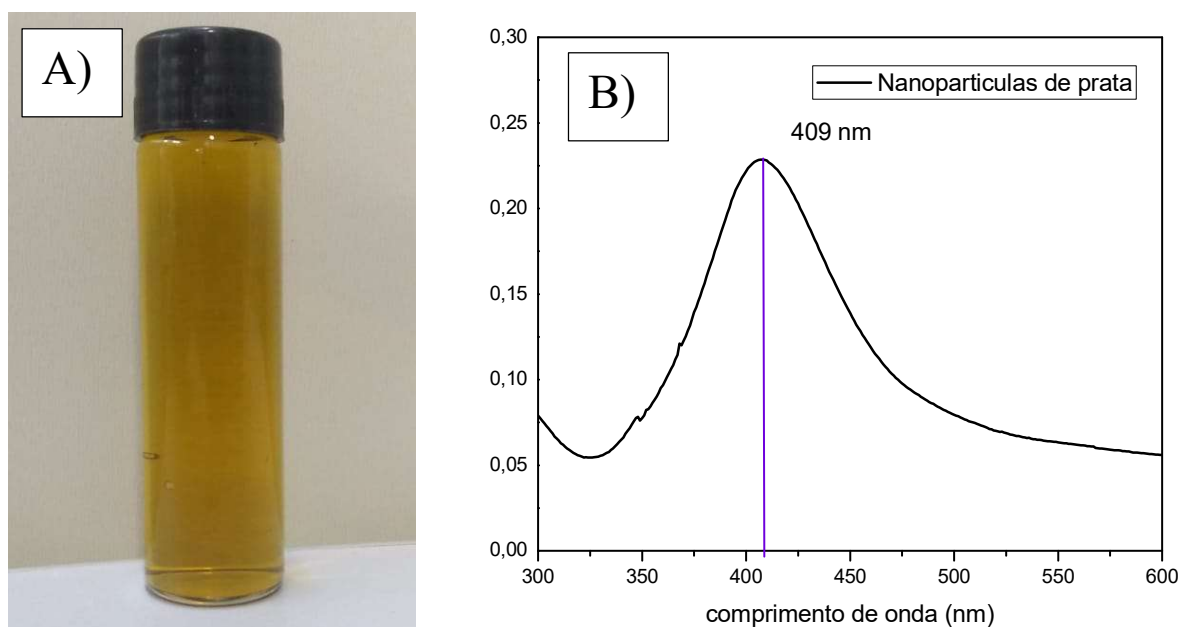


Figura 9: A) Aspecto da suspensão de nanopartículas de prata obtida. B) Espectro UV-Vis da suspensão. Fonte: Autor (2022).

Para se obter mais informações acerca dessa solução, foi feito o espectro UV-Vis da suspensão de nanopartículas obtida. Sendo assim, a suspensão foi diluída para que o máximo de absorção não ultrapassasse a faixa de linearidade da Lei de Beer-Lambert e o espectro obtido é apresentado na Figura 9 B). Observa-se um espectro de banda única e relativamente larga, com máximo de absorção em torno de 409 nm. Esta largura de banda sugere uma distribuição de tamanhos de partículas maior.

Conforme a teoria de Mie, que diz que nanopartículas que apresentam uma forte e única banda com máximo de absorção plasmônica na faixa de 380 a 420 nm, são esperados quando estas possuem diâmetros menores do que 40 nm e uma morfologia esférica, supôs-se que a suspensão obtida nesse trabalho também possuiria formato esférico e diâmetro médio dentro dessa faixa. [72]–[76].

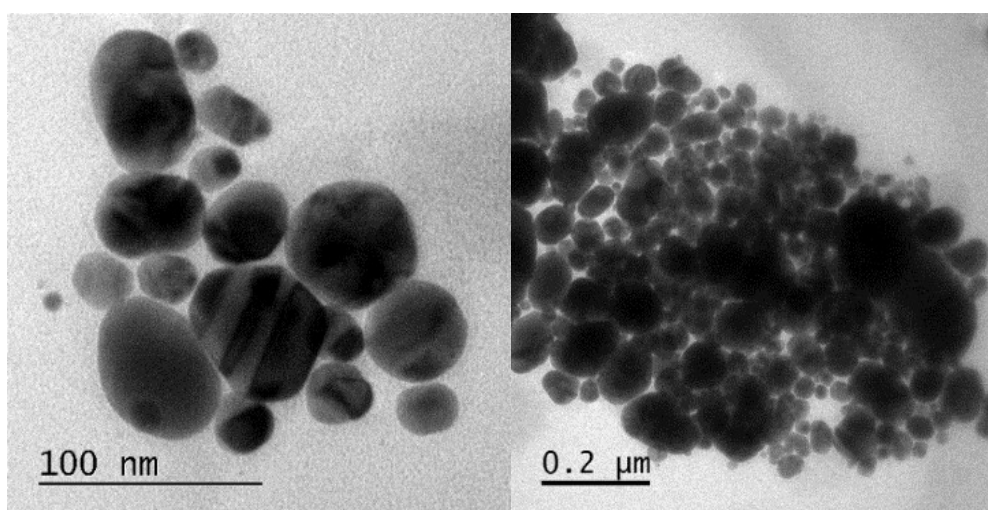
Essa teoria também foi utilizada por outros pesquisadores como Ranozek-Soliwoda e colaboradores (2019), Badi'ah e colaboradores (2019) e Farooqi e colaboradores (2018), onde estes obtiveram as nanopartículas por diferentes métodos, como através da utilização de extrato

vegetal e utilizando microgéis preparados por polimerização por precipitação de radicais livres como microrreatores para a síntese das nanopartículas. Os pesquisadores obtiveram resultados de máxima absorção dentro dessa mesma faixa, onde acabaram caracterizando suas nanopartículas como de formato esféricas pela teoria de Mie, sendo posteriormente comprovadas por outras técnicas como por microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). [72]–[76].

Observa-se que a absorção centrada em 409 nm é um indicativo de que as AgNPs sintetizada estavam em tamanho nanométrico. Assim, para partículas que possuam diâmetros maiores, a banda plasmônica tende a se deslocar para regiões de menor energia e maior comprimento de onda.

Assim, a fim de se avaliar se as nanopartículas produzidas realmente possuiriam formato esférico, o tamanho médio das nanopartículas obtidas e como estavam distribuídas no meio, foi realizado o estudo morfológico através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observando-se a Figura 10, percebe-se que as nanopartículas possuem tamanhos variados e alguns conjuntos de aglomerados, o que pode ter sido resultado de um baixo processo de estabilização do citrato de sódio durante a síntese, o que pode ter acabado provocando um crescimento descontrolado de algumas das partículas no meio. [77].

Ademais, estas apresentaram uma morfologia predominantemente esférica ou semiesférica, como tinha sido pressuposto devido ao máximo de absorção no UV-Vis estar dentro da faixa de máxima absorção de plasmon da Teoria de Mie para nanopartículas esféricas.



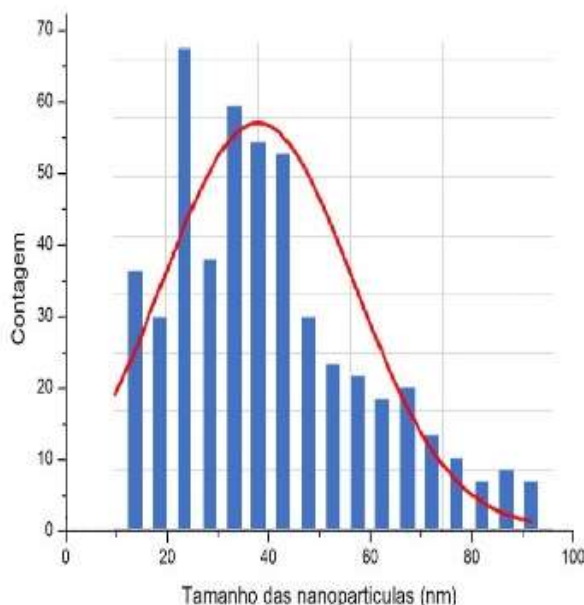


Figura 10: Imagens do MET das AgNPs em meio aquoso (acima) e gráfico histograma do diâmetro (nm) das AgNPs (abaixo). Fonte: Autor (2022).

A variação de tamanhos de partículas também pôde ser observada pelo histograma de distribuição de tamanho médio das partículas, onde dentro de um grupo de 300 nanopartículas analisadas via o programa Image J, estas apresentaram um diâmetro mínimo de 8,3 nm e máximo de 93 nm, mostrando que houve uma polidispersividade devido à ampla distribuição de tamanho durante a síntese, mas apresentando uma densidade de partículas maior para diâmetros menores. O tamanho médio obtido foi de 40 nm, dentro do esperado pela Teoria de Mie, corroborando com o resultado obtido por UV-Vis.

Através dos dados coletados por intermédio das técnicas aqui utilizadas, pode-se afirmar que a síntese das AgNPs pelo método da redução com ácido ascórbico e estabilização com citrato foi bem-sucedida.

6.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

As membranas produzidas foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura a fim de avaliar sua morfologia, verificando e comparando o comportamento das membranas puras e ao dopá-las com nanopartículas de prata em diferentes concentrações.

A sequência de imagens da Figura 11- a, b e c mostram a morfologia da membrana de alginato puro (ALG 100:0) em diferentes magnificações. Percebe-se que esta se apresenta com uma superfície homogênea e densa, levemente rugosa, rugosidade essa que pode ser atribuída à presença e ação da glicerina, a qual pode acabar provocando uma ligeira lixiviação da superfície, como foi constatado no trabalho de Moraes e colaboradores (2014), onde estes ao produzir blendas de fibroína de seda e alginato de sódio com e sem glicerina, observaram-nas no MEV, e apenas as membranas que possuíam glicerina apresentaram essa rugosidade. [38].

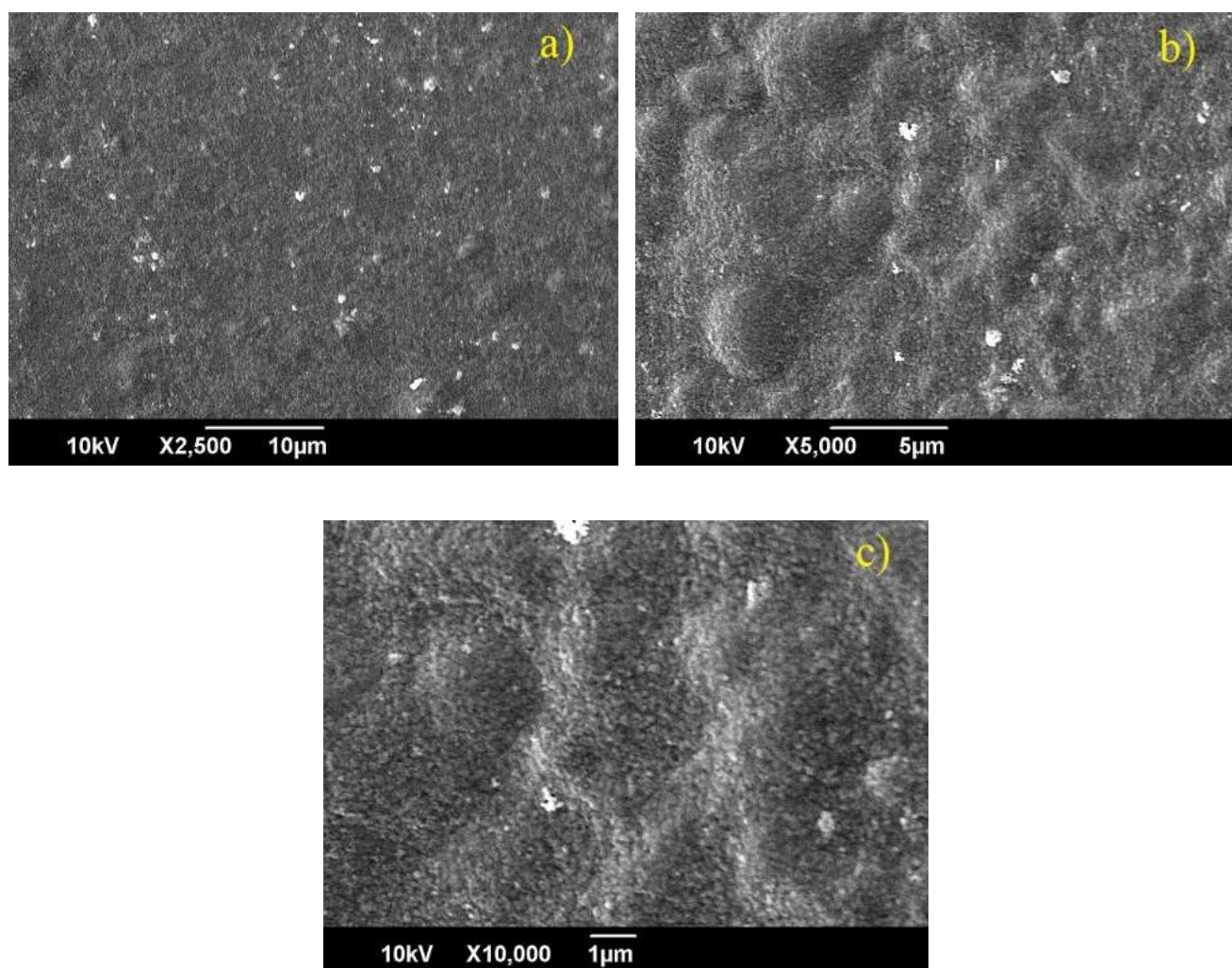


Figura 11: Micrografias das membranas produzidas de alginato puro em diferentes magnificações. Fonte: Autor (2022).

A sequência de imagens da Figura 12- a, b e c mostram a membrana de alginato com adição de 2,5% de AgNPs (100:0 2,5%) também em diferentes magnificações. É possível verificar uma possível presença de nanopartículas de prata na superfície e um pouco abaixo

dela em pequenas aglomerações esféricas, o que poderia indicar que a incorporação das nanopartículas misturando diretamente na solução pode ser viável para o alginato. [78].

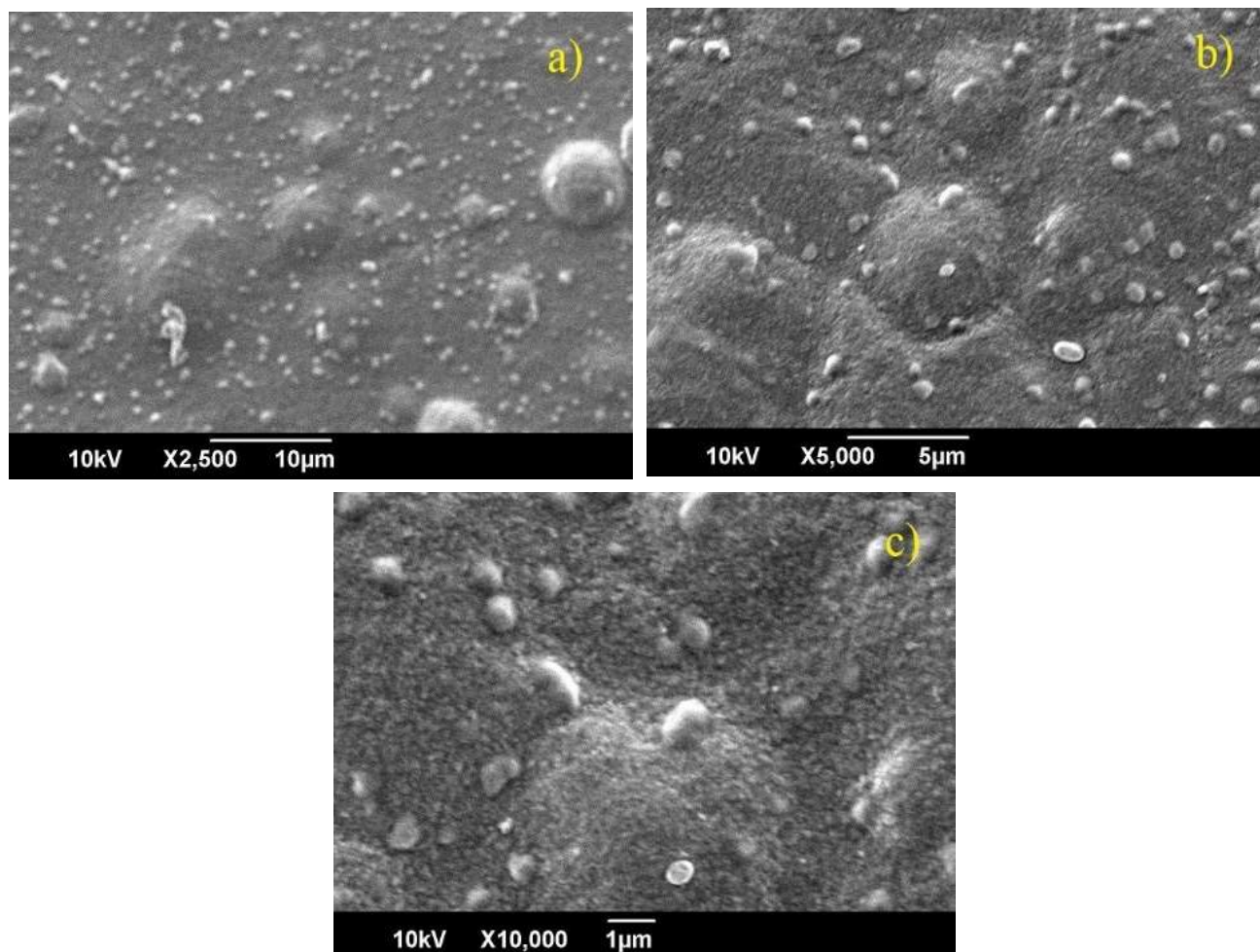


Figura 12: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- ALG 2,5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

A presença das nanopartículas aglomeradas esféricas também foi verificada no trabalho de Luyt e Mokhena (2017), onde estes fizeram nanofibras da blenda de alginato de sódio e polietileno óxido sendo posteriormente imersas em uma solução de quitosana-AgNPs 1% por 5 minutos. Ao observar no MEV, verificaram partículas esféricas na superfície das nanofibras cobertas com uma camada fina de quitosana, a qual atribuíram essas esferas à prata aglomerada. [78].

As imagens da sequência da Figura 13- a, b e c representam a membrana 90/10 (ALG/SF) pura, onde pode-se verificar que há uma pequena separação de fases microscópica, melhor verificado em maiores magnificações, aparentando terem um formato aproximadamente

esférico, como também foi verificado no trabalho de Moraes e colaboradores (2014), onde estes constataram que para blendas em que o volume de FS seja menor do que 25%, a separação de fases microscópica ocorre de forma globular e para maiores volumes formam fibrilas. [38].

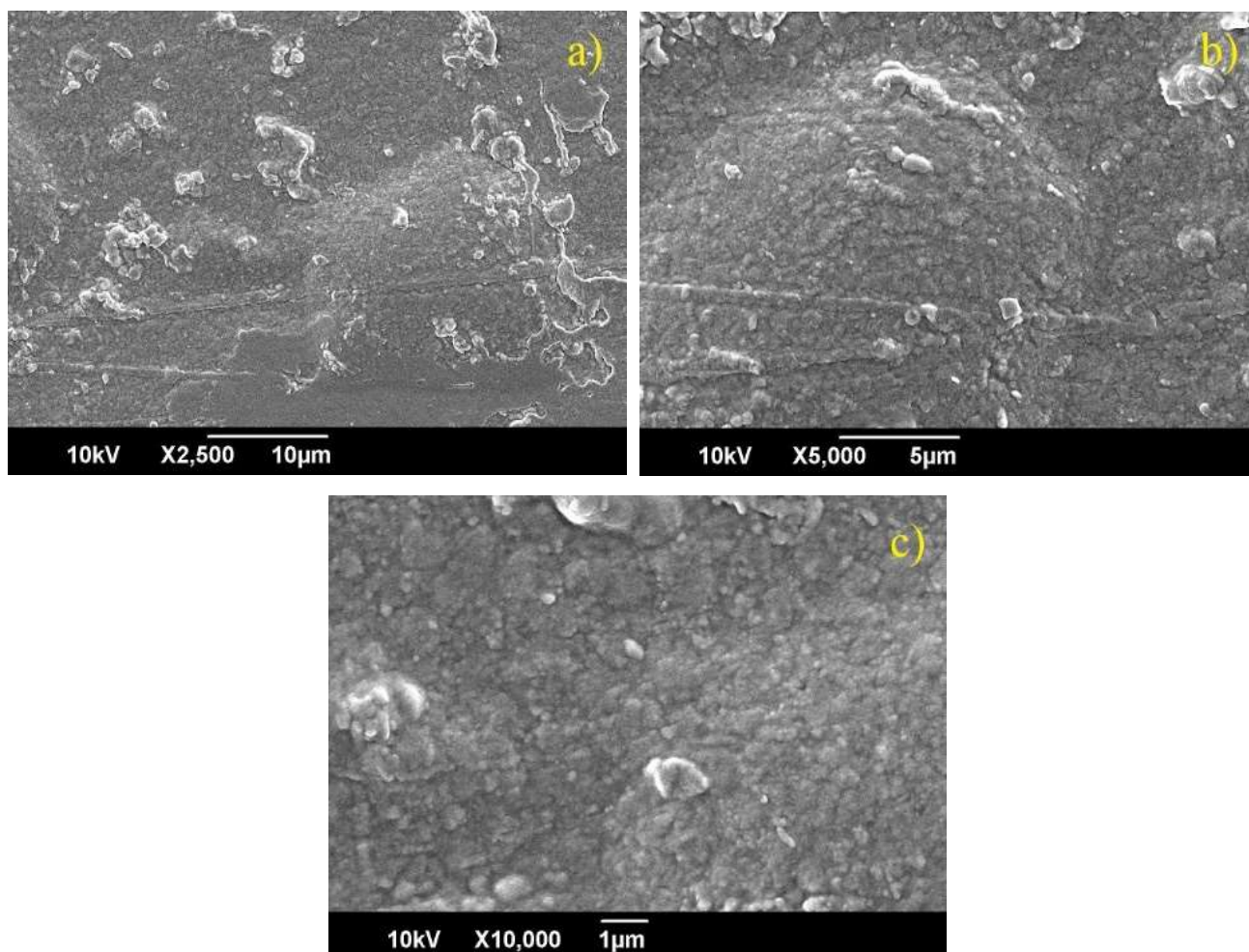


Figura 13: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 puro. Fonte: Autor (2022).

Isso ocorre devido a solução alcalina do ALG acabar diminuindo as interações entre a fibroína consigo mesma, onde as interações FS-FS acabavam ocasionando uma separação de fase macroscópica, mas não diminuía a repulsão entre os grupamentos do alginato e da fibroína, o que acabava promovendo uma separação de fases microscópica. [38].

Nesse trabalho também indica que a presença da glicerina na blenda acaba promovendo uma melhor interação intermolecular entre a fibroína e o alginato. No caso da membrana de 90/10 deste trabalho, a formação da separação de fases não ocorreu de forma mais intensa

devido à baixa concentração de fibroína presente na solução, uma vez que a solução de fibroína obtida foi de apenas 1%. [38].

Na sequência de imagens da Figura 14- a, b e c estão representadas membranas 90/10 (ALG/FS) dopadas com 2,5% de nanopartículas de prata (90:10 2,5%), onde pode-se observar melhor a separação de fases globular e um leve aumento da rugosidade da superfície, a qual poderia ser atribuída à presença das AgNPs, as quais poderiam se acomodar nas regiões de microdomínio formados pela separação de fase e promover interações interfaciais entre as nanopartículas e as cadeias da fibroína.

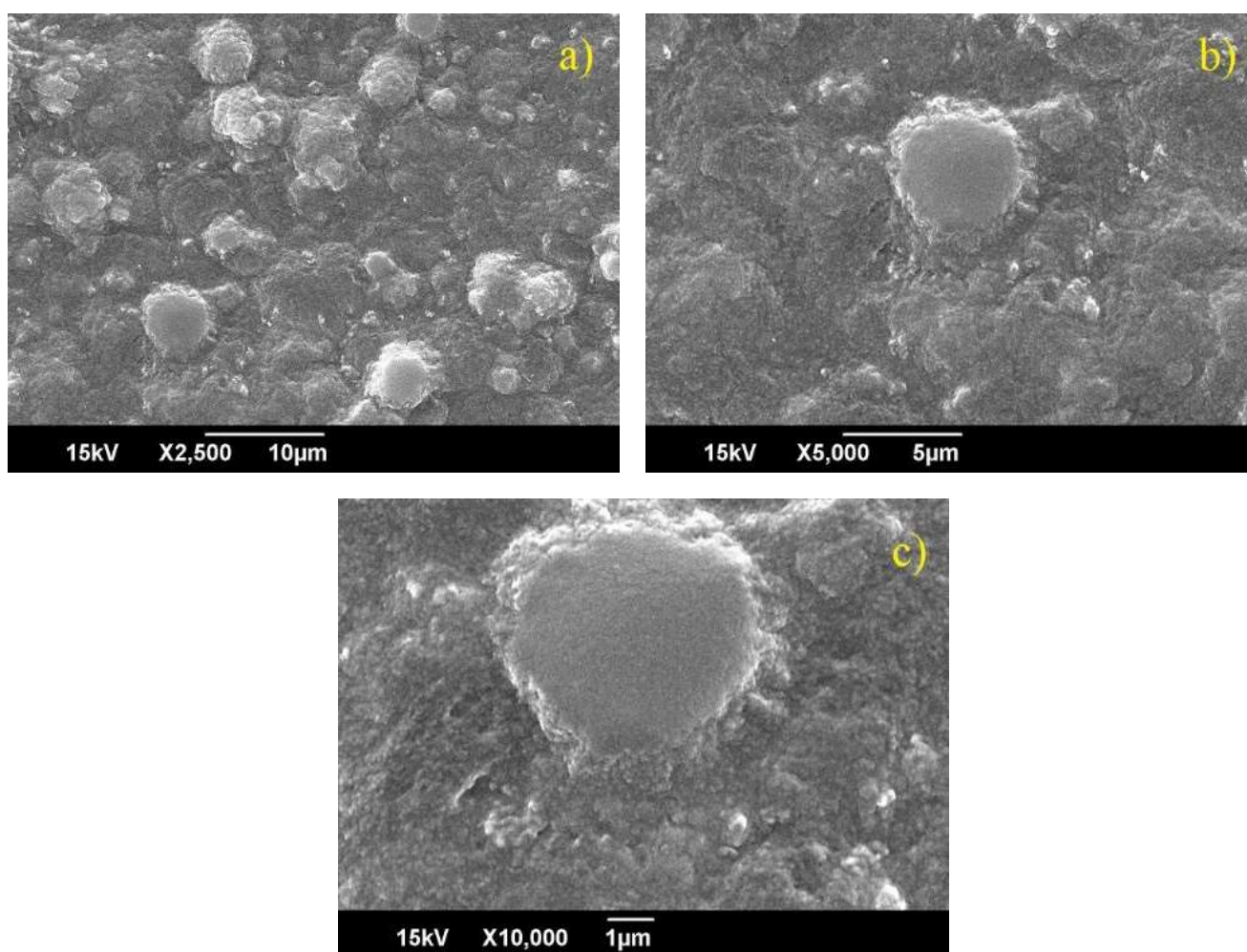


Figura 14: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 2,5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

Essa ocorrência também foi observada nos trabalhos de Wang e colaboradores (2014) e Lin e colaboradores (2015), em que o primeiro utilizou óxido de grafeno e o segundo quantum dots em uma solução de fibroína de seda, onde tanto o óxido quanto os quantum dots se

distribuíram uniformemente no domínio amorfo da fibroína e acabaram criando uma força entre eles, como ligações de hidrogênio entre os grupos polares amino da fibroína e os grupos funcionais do óxido de grafeno e o grupo -COO^- dos quantum dots, que acabaram promovendo uma estrutura cristalina no material. [79], [80].

Observando as imagens da Figura 15- a, b e c que representam as membranas 90/10 (ALG/FS) dopadas com 5% de AgNPs, percebe-se que houve um aumento da rugosidade da superfície da membrana e do grau de aglomeração com o aumento da concentração de nanopartículas no sistema, aumento que também foi verificado em outros estudos como em Li e colaboradores (2017), Patil e colaboradores (2018) e Lan e colaboradores (2020). [3], [81], [82].

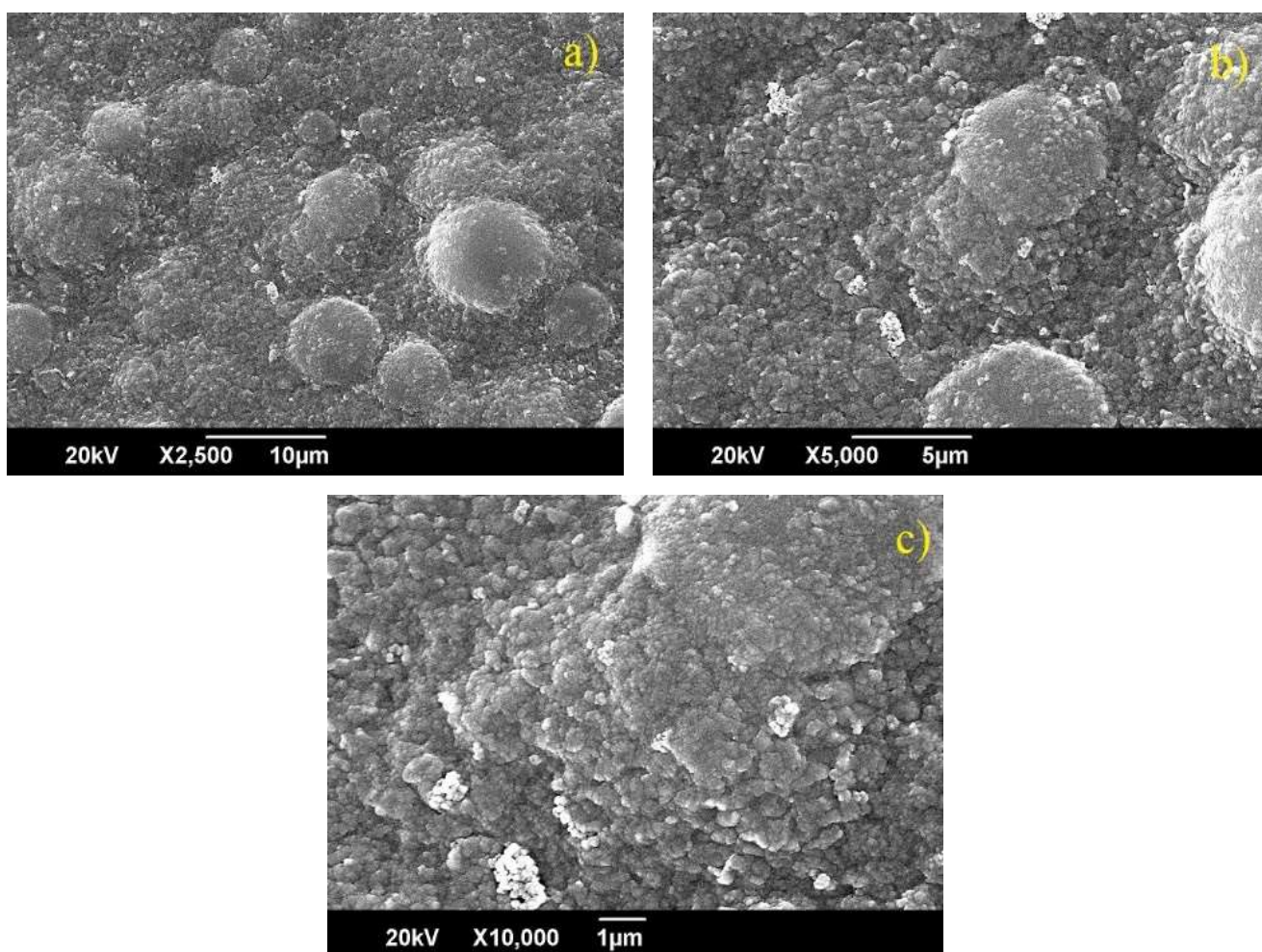


Figura 15: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 90/10 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

Estes pesquisadores também citaram que esse aumento na rugosidade poderia aumentar a capacidade de adsorção de proteínas na superfície do material e melhorar a proliferação celular, ou seja, poderia acelerar o processo de cura da pele através da adsorção de células na superfície do material e multiplicação para fechamento da lesão. [3], [81], [82].

As membranas 75/25 puras são representadas na sequência da Figura 16- a, b e c. Nota-se que houve uma mudança no formato da separação de fases entre ALG/FS, passando de globular para o formato de fibrilas, podendo ter acontecido devido à maior porcentagem de fibroína nessa membrana, o que acabou sendo o contrário do que foi encontrado por Moraes e colaboradores (2014) em seu trabalho. [38].

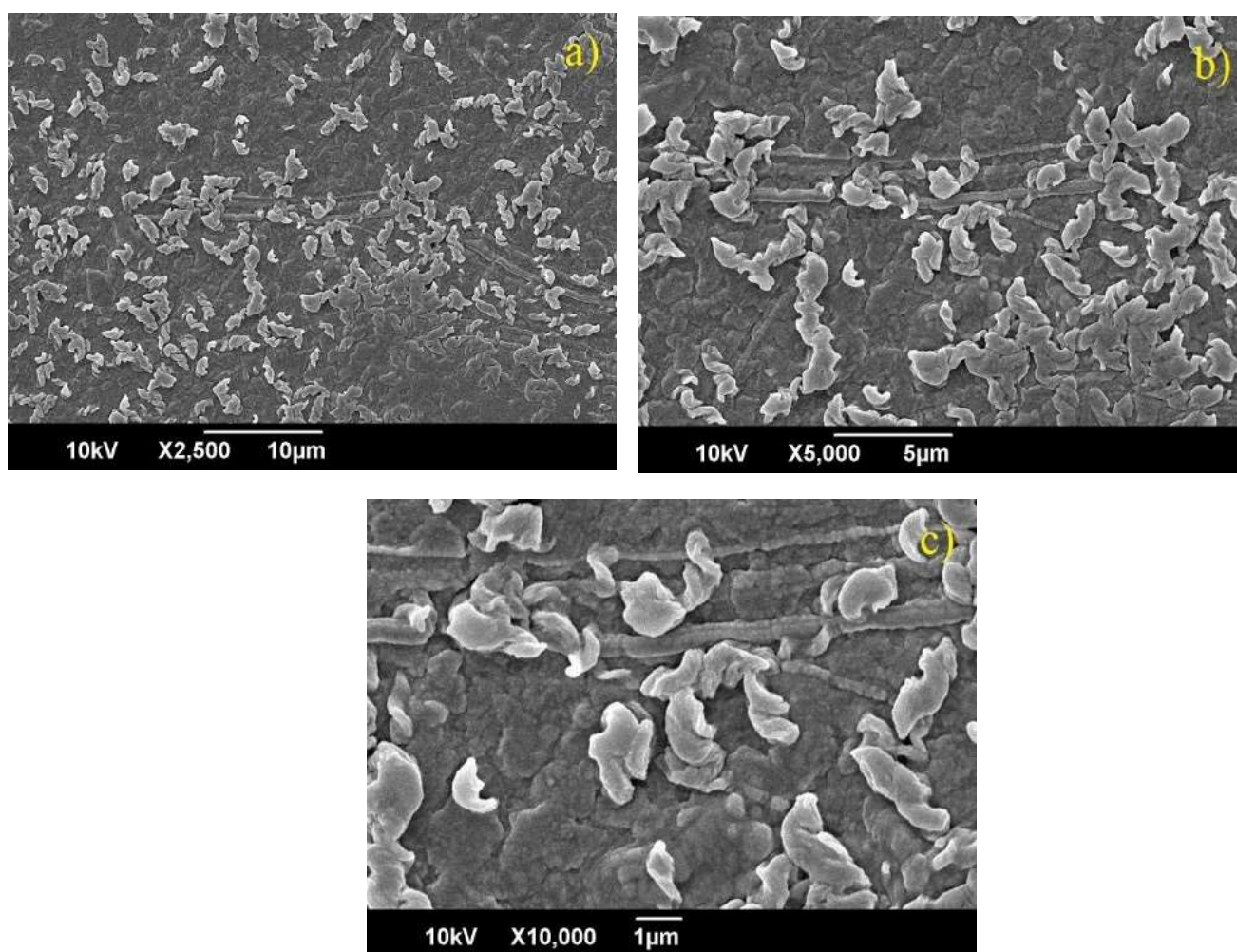


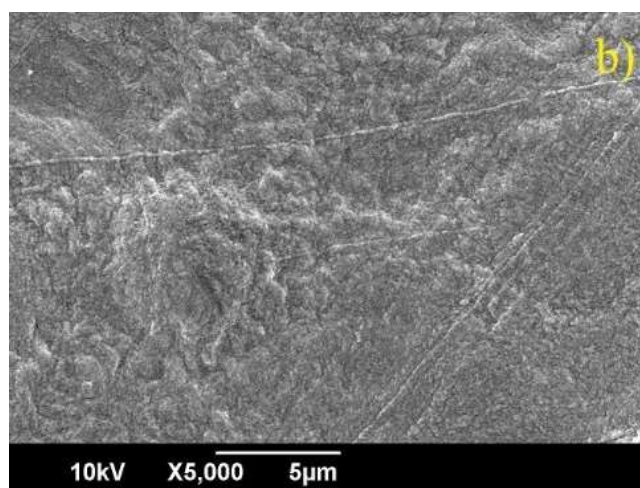
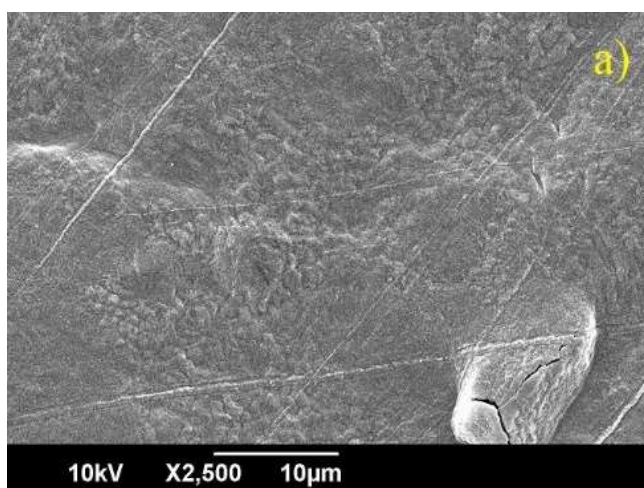
Figura 16: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 75/25 puro. Fonte: Autor (2022).

Para a mesma porcentagem utilizada para essa membrana, ainda foram visualizados os glóbulos ao invés das fibrilas pelos pesquisadores, contudo, a concentração da solução de

fibroína de seda obtida por Moraes foi de 2% enquanto a obtida nesse trabalho foi de 1%, então poder-se-ia supor que devido a necessidade de adicionar um volume maior da solução de fibroína na blenda, acabou alterando o pH da solução alcalina do alginato, ocasionando na mudança de conformação de Seda I que possui mais sítios ativos para interações, para a conformação Seda II, com menos sítios ativos, onde a fibroína acaba gerando mais interações FS-FS que tinham sido diminuídas anteriormente. [38].

Lopes, Moraes e Beppu (2018) propuseram uma outra explicação, uma vez que obtiveram o mesmo resultado, onde estes presumiram que o evento poderia ocorrer devido a própria presença do alginato, pois este é um componente hidrofílico, que acabaria estimulando as interações entre a fibroína. [68].

A sequência a, b, c, d, e, f da Figura 17 representam as membranas 75/25 (ALG/SF) dopadas com 2,5 (75:25 2,5%) e 5% (75:25 5%) de nanopartículas de prata respectivamente. Percebe-se que não é mais possível verificar com tanta clareza a separação de fases, apenas um aumento da rugosidade da superfície, como foi verificado anteriormente para as membranas 90/10 2,5 e 5%, fato que poderia ser atribuído a mesma explicação, onde as nanopartículas poderiam ter a tendência a se aglomerar nas regiões de microdomínio entre as fases e formariam interações interfaciais entre os polímeros da blenda, fazendo com que a rugosidade superficial aumentasse com o aumento da presença das nanopartículas no sistema.



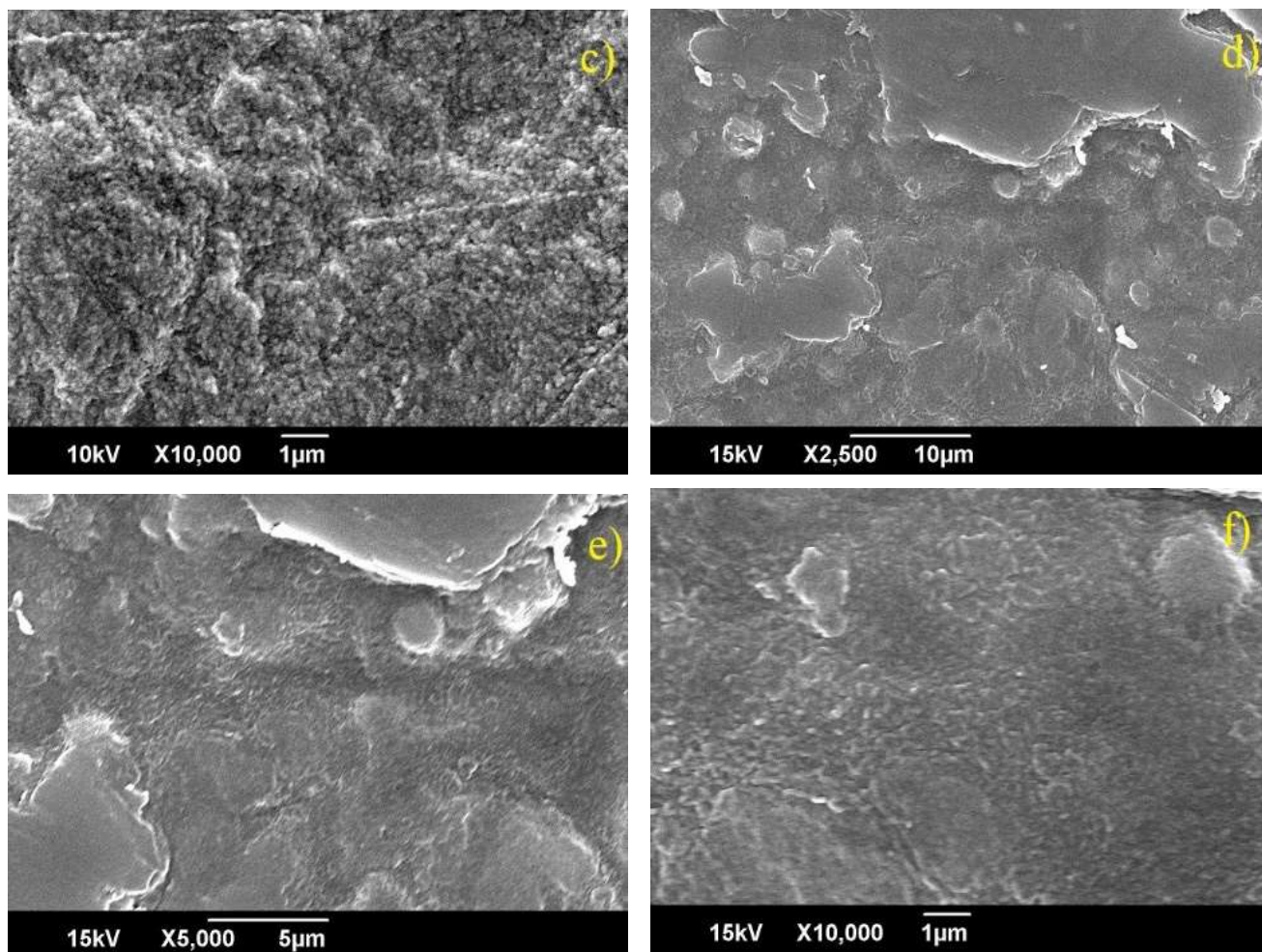


Figura 17: Micrografias das membranas produzidas: a, b e c- 75/25 2,5% AgNPs e d, e, f- 75/25 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

6.4 Termogravimetria (TGA)

As propriedades térmicas das blendas foram avaliadas por TGA a fim de se determinar o efeito das AgNPs inseridas nas diversas membranas. Como o objetivo do trabalho é a aplicação das membranas como curativo de pele, o foco principal se daria em relação a primeira etapa de perda de massa, uma vez que a temperatura das membranas em contato com as lesões não ultrapassaria 50 °C, contudo, também foram estudadas as demais etapas de perda de massa para melhor entendimento do efeito causado pela adição das nanopartículas de prata na membrana.

Observando o gráfico de TGA e DTG referente às membranas de alginato puro e dopadas com nanopartículas na Figura 18, existe uma perda de massa inicial na região de 40-

100 °C referente à perda de umidade da membrana, o que se pode observar no gráfico, inclusive com mais intensidade no DTG da membrana pura, a qual teve uma perda de massa de 38,8%, vide Tabela 2, uma vez que estas estavam armazenadas em um ambiente com maior umidade.

Tabela 2: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para a membrana de alginato pura e dopadas.

Composição da Membrana	Perda de massa 40-100 °C	Perda de massa 160-300 °C
ALG puro	38,8 %	26,7%
ALG 2,5% AgNPs	3,5%	41,8%
ALG 5% AgNPs	9%	47,1%

Fonte: Autor (2022).

Já a segunda perda de massa que se inicia na faixa de 160-300°C e tende a finalizar na faixa de 320-500 °C, se refere a degradação principal das cadeias do polímero, ocorrendo o rompimento das ligações C-H formando resíduos carbônicos, além da perda de água interna.

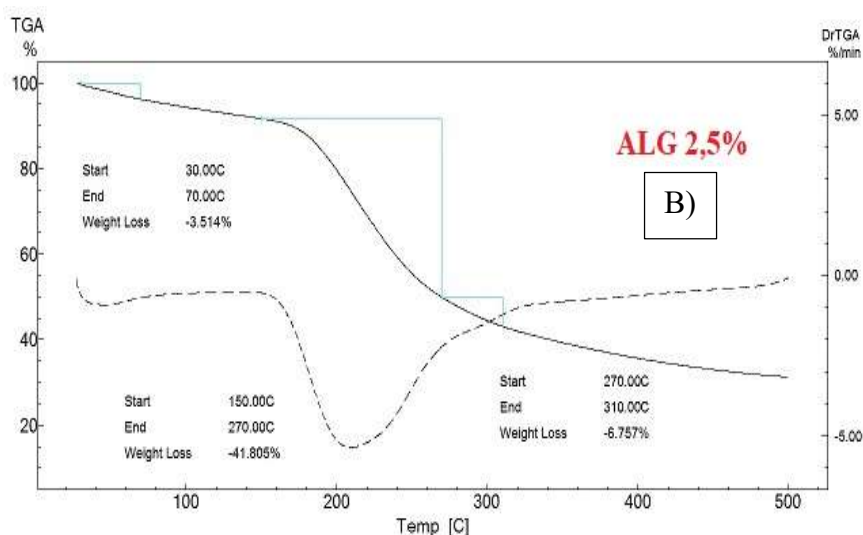
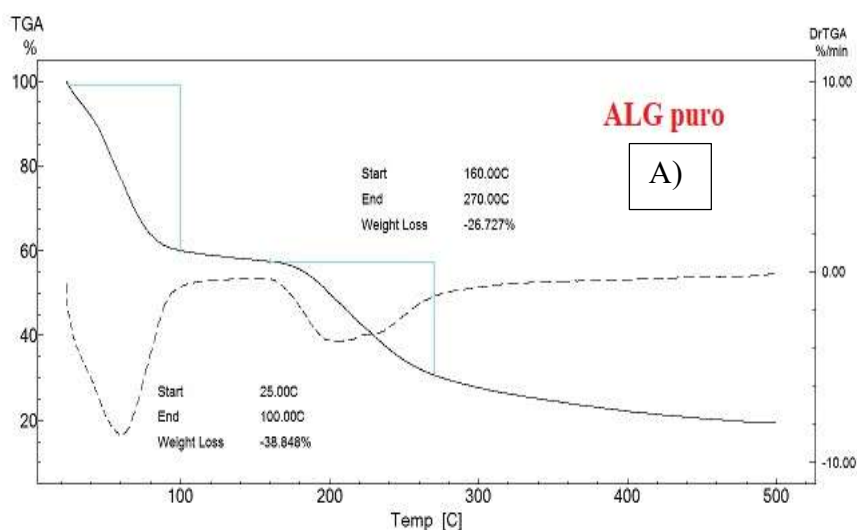
Contudo, para o ALG 5% a temperatura de início é levemente deslocada para menores temperaturas, sendo melhor visualizado pelo seu DTGA, assim como teve uma maior porcentagem de perda de massa dessa faixa, o que poderia indicar que a interação das AgNPs com o ALG diminui um pouco a estabilidade térmica do polímero. [20].

Além disso, notou-se que para as membranas de alginato puro, a adição de nanopartículas no sistema acabou provocando uma maior degradação da cadeia do ALG quando comparado a este sem AgNPs, aumentando a porcentagem de perda de massa com o aumento da dopagem de nanopartículas, o que pode acabar reforçando que as interações formadas somente entre os grupamentos do alginato com as nanopartículas acaba diminuindo sua estabilidade térmica.

Segundo o trabalho de Lima (2018) e Eghbalifam e colaboradores (2015), esse fenômeno ocorreria devido às cargas das nanopartículas acabarem interagindo e desorganizando a matriz do alginato, afastando suas cadeias, evento semelhante com o que ocorre quando se adiciona um plastificante ao sistema, fazendo com que o calor absorvido pelo material acabe se distribuindo com uma maior facilidade e rapidez pelo interior do alginato e

seja iniciado a degradação de suas cadeias a uma menor temperatura, uma vez que há menos barreiras a serem vencidas. [83], [84].

Além disso, para a membrana com 5% de AgNPs, ocorre ainda uma terceira perda de massa, que pode ser associada com a decomposição do material em óxido de sódio, liberando CO₂, a qual segundo outros estudos como de Ramontja (2016) e a Eivazzadeh-Keihan e colaboradores (2020) ocorreria na faixa de 550 até quase 820 °C. Essa antecipação pode ter ocorrido devido às interações das AgNPs com o alginato, onde uma maior porcentagem de nanopartículas no sistema acaba provocando uma maior desorganização da cadeia de alginato, diminuindo assim a energia necessária para que se inicie a degradação e com isso diminuindo sua estabilidade térmica a altas temperaturas. [20], [85].



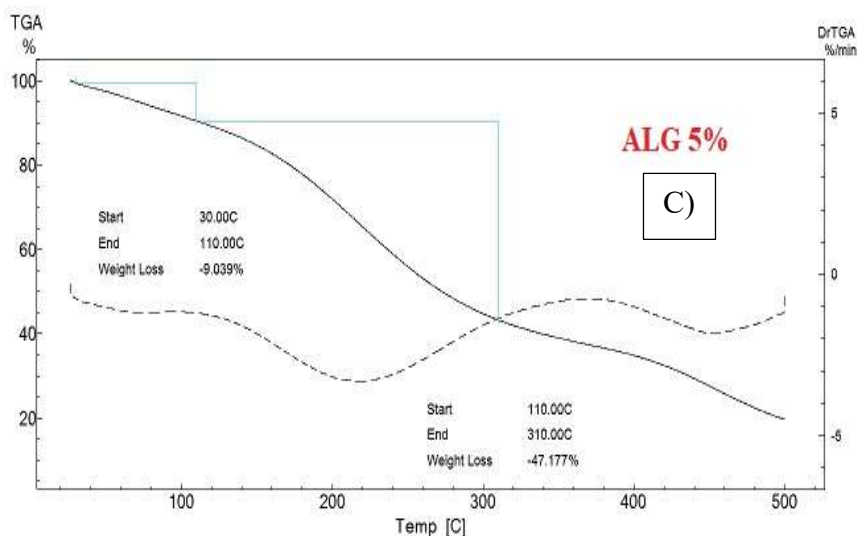


Figura 18: A) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG puro. B) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG 2,5% AgNPs. C) Gráfico TGA e DTGA das membranas ALG 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

Indo para o estudo das blendas de 90/10 (ALG/FS) pura e dopadas com nanopartículas, onde os gráficos podem ser visualizados através da Figura 19, a primeira perda de massa ocorre na mesma faixa de perda de umidade como aconteceu com o alginato puro, entre 40-100 °C, assim como a segunda perda de massa, referente a degradação da cadeia do alginato, ocorre na faixa de 160- 300 °C. Diferente do que ocorreu no ALG puro, não houve deslocamento do início da temperatura de degradação das cadeias com a dopagem de 5% de AgNPs. As porcentagens de perda de massa estão relatadas na Tabela 3.

Tabela 3: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para as membranas 90/10 pura e dopadas.

Composição da Membrana	Perda de massa 40-100 °C	Perda de massa 160-300 °C	Perda de massa 270-320 °C
90/10 puro	1,3 %	35,1 %	11,5 %
90/10 2,5% AgNPs	2 %	41,3 %	3,2 %
90/10 5% AgNPs	6,6 %	34,2 %	9,5 %

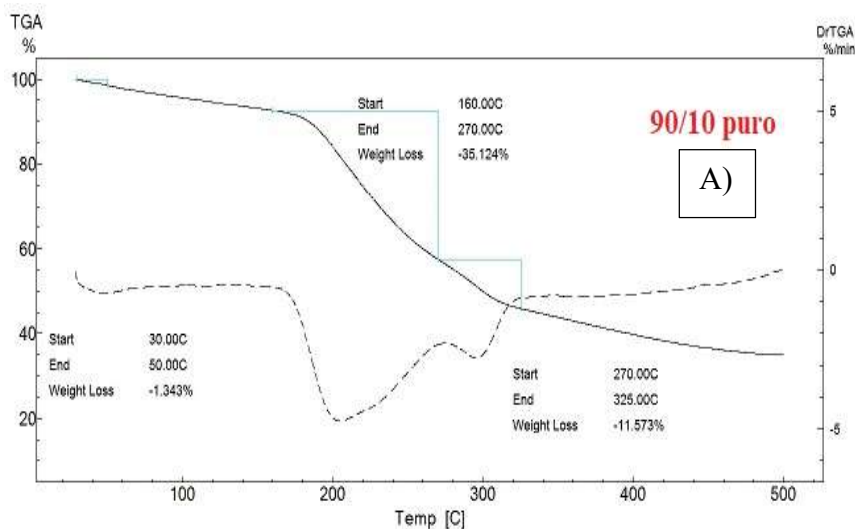
Fonte: Autor (2022).

Isso pode indicar que a blenda se mantém mais estável à adição das nanopartículas em relação à sua temperatura do que o polímero puro devido às AgNPs acabarem interagindo em uma maior quantidade com os grupamentos da fibroína do que com os do alginato, onde estas poderiam acabar formando por exemplo ligações de hidrogênio com os grupos polares amino da fibroína, como foi mostrado por outros pesquisadores anteriormente.

Ainda, na blenda é observado, para todas as concentrações, uma terceira perda de massa logo após a segunda, na faixa de 270-320 °C, a qual seria, segundo a literatura, referente à degradação da fibroína de seda presente no material, contudo levemente deslocada para a esquerda, como também foi verificado no estudo de Moraes e colaboradores (2014). [38].

Nesse trabalho os pesquisadores sugeriram que esse deslocamento da temperatura de degradação da FS para menores temperaturas poderia indicar que a interação entre os dois polímeros é mais fraca, talvez devido às suas cargas negativas acabarem provocando repulsão entre as cadeias, causando uma separação de fases, como já observado anteriormente pelas imagens de MEV através do aparecimento da separação de fases microscópica de forma globular para as membranas de 90/10 e como fibrilas para as membranas de 75/25. [38].

Para a etapa de degradação da fibroína na blenda, percebe-se que a presença das nanopartículas acabou aumentando a estabilidade térmica da FS uma vez que ocorreu uma menor porcentagem de perda de massa quando comparada à blenda pura. Isso pode ter acontecido devido à interação que surgiu entre FS-AgNPs, onde pode ter ocasionado um aumento no grau de organização das moléculas, necessitando de uma maior energia para que ocorra sua degradação.



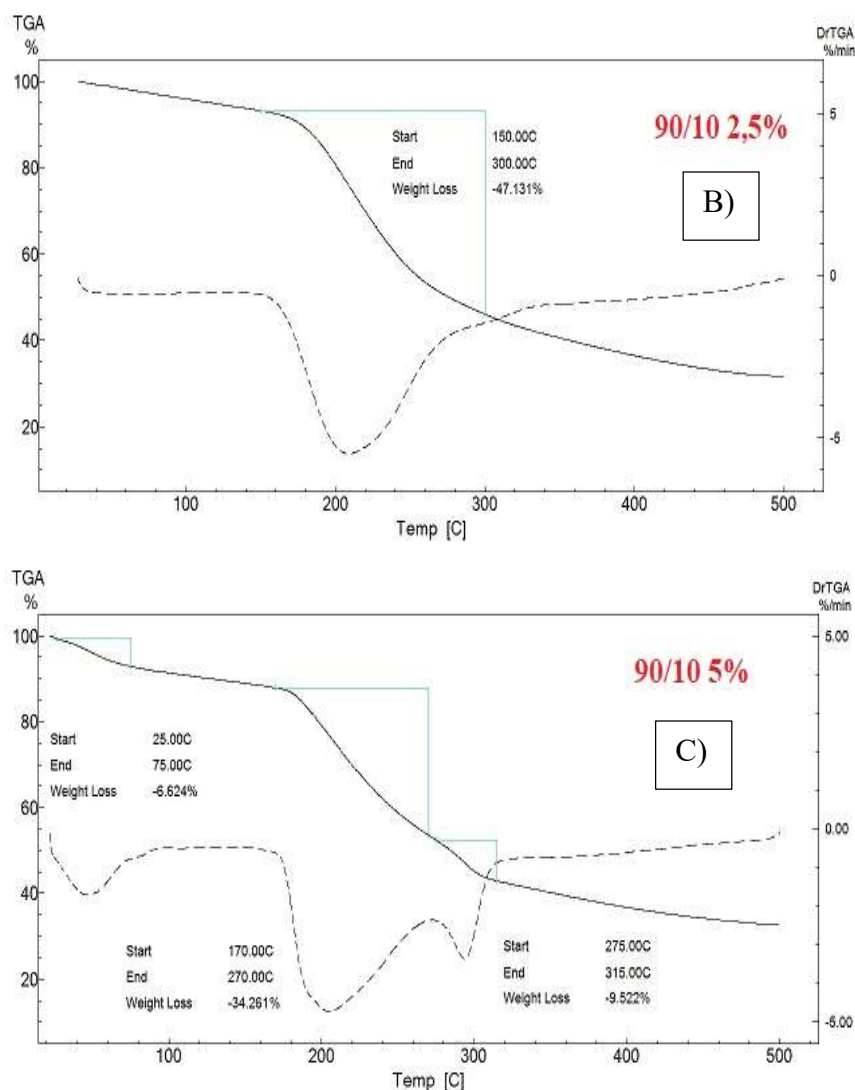


Figura 19: A) A) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 puro. B) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 2,5% AgNPs. C) Gráfico TGA e DTGA das membranas 90/10 5% AgNPs. Fonte: Autor (2022).

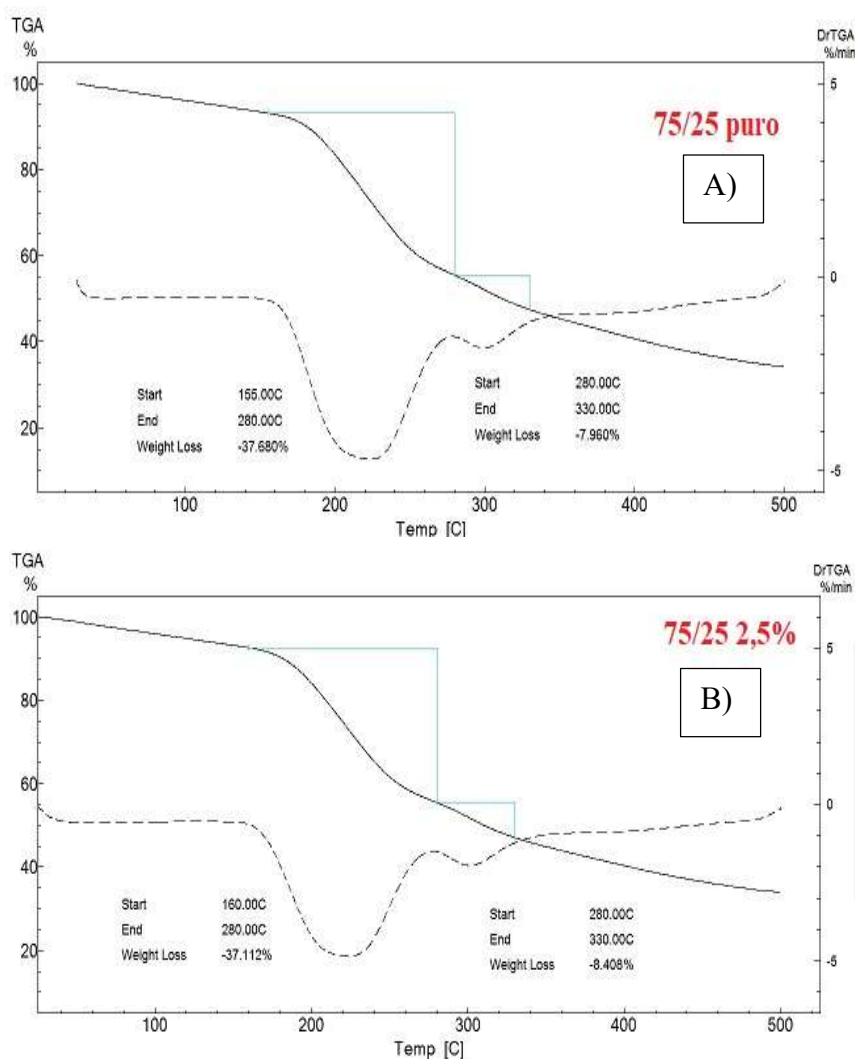
Por último, as blendas 75/25 (ALG/FS), Figura 20, tiveram o mesmo comportamento das 90/10 em relação às perdas de massa nas mesmas faixas de temperatura, vide Tabela 4, apenas diferenciando na perda de massa na região da fibroína por apresentar uma banda mais larga de 270-340 °C, devido à maior presença de fibroína nessa blenda e um menor percentual de perda de massa em cada um dos pontos, o que pode indicar uma maior estabilidade da blenda devido à maior presença de fibroína.

Tabela 4: Porcentagens de perda de massa relativas à cada faixa de temperatura para as membranas 75/25 pura e dopadas.

Composição da Membrana	Perda de massa 40-100 °C	Perda de massa 160-300 °C	Perda de massa 270-320 °C
75/25 puro	1,5 %	37,7 %	7,9 %
75/25 2,5% AgNPs	1,2 %	37,1 %	8,4 %
75/25 5% AgNPs	45,6 %	18,9 %	2,8 %

Fonte: Autor (2022).

Em relação à adição de AgNPs, notou-se que na faixa de degradação do alginato, houve uma leve diminuição na percentagem de perda de massa, o que pode indicar uma maior estabilidade da membrana.



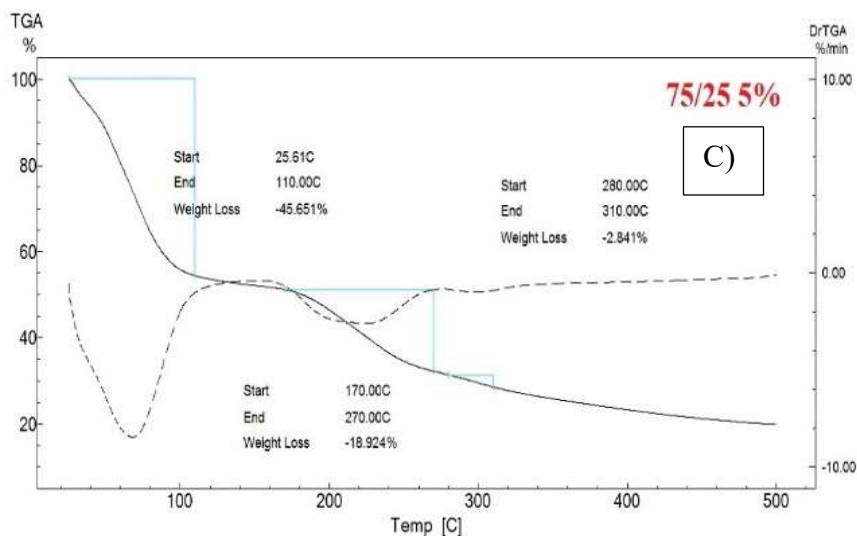


Figura 20: A) Gráfico TGA das membranas 75/25 puro e dopadas com 2,5 e 5% de AgNPs. B) Gráfico DTGA das membranas 75/25 puro e dopadas com 2,5 e 5% de AgNPs. Fonte: Autor (2022).

6.5 Teste de intumescimento

A capacidade de um material de conseguir absorver uma alta taxa de fluidos permite informar se este pode ser utilizado como matéria-prima para uso na área de curativos, uma vez que essa característica permite uma aceleração no processo de regeneração da pele ao absorver o exsudato produzido no local e promover a livre circulação de células, nutrientes e remoção de resíduos. [3].

A Tabela 5 apresenta as médias dos resultados obtidos mais ou menos o desvio padrão (SD) para as membranas das blendas puras e dopadas com nanopartículas de prata, realizado em triplicata, para o teste de intumescimento, nos tempos de 15, 30 e 60 minutos em contato com água destilada.

Tabela 5: Resultado do ensaio de intumescimento das blendas.

Composição da Membrana	Média (%) + SD (15 min)	Média (%) + SD (30 min)	Média (%) + SD (60 min)
90/10 puro	120 ± 4	124 ± 4	132 ± 4
90/10 2,5% AgNPs	97 ± 3	97 ± 3	100 ± 3
90/10 5% AgNPs	106 ± 1	107 ± 1	109 ± 1
75/25 puro	74 ± 1	74 ± 2	79 ± 2
75/25 2,5% AgNPs	80 ± 1	82 ± 1	89 ± 1

Fonte: Autor (2022).

A blenda de 90/10 pura teve uma percentagem de absorção de fluido maior do que a de 75/25, o que já era esperado, uma vez que o alginato de sódio possui uma capacidade de absorção de fluidos maior devido à presença de grupos carboxila e hidroxila em sua estrutura, o que permite a formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água, tornando-o altamente hidrofílico. [38].

A fibroína de seda, diferentemente, tem sua estrutura formada por aminoácidos hidrofóbicos, que tende a interagir entre si, ocasionando o dobramento da fibroína, como pôde ser verificado nas imagens do MEV para a membrana 75/25, onde esta acabou formando uma separação de fases em forma de fibrilas ao invés de globular. Assim, quanto maior a porcentagem de FS na membrana, menor será sua capacidade de absorção de fluidos. [38].

O resultado obtido para o grau de intumescimento para as membranas puras se mostrou menor do que o que foi obtido por Moraes e colaboradores (2014). Isso pode ter ocorrido devido ter acontecido um maior grau de reticulação das membranas nesse trabalho durante o processo de estabilização com a solução de H₂SO₄ 0,1 M em etanol 50%, fazendo com que menos grupamentos hidrofílicos -OH do alginato estivessem livres para interagirem com a água. [38], [81].

O grau de reticulação do material pode sofrer influência de vários fatores, como pelo tempo do procedimento, onde um maior tempo acaba aumentando o grau de reticulação, a natureza do reticulante, caso ele tenha uma maior ou menor capacidade de reticulação de determinada substância, e pela concentração utilizada desse reticulante, onde uma maior concentração resultaria em um maior grau de reticulação. [38], [81].

A capacidade de intumescimento do material reflete diretamente no poder plastificante, ou seja, de promover a mobilidade das cadeias poliméricas, que a própria água terá no material. Um menor grau de intumescimento significaria um menor grau de retenção de água por suas cadeias, provocando um menor afastamento da rede e consequentemente uma menor mobilidade desta, o que pode ter acontecido para as membranas das blendas sem dopagem com nanopartículas. [67].

Em relação às membranas 90/10 dopadas com AgNPs, verificou-se que houve uma ligeira queda na porcentagem de absorção de água comparado com a membrana sem dopagem, aumentando novamente com o aumento na concentração de nanopartículas no meio. Isso pode ter acontecido devido às AgNPs possivelmente se acomodarem nos microdomínios e promover interações interfaciais entre os polímeros, restringindo os sítios reativos, diminuindo a capacidade de absorção de água. [86].

Por outro lado, uma maior dopagem acaba também aumentando a rede polimérica ao afastar as cadeias dos polímeros, desorganizando suas matrizes e consecutivamente os espaços livres que já existiam na rede devido a separação de fases microscópica, facilitando novamente a capacidade de absorção de fluidos mesmo havendo a ação das AgNPs como promotor de interações interfaciais entre os polímeros. [86].

Esse aumento na rede polimérica também pode explicar um maior grau de intumescimento para as membranas 75/25 dopadas, uma vez que para a blenda pura a maior adição de fibroína no sistema pode ter acabado alterando o pH da solução alcalina do alginato, ocasionando na mudança de conformação de Seda I anteriormente obtida pela fibroína, que possui mais sítios ativos para interações, para a conformação Seda II, mais estável e com menos sítios ativos, uma vez que a fibroína acaba gerando mais interações FS-FS, o que diminuiu a absorção de água na blenda pura.

Contudo, ao dopar a membrana com AgNPs, as nanopartículas ao interagirem com os polímeros presentes podem ter provocado também um afastamento de sua rede polimérica, expondo mais sítios ativos disponíveis para interação.

6.6 Teste de transmissão de vapor de água (TVA) e de permeabilidade (PVA)

Determinar a taxa de transmissão de vapor de água de um curativo é significativo uma vez que informa se este se encontra na zona adequada de controle de perda de água e permeação de gases que possam ajudar no processo de cicatrização ideal da lesão. Um curativo não pode permitir uma alta taxa de transmissão, uma vez que isso acaba ocasionando na perda rápida de

umidade, provocando dor uma vez que vai acabar expondo as terminações nervosas lesionadas e produzir cicatrizes, e também não pode ter uma baixa taxa de transmissão, uma vez que vai acumular exsudato no local, diminuindo a fixação do curativo no local, aumentando a chance de infecção e consequentemente retardando o processo de cura da pele. [3].

A fim de focalizar os testes para as membranas que apresentaram os melhores resultados em relação aos testes anteriores, foram realizados e determinados os testes de taxas de transmissão de vapor d'água e de permeação ao vapor das membranas puras e dopadas com 5% de AgNPs (vide Figura 21 e Tabela 6) e seus resultados indicam que estas estão na faixa de curativos comerciais como o curativo à base de hidrogel da Bard®, o qual possui valores de TVA na faixa de $50 \pm 19 \text{ g/m}^2\text{d}$, e o curativo Hidrocolóide Dermiflex® da Johnson & Johnson®, o qual possui valores de TVA na faixa de $76 \pm 5 \text{ g/m}^2\text{d}$ o que torna as membranas aqui preparadas boas candidatas à curativos de pele. [34].

Os valores apresentados na Tabela 6 são médias mais ou menos desvio padrão (SD) de três experimentos independentes.



Figura 21: Teste de TVA e PVA para as membranas. Fonte: Autor.

Tabela 6: Resultados de transmissão e permeação de vapor d'água para as membranas.

Composição da Membrana	TVA (g/dia.m ²) média + SD	PVA x 10 ⁻⁶ (g./m ²) dia.Pa) média + SD
90/10 puro	105 ± 26	2,0 ± 0,5
90/10 5% AgNPs	67 ± 6	1,3 ± 0,1
75/25 puro	288 ± 8	4,3 ± 0,1
75/25 5% AgNPs	149 ± 11	3,0 ± 0,2

Fonte: Autor (2022).

Pacheco e colaboradores (2020) em seu trabalho também verificaram a capacidade de manuseio de fluidos, semelhante aos dados de PVA obtidos nesse trabalho, de uma membrana multicamada composta por fibroína de seda, quitosana e alginato, obtendo resultados na faixa de 2.39 a 2.55 g/10 cm² /24 h, estando dentro de uma faixa ótima de drenagem de fluidos sugerida por diversos autores, onde estes indicam que a drenagem de cerca de 50% de exsudato produzido por determinada lesão durante o dia e que possua um tamanho de 10 cm² seria de 2,5g. [87].

Nesse trabalho, Pacheco ainda exhibe os resultados obtidos por outros pesquisadores que foram mais altos do que os seus, como os de Zhang e colaboradores (2017) para filmes de fibroína de seda onde encontraram resultados de 8.81 g/10 cm² /24 h e Estevam e colaboradores (2012) para filmes de quitosana 2% (w/w), onde encontraram resultados na faixa de 6.67 g/ 10 cm² /24 h de manuseio de fluidos. [87].

Os resultados elevados obtidos por esses pesquisadores podem ter sido influenciados pelo grau de reticulação que ocorreu para esses filmes, onde um menor ou nenhum grau significam uma alta capacidade de permeação de vapores através do material, contudo isso também acaba influenciando em uma rápida degradação do curativo quando em contato com a lesão, uma vez que ambos alginato e fibroína de seda são solúveis em água. [87].

Assim, como os resultados obtidos no presente trabalho se encontram próximos dessa faixa ideal, principalmente para as membranas 75/25 puras e dopadas com nanopartículas de prata, estes seriam materiais promissores para utilização na área de curativos. [87].

Houve também uma diferença nos valores de TVA e PVA entre as membranas de 90/10 e 75/25, onde aquelas com uma maior adição de fibroína obtiveram melhores resultados de permeação de vapores de água. Esse efeito também foi obtido por Moraes e colaboradores

(2013) onde estes trabalharam com membranas de alginato de sódio reforçadas com fibroína de seda em forma de fibras em proporções de 20, 40 e 60%. [67].

As membranas contendo apenas 20% de fibroína obtiveram os menores resultados de transmissão, aumentando os resultados com o aumento de FS na membrana, ao contrário dos resultados que obtiveram para os testes de intumescimento, como foram verificados no presente trabalho. [67].

Em relação às membranas contendo 20% de FS, Moraes explicou que devido a fibroína ter um grau de permeação de vapores menor do que o do alginato, sua presença acabou diminuindo a área de permeação da matriz do mesmo, resultando em uma menor permeação, contudo, à medida que aumenta a proporção de fibroína na membrana, começam a surgir também pequenos vazios que acabam permitindo a passagem de vapores de água através da membrana, intensificando os valores de TVA e PVA. [67].

Resultado este que pode estar ocorrendo para as membranas 75/25 que também acabaram apresentando uma mudança no formato da separação de fases entre ALG/FS, passando de globular para o formato de fibrilas, onde podem ter surgido também pequenos vazios ao longo da membrana fazendo com que a água passe com uma maior facilidade. [67].

Foi verificado também que a adição das nanopartículas de prata fez os valores de TVA e PVA sofrer um ligeiro decaimento, mas ainda se mantendo em níveis aceitáveis para uso como curativos. Isso pode ocorrer devido às AgNPs se acomodarem na separação de fases, promovendo interações interfaciais entre os polímeros, atuando como nós que restringem os sítios reativos e dificultando a passagem de gases através da membrana devido a maior quantidade de barreiras presentes. [34].

Esse ocorrido também foi verificado no trabalho de Silva, onde ao adicionar AgNPs em suas membranas de Polihidroxibutirato, também observou que ocorreu uma diminuição nos valores da permeação de vapores de água, onde este sugeriu que essa diminuição pode ter sido provocada pela presença de nanopartículas de prata nos vazios ou interstícios das amostras. [34].

Lima (2018) em seu trabalho também obteve resultados semelhantes ao adicionar nanopartículas de prata ao alginato de sódio puro e com sorbitol. A permeação de vapores de água das amostras de ALG + AgNPs e ALG + AgNPs + sorbitol foram maiores do que a permeação do alginato puro, mas foram menores do que as amostras de ALG + sorbitol, assim como foram menores do que as amostras ALG + TiNPs e ALG + TiNPs + sorbitol. [83].

Lima explicou que isso pode estar relacionado ao volume ocupado pelas nanopartículas de prata, uma vez que estas possuem um volume cerca de 9x maior do que as TiNPs e que

durante a formação dos filmes, devido a esse maior volume, acabam provocando uma maior quantidade de interações do alginato com sua superfície e compactando a matriz ao redor, diminuindo os poros que seriam gerados pelo aprisionamento de ar durante o processo de agitação da solução para homogeneização, o que acaba somando ao que foi explicado por Silva anteriormente. [83].

6.7 Avaliação da atividade microbiana

Testes de suscetibilidade microbiana pelo método de difusão em ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2005) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados para as amostras das blendas puras e dopadas com nanopartículas de prata, realizadas em triplicata para cada microrganismo em ambas as etapas para cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli derivada* ATCC 25922 com a avaliação pelo método de SANTOS *et al.* (2022) modificado. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela mensuração dos halos de inibição, em milímetros. A Tabela 7 exhibe os resultados obtidos para esse experimento neste trabalho.

Tabela 7: Resultados do teste de atividade microbiana para as membranas puras e dopadas estudadas.

Composição da Membrana	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
ALG puro	0	0
ALG 2,5% AgNPs	08 ± 1	08 ± 1
ALG 5% AgNPs	08 ± 1	10 ± 1
90/10 puro	0	0
90/10 2,5% AgNPs	08 ± 1	08 ± 1
90/10 5% AgNPs	10 ± 1	10 ± 1
75/25 puro	0	0
75/25 2,5% AgNPs	10 ± 1	08 ± 1
75/25 5% AgNPs	10 ± 1	10 ± 1

Fonte: Autor (2022).

Através dos resultados analisados através da Tabela 7, verificou-se que as membranas dopadas com AgNPs obtiveram uma maior inibição do crescimento das bactérias *staphylococcus aureus* e *escherichia coli* ao redor das amostras, formando um halo de inibição, quando comparados com as blendas puras. Além disso, o halo de inibição pode ter aumentado com o aumento da dopagem de nanopartículas na membrana, onde membranas com uma porcentagem maior de nanopartículas pode acabar liberando-as em maior quantidade no sistema durante o processo de incubação, aumentando sua eficiência quanto a um agente bactericida no meio.

Além disso, estudos mostram que uma maior presença da fibroína de seda na membrana pode acabar ajudando a aumentar o grau de inibição para a cepa de bactérias *staphylococcus aureus*. Esse resultado foi encontrado no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2019), onde estes sintetizaram Nanoestruturas de Fibroína de Seda (NTFS) e estudaram a atividade antimicrobiana destas contra algumas culturas de bactérias, incluindo as que foram estudadas neste trabalho. [88].

Após a realização dos testes, os pesquisadores verificaram que não houve concentração inibitória mínima para as cepas utilizadas, contudo para a *S. aureus* pode ter ocorrido um certo grau de inibição quando estes incorporaram um maior volume de NTFS no sistema. Isso pode ocorrer devido a estrutura da parede celular dessa bactéria ser relativamente mais simples do que as demais, formada por ligações cruzadas entre camadas de peptidoglicanos, resultando em uma parede celular mais forte, a qual acabou necessitando de um maior volume das nanoestruturas sintetizadas para ocasionar algum dano, fato que poderia ter ocorrido também no presente trabalho. [88].

Contudo, foi verificado no presente trabalho, e no tempo estudado, que dentro da margem de erro do teste não houve variações significativas nos resultados de inibição bacteriana em relação à porcentagem utilizada de nanopartículas de prata ou quanto ao aumento da proporção de fibroína de seda presente como verificado no trabalho anterior.

Talvez as interações entre as AgNPs e os polímeros presentes possam acabar retardando a liberação destas no meio, o que poderia explicar o motivo pelo qual as membranas com maior porcentagem de prata acabar tendo uma inibição semelhante às membranas com menor dopagem.

Ainda assim, através desses resultados, pode-se sugerir que as nanopartículas foram incorporadas ao material com sucesso através da metodologia utilizada e que a liberação da prata do material para o meio de cultura ocorreu como esperado e que este apresentou um resultado eficiente para a inibição bacteriostática na superfície dos filmes, podendo ser um bom

candidato para ser utilizado na área de curativos, atuando no controle de infecções no local da lesão e acelerando o processo de cicatrização do local.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo despertou o interesse da autora em estudar a atividade microbiana das membranas frente a bactérias que mais comumente acometem a pele e causam infecções bacterianas no local, como a *S. pygrnes*, e verificar se a ação das nanopartículas de prata nesse meio teria um maior impacto no processo de inibição bacteriana do que ocorreu para as bactérias estudadas no presente trabalho.

Também realizar testes mecânicos de tração nas amostras, utilizando a norma ASTM D882 (2002) – que é o método padrão para testes de propriedades de tração em membranas finas de plástico, usando uma máquina eletromecânica Instron com capacidade máxima de 30 kN. Além também de verificar se teria a possibilidade deste material vir a se tornar um produto que possa ser distribuído comercialmente no futuro.

8 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, pôde-se observar que mesmo com a adição das nanopartículas de prata ainda houve separação de fases microscópica, de forma globular para baixas porcentagens de fibroína e em forma de fibrilas maiores, como tinha sido esperado e constatado na literatura anteriormente.

Também se percebeu que a glicerina além de agir como plastificante também promove a lixiviação da superfície das membranas, deixando-as mais rugosas, o que auxilia na adesão de proteínas e células. A rugosidade também aumentou com a presença das AgNPs, onde elas podem ter se inserido nos microdomínios formados entre a separação de fases dos polímeros e formando ligações de hidrogênio entre estes.

Além disso, foi verificado pelo TGA que para a membrana de ALG, a adição de AgNPs pode ter diminuído sua estabilidade térmica, uma vez que para 5% teve a temperatura de início da degradação do polímero levemente deslocada para menores temperaturas, como uma maior porcentagem de perda de massa. Fato que não ocorreu nas blendas, que se mantiveram estáveis com a adição das AgNPs.

Também pôde-se observar que para uma maior porcentagem de fibroína, houve uma menor perda de massa, podendo indicar uma maior estabilidade da blenda e, com a adição de AgNPs, notou-se que na faixa de degradação do alginato, houve uma leve diminuição na porcentagem de perda de massa, o que pode indicar uma maior estabilidade da membrana.

Através do teste de intumescimento verificou-se que a adição de uma menor porcentagem das AgNPs para as membranas 90/10 provocou uma queda no grau de intumescimento possivelmente devido às nanopartículas atuarem como nós entre os polímeros, restringindo os sítios reativos, enquanto que uma maior porcentagem provoca um aumento no grau de intumescimento possivelmente devido à maior quantidade de nanopartículas provocarem um afastamento da sua rede polimérica ao interagir com esses polímeros, expondo os sítios ativos disponíveis para interação com a água.

Por meio dos testes de TVA e PVA verificou-se que estas estão na faixa de curativos comerciais como o curativo à base de hidrogel da Bard® e o curativo Hidrocolóide Dermiflex® da Johnson & Johnson®. Além de o teste de atividade microbiana mostrar que as nanopartículas foram incorporadas ao material com sucesso e que sua liberação no meio de cultura ocorreu como esperado, apresentando um resultado eficiente para a inibição bacteriostática na superfície dos filmes.

Conclui-se assim que as membranas produzidas baseadas em ALG e FS e dopadas com AgNPs têm potencial para ser utilizadas como material aplicável em curativo de pele dadas às características físico-química apresentadas. Destaque especial com as dopadas com a percentagem maior de AgNPs utilizadas neste estudo, que além de ter propriedade de intumescimento adequada, TVA e PVA na faixa própria de curativos comerciais já em uso e estabilidade térmica apropriada, apresentaram atividade bacteriostática adequada para uso na área. Com isso, desenvolveu-se um material promissor para o uso em tratamento, por exemplo, de feridas de pele provocada por queimaduras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W. Yang *et al.*, “Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 58–67, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.120.
- [2] S. Ghalei, J. Nourmohammadi, A. Solouk, and H. Mirzadeh, “Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 172, pp. 82–89, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.028.
- [3] S. Li, L. Li, C. Guo, H. Qin, and X. Yu, “A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: Strontium loaded Silk fibroin/Sodium alginate (SF/SA) blend films,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 969–978, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.020.
- [4] P. H. Wang, B. S. Huang, H. C. Horng, C. C. Yeh, and Y. J. Chen, “Wound healing,” *J. Chinese Med. Assoc.*, vol. 81, no. 2, pp. 94–101, 2018, doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.002.
- [5] V. Santos, E. Menoita, C. Gomes, A. S. Santos, and J. Testas, “CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS: A PARTICULARIDADE DAS FERIDAS CRÓNICAS/ESTAGNADAS,” *J. aging Innov.*, vol. 1, 2012, [Online]. Available: <http://journalofagingandinnovation.org/pt/volume-1-numero-2-2012/cicatrizacao-em-feridas/>
- [6] C. Nascimento, L. D. Hansen, M. L. Sandoval, and V. Natividade, “Tratamento de sequelas de queimadura – Estudo de caso Treatment of sequelae of burn : A case study,” *Rev Bras Queimaduras*, vol. 13, no. 4, pp. 267–270, 2015.
- [7] J. G. Powers, C. Higham, K. Broussard, and T. J. Phillips, “Wound healing and treating wounds Chronic wound care and management,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 74, no. 4, pp. 607–625, 2016, doi: 10.1016/j.jaad.2015.08.070.
- [8] O Globo, “Cientistas descobrem por que feridas demoram a cicatrizar com a idade,” 2016. <https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/cientistas-descobrem-por-que-feridas-demoram-cicatrizar-com-idade-20481120> (accessed May 05, 2019).
- [9] M. A. Mofazzal Jahromi *et al.*, “Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 123, pp. 33–64, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2017.08.001.
- [10] M. Farokhi, F. Mottaghiab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan,

- “Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings,” *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 9, pp. 907–922, 2018, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.04.004.
- [11] C. V. DA SILVA, “IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS EM CURATIVOS POLIMÉRICOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO,” UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA- ESCOLA POLITÉCNICA, 2018.
- [12] Z. Gu, H. X. Xie, C. Huang, L. Li, and X. Yu, “Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 58, pp. 121–126, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.059.
- [13] M. Michele, S. Sidney, A. Danielle, and R. Marcos, “Curativos Avançados a Base De Quitosana : Uma Alternativa Para a Cicatrização De Feridas,” pp. 266–272, 2017, doi: 10.2174/0929867324666170331123648.
- [14] A. L. R. PIRES, A. M. A. DIAS, H. C. SOUSA, M. BRAGA, and A. M. MORAES, “Análise Comparativa das Propriedades de Membranas de Quitosana e Alginato Densas e Porosas Preparadas na Presença ou Ausência do Polímero Sintético Silpuran® 2130 A/B,” pp. 13886–13893, 2015, doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1084-21134-137171.
- [15] M. A. De Moraes, M. M. Beppu, and R. F. Weska, “Blendas e compósitos compreendendo fibroína e alginato, processos de produção e produtos obtidos dos mesmos,” 2013
- [16] C. Z. Bueno, I. G. Veiga, P. S. C. Sacchetin, M. Z. Bellini, and Â. M. Moraes, *Capítulo 2 . Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais*. Campinas: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015. doi: http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0881-5_2.
- [17] A. Satish, R. Aswathi, J. Caroline Maria, and P. Sai Korrapati, “Triiodothyronine impregnated alginate/gelatin/polyvinyl alcohol composite scaffold designed for exudate-intensive wound therapy,” *Eur. Polym. J.*, vol. 110, no. July 2018, pp. 252–264, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.11.032.
- [18] C. M. Srivastava, R. Purwar, and A. P. Gupta, “Enhanced potential of biomimetic, silver nanoparticles functionalized *Antheraea mylitta* (tasar) silk fibroin nanofibrous mats for skin tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 437–453, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.255.
- [19] M. G. Mehrabani, R. Karimian, B. Mehramouz, M. Rahimi, and H. S. Kafil, “Preparation of biocompatible and biodegradable silk fibroin/chitin/silver nanoparticles 3D scaffolds as a bandage for antimicrobial wound dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*,

- vol. 114, pp. 961–971, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.128.
- [20] S. P. J. Ramontja, “Sodium alginate stabilized silver nanoparticles–silica nanohybrid and their antibacterial characteristics,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 93, pp. 712–723, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.033.
- [21] A. F. TOMAZ, “DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA DE QUITOSANA/1,4 NAFTOQUINONA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA: CURATIVO PARA FERIDAS ONCOLÓGICAS,” Universidade Federal de Campina Grande, 2017.
- [22] P. L. Gartner and L. J. Hiatt, *Tratado de histologia em cores*, 2^a ed. Philadelphia: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003.
- [23] “Anatomia papel e caneta- camadas da epiderme.” <https://anatomia-papel-e-caneta.com/sistema-tegumentar/camadas-da-epiderme/> (accessed Nov. 01, 2022).
- [24] D. Yoshito, “Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células da epiderme,” Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- [25] H. Noltenius, *Fundamentos biológicos da patologia humana*, 2^a ed. Berlin: Ed. da Universidade de São Paulo, 1977.
- [26] M. de F. G. S. Tazima, Y. A. de M. V. de A. Vicente, and T. Moriya, “Biologia da ferida e cicatrizacao,” *Simpósio: FUNDAMENTOS EM CLÍNICA CIRÚRGICA - 1^a Parte 2008; Capítulo II*, Ribeirão Preto, pp. 259–264, 2008.
- [27] M. Manela-Azulay, A. L. Filgueira, C. A. Mandarim-de-Lacerda, T. Cuzzi, and M. de A. Perez, “Vitamina C,” *Educ. Médica Contin. / Contin. Med. Educ.*, vol. 18, no. 1, pp. 265–274, 2003, doi: 10.1248/jhs1956.18.7.
- [28] J. P. Franco, “Fases da Cicatrização: inflamatória, proliferativa, maturação e mais! | Colunistas,” *Sanarmed*, 2020. <https://www.sanarmed.com/fases-da-cicatrizacao-colunistas> (accessed Jan. 24, 2023).
- [29] Wasatch Photonics, “OCT as Optical Biopsy in Dermatology.” <https://wasatchphotonics.com/applications/wound-healing-oct/> (accessed Nov. 01, 2022).
- [30] E. C. Leal and E. Carvalho, “Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico,” *Rev. Port. Diabetes*, vol. 9, no. 3, pp. 133–143, 2014.
- [31] “UNDERSTANDING THE HEALING STAGES OF A BURN WOUND,” 2022. <https://www.phoenix-society.org/resources/understanding-the-healing-stages-of-a-burn-wound> (accessed Jan. 27, 2023).
- [32] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, “Natural and synthetic polymers for wounds

- and burns dressing,” *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- [33] A. H. A. J. Martin, “Comparação de uma forma modificada de DuoDERM (DuoDERM Extra Fino) e um curativo convencional no tratamento de lacerações, abrasões e pequenas lesões cirúrgicas no departamento de acidentes e emergência,” *Acta Fisiátrica*, vol. 3, 1996, [Online]. Available: http://www.actafisiatrica.org.br/detalhe_artigo.asp?id=387
- [34] M. R. P. DA SILVA, “PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PHB/PEG/ALG-e/NPsAg E PHB/ZnO/Ag COM APLICAÇÃO BACTERICIDA,” Universidade Federal de Sergipe, 2018. doi: 10.1590/s1809-98232013000400007.
- [35] J. A. Farina-Junior, P. S. Coltro, T. S. Oliveira, F. B. Correa, and J. C. Dias-de-Castro, “Curativos de prata iônica como substitutos da sulfadiazina para feridas de queimaduras profundas : relato de caso,” *Revista Brasileira de Queimaduras*, vol. 16, no. 1, pp. 1–5, 2017.
- [36] M. T. S. Alcântara, “Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações médicas,” Universidade de São Paulo, 2013.
- [37] Maurício José Lopes Pereima, B. C. Goulart, R. R. Pereima, R. Feijó, and J. L. Freitas, “Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa,” *Revista Brasileira de Queimaduras*, vol. 12, 2013.
- [38] M. A. De Moraes, M. F. Silva, R. F. Weska, and M. M. Beppu, “Silk fibroin and sodium alginate blend: Miscibility and physical characteristics,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 40, pp. 85–91, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.03.047.
- [39] A. Boraso, M. Ciancia, and A. S. Cerezo, “Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides,” in *La Zona Costera Patagónica Argentina*, vol. 1, H. E. Zaixso and A. . Boraso, Eds. Editorial Universitaria de la Patagonia, 2015, pp. 3–60.
- [40] Y. Wang *et al.*, “A biomimetic silk fibroin/sodium alginate composite scaffold for soft tissue engineering,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. December, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep39477.
- [41] “Úlcera por Pressão / Módulo de Ensino / Tratamento.” http://www2.eerp.usp.br/site/grupos/feridasronicas/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=33 (accessed Nov. 01, 2019).
- [42] N. Bexiga, “Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico- químicas de

- hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes,” Universidade de São Paulo, 2014.
- [43] M. G. Mehrabani, R. Karimian, B. Mehramouz, M. Rahimi, and H. S. Kafil, “Preparation of biocompatible and biodegradable silk fibroin/chitin/silver nanoparticles 3D scaffolds as a bandage for antimicrobial wound dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 961–971, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.128.
- [44] J. R. Lopes, “Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina,” *Diss. (Mestrado em Eng. Mecânica), Universidade Estadual Campinas, Campinas-SP.*, p. 115, 2017.
- [45] D. P. M. BALLOTTIN, “Caracterização De Nanopartículas De Prata E Sua Aplicação Na Produção De Tecidos Antimicrobianos Campinas 2014,” 2018. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2019.01.007.
- [46] C. E. A. dos Santos, “SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS APLICAÇÕES EM BIOLOGIA,” Universidade Federal de Alagoas, 2015. [Online]. Available: 3/Record/com.mandumah.search://http
- [47] G. Moreno-Martin, M. E. León-González, and Y. Madrid, “Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV–vis spectrophotometry and chemometrics tools,” *Talanta*, vol. 188, no. June, pp. 393–403, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.06.009.
- [48] J. F. L. Santos, M. J. L. Santos, A. Thesing, F. Tavares, J. Griep, and M. R. F. Rodrigues, “RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO E APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES E CÉLULAS SOLARES,” *Quim. Nova*, vol. 39, no. 9, pp. 1098–1111, 2016, [Online]. Available: <https://doaj.org/article/32a7399da9c44d738d975857789cd479>
- [49] R. M. Elnoby, M. H. Mourad, S. L. H. Elnaby, and M. T. H. Abou Kana, “Monocrystalline solar cells performance coated by silver nanoparticles: Effect of NPs sizes from point of view Mie theory,” *Opt. Laser Technol.*, vol. 101, pp. 208–215, 2018, doi: 10.1016/j.optlastec.2017.11.019.
- [50] G. R. S. Andrade, C. C. Nascimento, Z. M. Lima, E. Teixeira-Neto, L. P. Costa, and I. F. Gimenez, “Star-shaped ZnO/Ag hybrid nanostructures for enhanced photocatalysis and antibacterial activity,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 399, pp. 573–582, 2017, doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apsusc.2016.11.202>.
- [51] I. Niskanen *et al.*, “Determination of nanoparticle size using Rayleigh approximation

- and Mie theory,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 201, pp. 222–229, 2019, doi: 10.1016/j.ces.2019.02.020.
- [52] T. R. CARDOSO, “APLICABILIDADE DE CURATIVOS A BASE DE HIDROGEL COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM LESÃO POR PRESSÃO,” Universidade de São Paulo, 2017.
- [53] M. M. P. Silva *et al.*, “Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas : revisão sistemática,” *Rev. da Esc. Enferm. da USP*, pp. 1–10, 2017.
- [54] M. Mohseni *et al.*, “A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 564, pp. 350–358, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.068.
- [55] K. Nešović *et al.*, “Chitosan-based hydrogel wound dressings with electrochemically incorporated silver nanoparticles – In vitro study,” *Eur. Polym. J.*, vol. 121, no. July, p. 109257, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109257.
- [56] S. B. Balakrishnan and S. Thambusamy, “Preparation of silver nanoparticles and riboflavin embedded electrospun polymer nanofibrous scaffolds for in vivo wound dressing application,” *Process Biochem.*, 2019, doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.033.
- [57] W. Ying, J. Tan, C. Chen, T. Sun, S. Wang, and M. S. Zhang, “Biofabrication of silver nanoparticles and its application for development of wound dressing system in nursing care for burn injuries in children,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 54, no. August, p. 101236, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101236.
- [58] M. Kasithevar *et al.*, “Green synthesis of silver nanoparticles using *Alysicarpus monilifer* leaf extract and its antibacterial activity against MRSA and CoNS isolates in HIV patients,” *J. Interdiscip. Nanomedicine*, vol. 2, no. 2, pp. 131–141, 2017, doi: 10.1002/jin2.26.
- [59] S. Pang *et al.*, “Toxicity of silver nanoparticles on wound healing: A case study of zebrafish fin regeneration model,” *Sci. Total Environ.*, vol. 717, p. 137178, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137178.
- [60] L. N. Xu, H. X. Wang, and L. Zhao, “Biosynthesis of AgNPs and their effective wound healing activity in nursing care in children after surgery,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1–5, 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101425.
- [61] Y. Nie *et al.*, “UV-induced over time transformation of AgNPs in commercial wound dressings and adverse biological effects on *Caenorhabditis elegans*,” *NanoImpact*, vol. 17, no. September 2019, 2020, doi: 10.1016/j.impact.2019.100193.
- [62] N. Durán, W. Rolim, M. Durán, W. Fávaro, and A. Seabra, “Nanotoxicologia De

- Nanopartículas De Prata: Toxicidade Em Animais E Humanos,” *Quim. Nova*, vol. 42, no. 2, pp. 206–213, 2018, doi: 10.21577/0100-4042.20170318.
- [63] ASTM E 2180-07, “ASTM E 2180-07 (2012) Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) in Polymeric or Hydrophobic Materials,” *Mermet*, vol. 60014, no. 815, pp. 3–5, 2012.
- [64] A. Kolev, V. Vassileva, and H. Georgiev, “INTERACTION BETWEEN FIBROIN AND ALGINATE IN THE CORRESPONDING BLENDED FILMS,” *J. Chem. Technol. Metall.*, vol. 52, no. 3, pp. 449–456, 2017.
- [65] M. Rahimi, R. Ahmadi, H. Samadi Kafil, and V. Shafiei-Irannejad, “A novel bioactive quaternized chitosan and its silver-containing nanocomposites as a potent antimicrobial wound dressing: Structural and biological properties,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, no. March, pp. 360–369, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.092.
- [66] H. Kaygusuz, E. Torlak, G. Akin-Evingür, İ. Özen, R. von Klitzing, and F. B. Erim, “Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 1161–1165, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.144.
- [67] M. A. De Moraes and M. M. Beppu, “Biocomposite membranes of sodium alginate and silk fibroin fibers for biomedical applications,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 130, no. 5, pp. 3451–3457, 2013, doi: 10.1002/app.39598.
- [68] L. M. Lopes, M. A. De Moraes, and M. M. Beppu, “Study of phase separation in blends of silk fibroin and sodium alginate.” 2018.
- [69] M. Khatami, R. S. Varma, N. Zafarnia, H. Yaghoobi, M. Sarani, and V. G. Kumar, “Applications of green synthesized Ag, ZnO and Ag/ZnO nanoparticles for making clinical antimicrobial wound-healing bandages,” *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 10, no. August, pp. 9–15, 2018, doi: 10.1016/j.scp.2018.08.001.
- [70] Y. Qin, X. Ji, J. Jing, H. Liu, H. Wu, and W. Yang, “Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 372, no. 1–3, pp. 172–176, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.013.
- [71] R. G. De Paiva, “OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS MULTICAMADAS DE QUITOSANA E ALGINATO CONTENDO COBRE,” 2009.
- [72] J. C. B. Almeida, S. M. Palácio, L. K. Ferreira, M. T. M. Deon, E. A. Campos, and K. C. Kerber, “Síntese e caracterização de nanopartículas de prata,” 2015.
- [73] K. Ranozek-Soliwoda *et al.*, “The synthesis of monodisperse silver nanoparticles with plant extracts,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 177, pp. 19–24, 2019. doi:

- 10.1016/j.colsurfb.2019.01.037.
- [74] H. I. Badi'ah, F. Seede, G. Supriyanto, and A. H. Zaidan, "Synthesis of Silver Nanoparticles and the Development in Analysis Method." 2019.
 - [75] Z. H. Farooqi *et al.*, "Facile synthesis of silver nanoparticles in a crosslinked polymeric system by in situ reduction method for catalytic reduction of 4-nitroaniline." 2018.
 - [76] F. S. Antunes, N. Dal'Acqua, C. P. Bergmann, and M. Giovanela, "Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos." 2013.
 - [77] B. R. KÖENE, "SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MISTAS DE PRATA E PLATINA ANCORADAS EM SUBSTRATO DE SÍLICA VISANDO POSTERIOR APLICAÇÃO EM SENSORES ÓPTICOS," 2019.
 - [78] T. C. Mokhena and A. S. Luyt, "Electrospun alginate nanofibres impregnated with silver nanoparticles: Preparation, morphology and antibacterial properties," *Carbohydrate Polymers*, vol. 165. pp. 304–312, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.068.
 - [79] N. Lin *et al.*, "Engineering of Fluorescent Emission of Silk Fibroin.pdf." 2015.
 - [80] L. Wang, C. Lu, B. Zhang, B. Zhao, F. Wu, and S. Guan, "Fabrication and Characterization of Flexible Organic Field-Effect Transistors.," no. V. p. 2014, 2014.
 - [81] W. Lan *et al.*, "Investigation of ultrasonic treatment on physicochemical, structural and morphological properties of sodium alginate/AgNPs/apple polyphenol films and its preservation effect on strawberry," *Polymers (Basel)*., vol. 12, no. 9, 2020, doi: 10.3390/POLYM12092096.
 - [82] P. P. Patil, R. A. Bohara, J. V. Meshram, S. G. Nanaware, and S. H. Pawar, "Hybrid chitosan-ZnO nanoparticles coated with a sonochemical." 2018.
 - [83] T. Lima, "Aplicação de nanopartículas de prata e titânio na melhoria das propriedades de filmes de alginato de sódio para uso em curativos," Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho," 2018.
 - [84] N. Eghbalifam, M. Frounchi, and S. Dadbin, "Antibacterial silver nanoparticles in polyvinyl alcohol sodium alginate blend produced by gamma irradiation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 170–176, 2015.
 - [85] R. Eivazzadeh-Keihan, F. Radinekiyan, H. Madanchi, H. A. M. Aliabadi, and A. Maleki, "Graphene oxide/alginate/silk fibroin composite as a novel bionanostructure with improved blood compatibility, less toxicity and enhanced mechanical properties." 2020.

- [86] M. Yadollahi, S. Farhoudian, and H. Namazi, “One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 37–43, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.032.
- [87] M. S. Pacheco, G. E. Kano, L. A. Paulo, P. S. Lopes, and M. A. De Moraes, “Silk fibroin/chitosan/alginate multilayer membranes as a system for controlled drug release in wound healing.” 2019.
- [88] J. de P. Rodrigues, L. O. C. Rezende, and I. J. B. Santos, “ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOESTRUTURAS DE FIBROÏNA DE SEDA,” *Higiene Alimentar*, Maceió, pp. 2131–2135, Apr. 2019.