



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GIOVANA MARIA GENEVRO

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS MICROESTRUTURADOS A PARTIR DE
BIOPOLÍMEROS PARA OBTENÇÃO DE CURATIVOS DE ALTO DESEMPENHO**

CAMPINAS

2017

GIOVANA MARIA GENEVRO

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS MICROESTRUTURADOS A PARTIR DE
BIOPOLÍMEROS PARA OBTENÇÃO DE CURATIVOS DE ALTO DESEMPENHO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Marisa Masumi Beppu

Coorientadora: Dra. Mariana Agostini de Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GIOVANA MARIA GENEVRO, E ORIENTADA PELA PROFESSORA DOUTORA MARISA MASUMI BEPPU.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/18958-6; CAPES, 33003017034P8 e 8034/14-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

G286d Genevro, Giovana Maria, 1988-
Desenvolvimento de materiais microestruturados a partir de biopolímeros para obtenção de curativos de alto desempenho / Giovana Maria Genevro. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.

Coorientador: Mariana Agostini de Moraes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Membranas. 2. Biopolímeros. 3. Biomateriais. I. Beppu, Marisa Masumi, 1972-. II. Moraes, Mariana Agostini de, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of microstructured materials using biopolymers for high performance dressings

Palavras-chave em inglês:

Membranes

Biopolymers

Biomaterials

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Classius Ferreira da Silva

Mariana Altenhofen da Silva

Patrícia Santos Lopes

Data de defesa: 11-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Giovana Maria Genevro e aprovada em 11 de julho de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof.^a Dr.^a Marisa Masumi Beppu

Prof.^a Dr.^a Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia

Prof. Dr. Classius Ferreira da Silva

Prof.^a Dr.^a Mariana Altenhofen da Silva

Prof.^a Dr.^a Patrícia Santos Lopes

A Ata da Defesa consta no processo de vida acadêmica da aluna.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais, Lovani e Carlos, por sempre acreditarem no meu potencial e apoiarem minhas decisões. Aos meus queridos irmãos, Thaisa e Zeca, pela amizade e orientações de vida que indiretamente me concedem. Aos meus amados sobrinhos, João Carlos e Lavínia, por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Ao Fer, pela ajuda constante, amor e compreensão.

À professora Dra. Marisa Masumi Beppu, pela oportunidade concedida, pelos esclarecimentos e orientação, pela dedicação e exemplo de profissional que és. À professora Dra. Mariana Agostini de Moraes, pela amizade e orientação constante e dedicada.

Aos meus prezados amigos de laboratório, Cynthia, Laise, JB, Roger, Thiago, Bruno C., Reginaldo, Bruno T, Ju, Kleber, Luciana, João H., Marcele, Carla e Kleber pela amizade, auxílio, discussões, críticas e pelos momentos alegres proporcionados. Roger, você é uma inspiração para mim, exemplo de profissional comprometido e dedicado.

Aos amigos de longa data, Ka, Karol, Pa, Sidi e em especial a Mayara e o Alan, que estiveram dispostos a dividir comigo o dia a dia na casa 93. Obrigada pela amizade, companheirismo, e por todos os momentos alegres vividos.

Ao Professor Fernando Jorge Monteiro, pela oportunidade de desenvolver pesquisa em colaboração com seu grupo na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, és um ser humano admirável, sempre disposto e educado. À professora Maria Helena Fernandes, por abrir as portas do seu laboratório e permitir que realizasse os experimentos com células. Aos colegas do estágio doutoral na Universidade do Porto, Marta L., Hugo, Ima, Eduardo, Liliana, José Carlos, Ivana, Cristina, Agnelo e em especial a Marta e a Angela, pela amizade, auxílio nos experimentos e por terem feito minha estada em Portugal mais alegre. Aos colegas e funcionários do INEB, pelos conhecimentos compartilhados e serviços técnicos prestados.

Aos professores, Dr. Marcos Akira, Dra. Mariana Altenhofen e Dra. Ângela Maria Moraes, pelas participações nas bancas de qualificação, pelas críticas, sugestões e ensinamentos. Com certeza agregaram muito ao trabalho.

À professora Dra. Patrícia Lopes, por tornar possível a realização dos ensaios biológicos na Universidade Federal de São Paulo. Muito obrigada pela colaboração, tanto prática quanto teórica.

À equipe do LRAC, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

A todos os colegas, funcionários da Faculdade de Engenharia Química que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, processo nº 2013/18958-6, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Geraldo Eustáquio de Souza)

RESUMO

A recuperação de feridas crônicas, que apresentam complicações e demandam tempo elevado para a cicatrização é ainda um desafio para a medicina, pois geralmente são processos custosos e que em alguns casos resultam na amputação do membro lesionado. O desenvolvimento de curativos que combinem todas as necessidades, tais como manutenção do leito da ferida úmido e ao mesmo tempo a remoção do excesso de exsudato, além de proteger a ferida de infecções secundárias, é um tema atual. Neste estudo foram preparadas membranas assimétricas para uso como curativos. Membranas assimétricas apresentam características atrativas para a cicatrização de feridas, onde a camada porosa atua na drenagem do excesso de exsudato da ferida e a camada densa (película superior) controla a passagem de micro-organismos e evita a perda excessiva de água para o meio, mantendo assim a umidade necessária para a recuperação do tecido lesionado. Em um primeiro momento, foram preparadas membranas assimétricas por inversão de fases. Nesse processo, foram investigados os polímeros naturais quitosana (CHI) e glucomanana de konjac (KGM). Os polímeros foram combinados em camadas, sendo que a membrana KGM/CHI apresentou uma estrutura assimétrica bem definida, bastante interessante para a aplicação em questão. Porém, essa membrana apresentou baixa resistência mecânica, rompendo-se ao ser manuseada, o que dificulta o seu uso como curativos. Na sequência, desenvolveu-se um procedimento para a obtenção de membranas assimétricas de KGM e fibroína de seda (SF). Secagem parcial e congelamento foram utilizados para o preparo dos curativos. Membranas contendo SF apresentaram propriedades biológicas similares às membranas de KGM puras, e por apresentarem manipulação mais complexa, deu-se preferência pelas membranas puras de KGM. Estas se apresentaram maleáveis, resistentes ao manuseio, com excelente porcentagem de alongamento, taxa de transmissão de vapor de água e drenagem de fluidos adequada e dentro da faixa de curativos comerciais. Além disso, não apresentaram citotoxicidade e foram capazes de impedir a invasão microbiana. Foi possível então obter um material com propriedades adequadas para uso como curativos.

Palavras-chave: Curativos, membranas assimétricas, polímeros naturais, biomateriais, glucomanana de konjac, engenharia tecidual.

ABSTRACT

The recovery of chronic wounds, which present complications and require long periods for healing is still a challenge for medicine, since they are usually costly processes and in some cases, result in amputation of the injured limb. The development of dressings that combine all the needs, such as maintenance of the wet wound bed and at the same time remove excess exudate, besides protecting the wound from secondary infections is a current theme. In this study, asymmetric membranes were prepared for use as dressings. Asymmetric membranes present interesting characteristics for wound healing. The porous layer acts on the drainage of excess wound exudate and the dense layer (upper film) controls the passage of microorganisms and prevents the excessive loss of water to the medium, thus maintaining the moisture required for recovery of the injured tissue. At first, asymmetric membranes were prepared by phase inversion. In this process, the natural polymers chitosan (CHI) and konjac glucomannan (KGM) were investigated. The polymers were combined in layers, and the KGM/CHI membrane presented a well-defined asymmetric structure, which was very interesting for the desired application. However, this membrane presented low mechanical resistance, breaking at handling, which limit its use as dressings. Subsequently, a procedure was developed to obtain asymmetric membranes of KGM and silk fibroin (SF). Partial drying and freezing were used to prepare the dressings. Membranes containing SF had biological properties similar to the pure KGM membranes, and because they presented more complex manipulation, preference was given to pure KGM membranes. These were malleable, resistant to handling, with excellent percentage of elongation, adequate water vapour transmission rate and fluid handling capacity and within the range of commercial dressings. In addition, they were not cytotoxic and could prevent microbial invasion. Then, it was possible to obtain a material with properties suitable for use as wound dressings.

Key words: Dressings, asymmetric membranes, natural polymers, biomaterials, konjac glucomannan, tissue engineering

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das possíveis funções de membranas assimétricas como curativo. Adaptado de Morgado <i>et al.</i> (2015).	26
Figura 2 – Estrutura molecular da KGM. Adaptado de Alonso-Sande <i>et al.</i> (2009).	29
Figura 3 – Efeitos da adição de álcali na estrutura da KGM. Adaptado de Luo <i>et al.</i> (2013).	32
Figura 4 - Estrutura molecular da CHI. Fonte: Suh e Matthew (2000).	33
Figura 5 – Estrutura primária da fibroína de seda. Fonte: Nogueira, 2005.	35
Figura 6 – Esquema do aparato utilizado para o teste de transmissão de vapor de água.	43
Figura 7 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de fluido das membranas. Adaptado de Kimura <i>et al</i> (2016).	52
Figura 8 – Fotos das membranas de KGM do planejamento experimental.	63
Figura 9 – Micrografias de membranas de a) CHI (fratura) e b) KGM (superfície) submetidas ao congelamento.	65
Figura 10 – Micrografias da fratura e superfícies de membranas KGM/CHI.	66
Figura 11 – Micrografias da a) fratura, b) superfície de fundo e c) superfície de topo das membranas CHI/KGM.	67
Figura 12 – Aspecto das soluções (vista inferior de placas de petri) de KGM com fios de SF a) moídos e b) moídos e separados manualmente.	70
Figura 13 – Fotografia da membrana contendo 100% de KGM.	71
Figura 14 - Micrografias de membranas de a) e b) 100% KGM, c) e d) 75% KGM e 25% SF, e) e f) 50% KGM e 50% SF. As imagens a), c) e e) referem-se às superfícies de topo das membranas e as demais, às faces inferiores (fundo).	73
Figura 15 – Imagens de microscopia confocal das membranas de KGM 100% nos dias (a) 1 e (b) 4 de cultura celular.	76

Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica da cultura celular nos dias (a) 1 e (b) 4 nas membranas 100% KGM.	76
Figura 17 – Micrografias de membranas de KGM sem a etapa de congelamento da a) superfície de fundo e topo e b) fratura.	78
Figura 18 – Micrografias de membranas de KGM tratadas com etanol 70% e não tratadas. Imagens das superfícies de topo e fundo e fraturas.....	79
Figura 19 – Micrografias da superfície de fundo de membranas de KGM não tratadas com etanol.	80
Figura 20 - Difratoformas de raios X para as membranas de KGM não tratadas e tratadas com etanol 70%.	82
Figura 21 - Espectros de infravermelho para as membranas de KGM tratadas com etanol 70% e não tratadas.	83
Figura 22 – Comportamento térmico da membrana assimétrica de KGM a) não tratada e b) tratada com etanol 70%.	85
Figura 23 – Viabilidade celular das membranas assimétricas de KGM.....	89
Figura 24 – Fotografias dos frascos contendo os controles positivo e negativo para o teste de permeação microbiana, em duplicata.	92
Figura 25 – Imagens do sistema contendo membranas assimétricas de KGM submetidas ao teste de permeação microbiana, em quadruplicata.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor comercial de alguns curativos de alto desempenho.....	25
Tabela 2 – Propriedades atrativas para o desenvolvimento de curativos dos biopolímeros CHI, KGM e SF.....	28
Tabela 3 – Tabela de níveis dos fatores estudados no processo de formação de membranas de KGM e CHI.	41
Tabela 4 – Classificação da atividade antimicrobiana de acordo com o tamanho do halo de inibição do crescimento microbiano (Girata, 2011).	50
Tabela 5 – Resultados de espessura e propriedades mecânicas das membranas de CHI preparadas de acordo com o planejamento experimental.	57
Tabela 6 – Tabela de efeitos para espessura das membranas de CHI.	58
Tabela 7 – Tabela de efeitos para resistência à tração das membranas de CHI.	59
Tabela 8 – Tabela de efeitos para % alongamento das membranas de CHI.....	59
Tabela 9 – Resultados de grau de encolhimento e descrição das membranas de KGM preparadas de acordo com o planejamento experimental.	61
Tabela 10 – Tabela de efeitos para encolhimento das membranas de KGM.	62
Tabela 11 – Resultados da proliferação celular nas membranas de KGM 100%, KGM 75% - SF 25% e KGM 50% - SF 50%.	74
Tabela 12 – Valores de intensidade de fluorescência das amostras e do controle no primeiro e no quarto dia de cultura celular.	75
Tabela 13 – Resultados do teste de resistência à tração das membranas assimétricas de KGM tratadas com etanol e não tratadas.	81
Tabela 14 – Taxa de transmissão de vapor de água das membranas assimétricas de KGM....	86
Tabela 15 – Propriedades de drenagem de fluido das membranas de KGM.....	88

Tabela 16 – Atividade antimicrobiana das membranas assimétricas de KGM.....91

Tabela 17 – Resultados das amostras versus o tempo de análise93

ABREVIACÕES

α -MEM – Meio de cultura de Eagle modificação alfa

CHI – Quitosana

CHO - células de ovário de hamster chinês

DRX – Difração de raios X

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EtOH – Etanol

FHC – *Fluid Handling Capacity*

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

IPEN – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares

KGM – Glucomanana de konjac

PBS – Tampão fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

SEF – Fluido de exsudato simulado

SF – Fibroína de seda

SFB – Soro fetal bovino

SUS – Sistema único de saúde

T – Temperatura

TGA – Análise termogravimétrica

TSA – Ágar tríptico de soja

TSB – Caldo de soja tripticaseína.

TVA – Taxa de transmissão do vapor de água

MVTR – *Moist Vapour Transmission Rate*

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
ABREVIACOES	154
SUMÁRIO.....	165
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Feridas crônicas e curativos de alto desempenho	22
3.2 Membranas assimétricas.....	25
3.3 Polímeros naturais	27
3.3.1 Glucomanana	28
3.3.3.1 Mecanismo de gelificao da KGM.....	31
3.3.2 Quitosana	32
3.3.3 Fibroína de seda	34
3.4 Técnicas para preparo de curativos microestruturados com polímeros naturais	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Preparo de membranas assimétricas obtidas por inversão de fases.....	40
4.1.1 Preparo das soluçoes de CHI e KGM	40
4.1.2 Preparo de membranas de KGM e CHI puras	40
4.1.2.1 Preparo de membranas de KGM e CHI puras utilizando congelamento	41

4.1.3	Preparo de membranas de KGM e CHI em camadas utilizando congelamento	42
4.1.4	Caracterização das membranas	43
4.1.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.1.4.2	Taxa de transmissão de vapor de água	43
4.1.4.3	Ensaio mecânicos.....	44
4.2	MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS OBTIDAS POR SECAGEM PARCIAL E CONGELAMENTO	45
4.2.1	Preparo das fibras de SF	45
4.2.2	Preparo das soluções de SF e KGM.....	45
4.2.3	Métodos de preparo das membranas assimétricas	46
4.2.4	Avaliação da influência do tratamento das membranas com etanol 70%.....	46
4.2.5	Caracterização das membranas	47
4.2.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
4.2.5.2	Testes biológicos	47
4.2.5.2.1	Citotoxicidade indireta	47
4.2.5.2.2	Citotoxicidade direta	48
4.2.5.2.3	Atividade antimicrobiana	50
4.2.5.2.4	Permeação microbiana.....	50
4.2.5.3	Permeabilidade ao vapor de água.....	51
4.2.5.4	Avaliação da capacidade de drenagem de fluido	51
4.2.5.5	Ensaio mecânicos.....	53
4.2.5.6	Difração de raios X (DRX)	53
4.2.5.7	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)	53
4.2.5.8	Análises térmicas.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5.1 Membranas assimétricas obtidas por inversão de fases.....	55
5.1.1 Membranas de KGM e CHI puras	55
5.1.2 Membranas de KGM e CHI puras utilizando congelamento.....	64
5.1.3 Membranas de KGM e CHI em camadas utilizando congelamento.....	65
5.1.3.1 Caracterizações físicas	67
5.1.4 Conclusão parcial.....	69
5.2 Membranas assimétricas obtidas por secagem parcial e congelamento	69
5.2.1 Membranas assimétricas de KGM e SF.....	69
5.2.1.1 Citotoxicidade direta	74
5.2.2 Membranas assimétricas 100% KGM	77
5.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	77
5.2.2.2 Análises mecânicas	80
5.2.2.3 Difração de Raios X (DRX).....	82
5.2.2.4 FTIR	83
5.2.2.5 Análises Térmicas	84
5.2.2.6 Propriedades de barreira.....	86
5.2.2.7 Testes biológicos	89
5.2.2.7.1 Citotoxicidade indireta	89
5.2.2.7.2 Atividade antimicrobiana	90
5.2.2.7.3 Permeação microbiana.....	91
5.2.3 Conclusão parcial.....	93
6 CONCLUSÃO.....	94
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	96
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas crônicas, como úlceras de pés de diabéticos e queimaduras graves, ainda é um desafio. Já está estabelecido que este tipo de ferida deve ser coberta por biomateriais adequados para que haja um ambiente favorável à cicatrização, evitando qualquer contaminação e/ou infecção neste período, além de fornecer condições adequadas de hidratação, minimizando assim a dor do paciente (Mulder *et al.*, 2003; Jannesari *et al.*, 2011).

Uma das enfermidades mais comuns, principalmente entre as pessoas mais velhas, é o diabetes. Em 2010, foi estimado que 285 milhões de pessoas adultas no mundo eram diabéticas sendo que a projeção para 2030 é de 439 milhões de pessoas (Shaw *et al.*, 2010; Whiting *et al.*, 2011). No Brasil, aproximadamente 5,6% dos adultos são diabéticos (Vigitel, 2011).

Uma das complicações oriundas dessa doença é a presença de ulceração nos pés, pois o diabetes provoca problemas circulatórios e de cicatrização. Cerca de 15% dos diabéticos sofrem com esse problema durante algum momento da vida, sendo que em 70% dos casos ocorrem recorrência e, frequentemente, resultam em amputação (Anselmo *et al.*, 2010).

A “terceira idade” é uma fase da vida na qual as pessoas ficam mais susceptíveis às enfermidades, pois a capacidade funcional do nosso organismo diminui lentamente com o passar do tempo. Fatores como o tabagismo, sedentarismo, obesidade e estresse aceleram a perda da reserva da capacidade funcional. Logo, a necessidade de estudos para se aprimorar a medicina e áreas afins torna-se premente para garantir que as pessoas tenham saúde e qualidade de vida (Sulander, 2011; Ceschin *et al.*, 2012). Segundo o IBGE (2011a), a expectativa de vida dos brasileiros aumentou cerca de 3 anos na última década, passando de 70,4 anos em 2000 para 73,5 anos em 2010. Segundo a projeção, a expectativa de vida dos brasileiros continuará aumentando, podendo ultrapassar os 80 anos em 2050 (IBGE, 2008). A população brasileira com 65 anos ou mais representa 7,4% da população, sendo que nas regiões sul e sudeste o índice de envelhecimento é maior, representando 8,1% da população (IBGE, 2011b).

Queimaduras graves são outro tipo de lesões que requerem atenção, pois levam milhões de pessoas a óbito todos os anos devido, principalmente, à perda da integridade da pele

e à invasão microbiana (Lugão e Araki, 2016). No ano de 2015, o SUS realizou 162.421 procedimentos ambulatoriais e 13.133 procedimentos hospitalares relacionados à assistência ao paciente com queimaduras, um valor gasto superior a 40 milhões de reais (Ministério da saúde, 2015).

Neste contexto, nesse trabalho buscou-se desenvolver curativos de alto desempenho, constituídos de membranas biopoliméricas microestruturadas, que apresentem bom desempenho funcional, biocompatibilidade e propriedades mecânicas desejáveis, para tratar feridas crônicas em geral.

Os polímeros naturais são muito interessantes para aplicação como curativos, pois são geralmente biocompatíveis, têm a capacidade de estimular o crescimento dos tecidos biológicos, são geralmente compostos por moléculas presentes na matriz extracelular e, portanto, interagem naturalmente com as células. Além disso, são obtidos de fontes renováveis, não apresentando riscos ao meio ambiente (Abramson *et al.*, 2004; Velema e Kaplan, 2006). Dentre os polímeros naturais, a quitosana, a glucomanana e a fibroína de seda apresentam propriedades interessantes para a confecção de curativos de alto desempenho para feridas crônicas.

A combinação de polímeros é uma técnica que permite a obtenção de materiais com propriedades mais próximas das ideais, pois é uma forma de unir as qualidades e minimizar as falhas dos mesmos.

Materiais microestruturados são materiais que apresentam diversas fases, onde cada fase (ou microestrutura) desempenha uma função específica, como melhor resistência mecânica, biocompatibilidade ou possibilidade de funcionalização específica, adicionando propriedades favoráveis ao material original.

Membranas assimétricas são exemplos de materiais microestruturados. Cada face de uma membrana assimétrica apresenta uma microestrutura específica, de modo que cada uma pode desempenhar papel importante na cicatrização de feridas. A face porosa é responsável por drenar o excesso de fluido do leito da ferida e a parte densa serve como barreira aos micro-organismos e à perda excessiva de água, mantendo a umidade necessária para auxiliar no processo de regeneração do tecido lesionado.

Neste estudo foram utilizados os polímeros fibroína de seda, quitosana e glucomanana. Estes materiais são oriundos de fontes renováveis. A quitosana e a fibroína de seda podem ser extraídas de rejeitos da indústria de pescado e têxtil, respectivamente, e a glucomanana, extraída de tubérculos, sendo possível por meio de sua combinação obter um produto ecologicamente correto.

O foco deste trabalho foi obter um material altamente hidratável, pois a umidade é um dos fatores primordiais para a recuperação de lesões, flexível e ao mesmo tempo resistente, que fosse capaz de evitar infecções secundárias, e viabilizasse a ocorrência de condições favoráveis à cicatrização em geral.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi a obtenção e caracterização de membranas assimétricas de polímeros naturais, que possam ser usados como curativos de alto desempenho. Como método de obtenção, foram explorados os processos de formação de membranas assimétricas, por inversão de fases, secagem parcial e congelamento, combinando os biopolímeros glucomanana com quitosana e glucomanana com fibroína de seda.

Objetivos específicos

- Definição da metodologia de obtenção de membranas assimétricas de biopolímeros;
- Caracterização do material quanto à morfologia (formação de faces distintas) e tamanho de poros e a relação dessas características com a capacidade de troca gasosa e resistência mecânica;
- Avaliação da capacidade de atuação como barreira à permeação de micro-organismos e interação com células.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Feridas crônicas e curativos de alto desempenho

As feridas podem ser classificadas pelas estruturas comprometidas. Denominam-se feridas superficiais as lesões limitadas à epiderme, feridas com perda parcial para aquelas que atingem a parte superior da derme e perda total para as que extrapolam a derme, atingindo tecidos subcutâneos ou até lesões mais profundas. Outra classificação se dá pelo tempo de recuperação, sendo classificadas como agudas as feridas que são reparadas em tempo adequado, sem complicações, e em crônicas as que demandam tempo superior ao esperado e que apresentam complicações (Santos, 2000).

Existem vários fatores que interferem no processo de cicatrização, como possíveis infecções, vascularização inadequada, doenças sistêmicas, falta de proteínas e vitaminas e idade elevada. Esses fatores são agravantes que normalmente estão associados às feridas crônicas (Santos, 2000). Úlceras de pés de diabéticos, por exemplo, podem ficar abertas por vários anos.

Uma maneira de viabilizar o processo fisiológico de reparação de um tecido, que é um processo sistêmico, é através de terapias tópicas. A terapia tópica tem a finalidade de identificar e eliminar infecções, auxiliar na remoção de tecidos necróticos, manter o leito da ferida úmido, mas absorver o excesso de exsudato, proteger a ferida de invasões bacterianas e regular a temperatura (Blanes, 2004).

Na terapia tópica, os curativos recebem bastante atenção, pois eles desempenham um papel importante na reconstituição tissular.

Até meados de 1962, as pesquisas sobre curativos e cicatrização de feridas foram um tanto negligenciadas. Supunha-se, anteriormente, que a cicatrização de feridas era mais rápida e eficiente, se fosse mantida seca e sem cobertura. Esta especulação foi assumida até estabelecer-se os requisitos ideais para materiais utilizados na cicatrização de feridas (Kamoun *et al.*, 2017).

O trabalho pioneiro sobre uso de filmes para tratar feridas (curativos) revelou que a reparação epitelial da pele de porcos feridos, foi pelo menos duas vezes maior comparado com as feridas expostas ao ar, e descobriu-se que, no caso de curativos secos, uma crosta pode cobrir toda a área da ferida, diminuindo a taxa de epitelização, inibindo a cicatrização (Winter, 1962

apud Kamoun *et al.*, 2017). A partir de então, os estudos e pesquisas sobre o desenvolvimento de curativos de feridas foram intensificados. Sugerindo que curativos ideais devem manter um ambiente úmido e evitar infecção bacteriana para acelerar a regeneração de tecidos (Kamoun *et al.*, 2017).

Um curativo ideal para feridas deve manter um ambiente úmido absorvendo os exsudatos da ferida, proteger a ferida de infecções secundárias, fornecer trocas gasosas adequadas, regular e/ou mediar a liberação de fatores de crescimento e citocinas e também ser elástico, biocompatível, não tóxico e não antigênico (Ahamed *et al.*, 2015). Dentre as características desejadas de um curativo de alto desempenho, a manutenção da umidade se destaca, pois previne a desidratação do tecido e morte celular e favorece o desbridamento autolítico, que é um processo que utiliza os próprios leucócitos e enzimas para a degradação do tecido necrótico. O meio úmido protege as terminações nervosas do ressecamento e exposição, o que está diretamente relacionado com a dor. Além disso, a umidade mantém as células viáveis, fazendo com que as mesmas liberem fatores de crescimento, estimulando sua proliferação (Field e Kerstein, 1994; Blanes, 2004).

Diferentes tipos de curativos já foram estudados, tais como hidrocolóides, hidrogéis, espumas e filmes, conforme descrito abaixo.

- Os hidrocolóides quando em contato com a área exsudativa da ferida formam um gel, gerando um ambiente úmido favorável ao desbridamento, semipermeável à água e ao oxigênio. Porém, em feridas muito exsudativas a umidade pode ser excessiva, aumentando o risco de infecções secundárias (Hilton *et al.*, 2004; McIntosh, 2007).

- Hidrogéis são os sistemas mais indicados para a manutenção da umidade alta. São flexíveis, facilmente removidos e necessitam de uma cobertura secundária (que fixa o curativo primário) (Hilton *et al.*, 2004; Fonder *et al.*, 2008). Hidrogéis de polímeros sintéticos como Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e Poli(álcool vinílico) (PVA), por exemplo, reticulados por radiação gama desenvolvidos pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), foram testados em pacientes com queimaduras e também em pacientes com úlceras e os resultados foram satisfatórios, principalmente aqueles com adição de prata e nanopartículas de papaína no caso de úlceras. Esses hidrogéis foram considerados vantajosos em relação aos curativos tradicionais, visto que dispensam uso de outros fármacos, reduzem o número de trocas de curativos e possuem maior eficiência, diminuindo o tempo de tratamento (Feola, 2013).

- Espumas são destinadas a absorver o exsudato, podem ser mantidas em contato com a ferida por mais de sete dias, são facilmente conformadas na superfície do corpo, indicadas para feridas exsudativas (Weller e Sussman, 2006).

- Filmes (películas bidimensionais) são curativos normalmente transparentes, duráveis, fáceis de manipular, impermeáveis à água e contaminação bacteriana, porém não são indicados para feridas exsudativas, sendo considerados curativos de proteção, muitas vezes associados a outros tipos de curativos como uma cobertura secundária (Weller e Sussman, 2006; Fonder *et al.*, 2008).

- Membranas são materiais finos, mas tridimensionais, que podem apresentar diversas estruturas, tais como porosa ou densa, podem ser úmidas ou secas, características estas que irão definir o comportamento do curativo. Membranas assimétricas são membranas que apresentam estruturas distintas, uma face porosa e outra densa na mesma membrana.

O curativo mais conhecido é a gaze, ou compressas compostas de gaze-algodão, que são utilizadas desde meados da década de 1970. Estes materiais foram caracterizados por seu baixo custo, fácil utilização e fabricação. No entanto, as desvantagens destes materiais restringiram o seu uso, pois possuem alta capacidade de absorção de exsudatos de feridas, que causa uma rápida desidratação e promove o crescimento bacteriano e a contaminação. Além disso, no final do tratamento a remoção da cobertura pode apresentar dificuldades, como causar sangramento ou danos ao tecido epitelial renovado (Edwards *et al.*, 2001).

Portanto, para tornar o processo de cicatrização de feridas mais rápido e menos doloroso, é necessário que no desenvolvimento de novos curativos sejam consideradas a segurança do paciente, a eficácia clínica e a conveniência de serem manuseados e aplicados, além da capacidade de imitarem as propriedades nativas de pele (Boateng *et al.*, 2008; Shevchenko *et al.*, 2010).

Para que um único curativo possa apresentar umidade suficiente para favorecer a cicatrização, mas ao mesmo tempo não deixar acumular líquido no leito da ferida, proteger contra invasão bacteriana, favorecer a cicatrização, entre outras características desejadas, pode-se fazer uso de técnicas como a combinação de diferentes materiais, de diferentes estruturas, incorporação de ativos, entre outros. Alguns materiais disponíveis no mercado já fazem uso dessas combinações. Pode-se citar como exemplo a adição de prata como agente antimicrobiano

(Aquacel Hydrofiber[®], Allevyn, Mepilex Ag, etc), a adição de alginatos para aumentar a absorção de exsudato (Fibracol[®] *Plus collagen with alginate*, Tegaderm[™] *High Gelling Alginate Dressings*) e o preparo de filmes combinados com espumas (Allevyn), entre outros.

No mercado existe uma gama de curativos, porém produtos mais específicos para feridas crônicas como Tegaderm[™] *High Gelling Alginate Dressings*, Mepilex Ag, Aquacel Hydrofiber[®], possuem custo elevado, aumentando o preço quando em formatos maiores, destinados a feridas de maior extensão. Na Tabela 1 estão expostos os preços por unidade de alguns curativos de alto desempenho, no tamanho de 10 cm x 10 cm, disponíveis no mercado (consulta realizada em fevereiro de 2017).

Tabela 1 – Valor comercial de alguns curativos de alto desempenho

Curativo	Preço (R\$/unidade)	Fonte
Tegaderm [™] Alginate	114,24	www.primecirurgica.com.br
Mepilex Ag	99,43	www.vitaesaude.com.br
Aquacel Hydrofiber [®]	49,90	www.fibracirurgica.com.br
Allevyn non-adhesive	17,02	www.expressmedicalstore.com.br
DuoDERM	34,14	www.expressmedicalstore.com.br

A frequência da troca de curativos depende da condição da ferida, do tipo do curativo, entre outros fatores, em alguns casos é necessário trocar diariamente, o que aumenta o risco de infecção pela exposição da ferida ao meio, encarece o tratamento e causa dor e incômodo ao paciente (Blanes, 2004).

3.2 Membranas assimétricas

Membranas assimétricas têm sido desenvolvidas para aplicação como curativos com o intuito de imitar a pele natural, visto que essas membranas apresentam morfologia similar à da pele e propriedades adequadas para um melhor processo de cicatrização das feridas (Morgado *et al.*, 2015).

Pesquisadores da área de medicina regenerativa concluíram que a combinação dos sistemas oclusivo e estrutura porosa desenvolvidas podem ser ideais como curativos. Os curativos unicamente oclusivos são impermeáveis e não são capazes de absorver o exsudato da

ferida. Já os curativos com macroporos, desenvolvidos para suprir essa deficiência dos curativos oclusivos, apresentaram excelente capacidade de drenar exsudato, porém foram ineficazes no controle de invasão microbiana e controle de desidratação da ferida. Logo, um sistema que combine esses dois tipos de estrutura pode apresentar características adequadas para a aplicação em questão (Morgado *et al.*, 2015). A Figura 1 apresenta um esquema das possíveis funções de membranas assimétricas no processo de cicatrização de feridas.

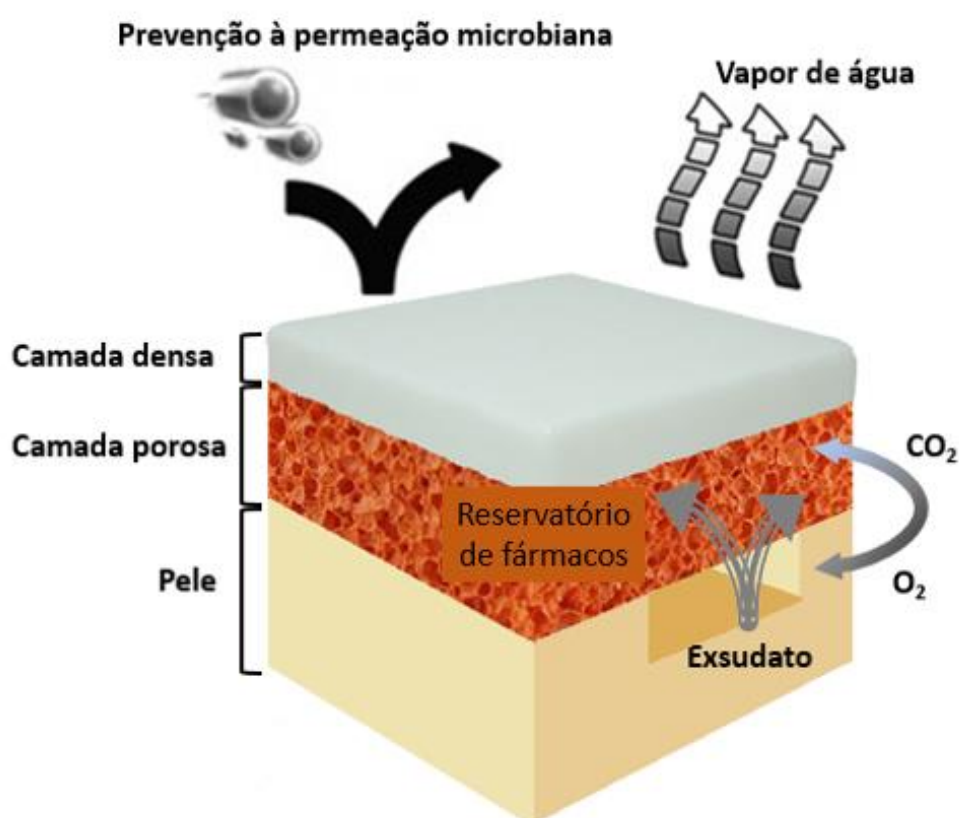


Figura 1 – Representação esquemática das possíveis funções de membranas assimétricas como curativo. Adaptado de Morgado *et al.* (2015).

Alguns curativos já comercializados são constituídos por uma sub-camada macroporosa ou um hidrogel ligado a uma camada superior hidrofóbica microporosa ou densa. Lyofoam[®], Epigard[®] e Duoderm[®] pertencem a esse tipo de curativos. No entanto, eles também apresentam alguns inconvenientes: a capacidade limitada de drenagem, a acumulação de exsudato e a necessidade de substituição frequente que leva a um aumento do risco de infecção da ferida (Mi *et al.*, 2001; Morgado *et al.*, 2015). Porém, membranas assimétricas de poliuretano desenvolvidas por Hinrichs *et al.* (1992) apresentaram alta capacidade de drenar o exsudato e

ao mesmo tempo prevenir a invasão de micro-organismos, ultrapassando as limitações apresentadas pelos curativos comerciais supracitados.

Membranas assimétricas de quitosana também foram satisfatoriamente desenvolvidas (Mi *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2003). Apesar de membranas assimétricas apresentarem diversas propriedades (atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades hemostáticas e permeação de água) que satisfazem os requisitos comuns de um curativo ideal, apenas 13 artigos sobre o desenvolvimento de membranas assimétricas para cicatrização de feridas foram publicados segundo a base de dados ISI, sendo que em 11 deles foram estudados apenas os polímeros quitosana e poliuretano para o preparo dessas membranas (Hinrichs *et al.*, 1992; Mi *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2002; Mi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013; Morgado *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2016). A busca foi realizada no dia 26 de maio de 2017, utilizando as palavras-chave: *asymmetric membrane e wound dressing*. Não selecionou-se período específico para a busca.

3.3 Polímeros naturais

Os polímeros naturais, geralmente proteínas ou polissacarídeos oriundos de micro-organismos, animais ou vegetais, apresentam grandes vantagens para aplicação na área biomédica, pois geralmente não são tóxicos, são compatíveis com uma ampla variedade de células e tecidos, podem ser produzidos em diversas morfologias, tamanhos, e em geral são esterilizáveis. Além disso, a presença de grupos funcionais reativos em suas moléculas permite modificações químicas e bioquímicas, principalmente na superfície, que possibilita sua funcionalização e expandem seu campo de aplicação (Abramson *et al.*, 2004).

O que limita sua aplicação é que geralmente os polímeros naturais são heterogêneos, variam suas propriedades de acordo com a sua procedência e modo de obtenção, e em alguns casos não apresentam propriedades mecânicas adequadas. Porém, alguns procedimentos podem ser utilizados para superar essas desvantagens, tais como combinar diferentes polímeros a fim de agrupar as qualidades e eliminar as falhas, além da realização de tratamentos químicos ou físicos como, por exemplo, a criogelificação (Malafaya *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008; Huang e Fu, 2010).

A recente revisão da literatura feita por Kamoun *et al.* (2017) cita que a categoria de curativos poliméricos a base de polímeros naturais, está entre os principais tópicos discutidos

na literatura atualmente. A quitosana, os alginatos e o ácido hialurônico são mais eficientes como aceleradores de cicatrização de feridas do que os polímeros sintéticos. Cita ainda que, notavelmente, as feridas cobertas com biopolímeros são capazes de apresentar uma taxa de cicatrização rápida, sem deixar cicatriz, e que a incorporação de ativos para acelerar a taxa de cicatrização e melhorar o potencial mecânico vem recentemente apresentando impacto no avanço terapêutico de curativos para feridas.

Um resumo das propriedades atrativas para o preparo de curativos dos biopolímeros utilizados nessa tese está exposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades atrativas para o desenvolvimento de curativos dos biopolímeros CHI, KGM e SF.

CHI	KGM	SF
Biocompatibilidade	Biocompatibilidade	Biocompatibilidade
Não tóxico e não antigênico	Boa formação de filme	Permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água
Bioadesivo	Boa elasticidade e propriedades mecânicas	Possibilidade de esterilização térmica
Ação antimicrobiana	Capaz de controlar a umidade	Elevadas resistências mecânica, térmica e microbiana
Bioativa e apresenta efeitos hemostáticos	Boa formação de gel	Adesão e proliferação de células epiteliais e fibroblastos
Capaz de manter liberação contínua de medicamento	Capaz de manter liberação contínua de medicamento	Capaz de manter liberação contínua de medicamento

3.3.1 Glucomanana

A glucomanana é um polissacarídeo neutro da família das mananas, abundante na natureza. Glucomananas são hemiceluloses encontradas em madeiras moles e representam cerca de 16 a 18% da parede das células lenhosas (Maeda *et al.*, 2000).

A glucomanana é composta por monômeros D-manose e D-glicose unidos por ligação β (1-4) (Figura 2). A relação de quantidade destes monômeros pode variar de acordo com a origem do tubérculo, processo de extração, etc. Para a glucomanana de *Konjac* (KGM), extraída

de tubérculos da planta *Amorphophallus Konjac*, a relação molar é aproximadamente 1,6:1. Os grupos acetila representam de 5 a 10 % da molécula, e estão diretamente associados com a solubilidade da KGM em água. (Alonso-Sande *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011).

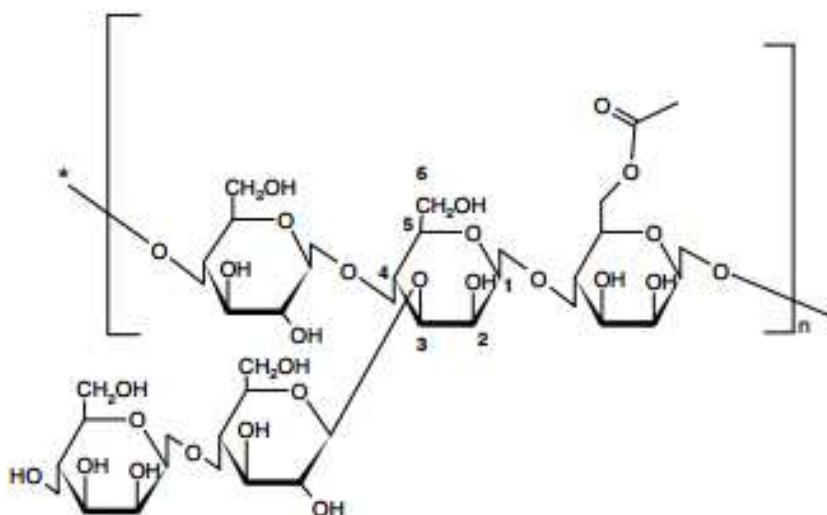


Figura 2 – Estrutura molecular da KGM. Adaptado de Alonso-Sande *et al.* (2009).

Na literatura se tem relatos de diferentes estruturas da KGM, podendo apresentar-se de forma linear, ramificada e dupla-hélice (Maeda, Shimahara e Sugiyama, 1980; Ogawa, Yui e Mizuno, 1991; Lie e Xie, 2006). Na Figura 2, uma ramificação é representada pela ligação β (1-3). O local de cultivo e método de extração (processamento) da KGM podem ser variáveis que justifiquem tais diferenças.

A KGM é comumente utilizada em alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos devido às suas propriedades de gelificação. Foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1994 como um aditivo alimentar e desde 1996 como aglutinante em produtos à base de carne (Chua *et al.*, 2010).

Na constituição de biomateriais a KGM pode ser utilizada na liberação de fármacos, devido a sua biodegradabilidade e capacidade de formação de gel (Zhang *et al.*, 2005) e como gel de preenchimento de próteses implantáveis (Ita e Clarke, 2003). Na terapia celular, Slepian e Massia (2001) desenvolveram material envoltório a partir da KGM que age como uma barreira para recobrimento de tecidos e superfícies celulares como o interior de vasos sanguíneos. Este material também pode ser utilizado para recobrir materiais implantáveis, podendo ser adicionados materiais bioativos a esse recobrimento para liberação *in vivo*.

A KGM é um material que apresenta características interessantes para aplicação como curativo, visto que é conhecida por possuir boa elasticidade e capacidade de formação de gel e filmes (Nishinari, 2000; Mamani, 2009).

Mamani (2009) estudou a formação de filmes de KGM pura e combinada com os polissacarídeos pectina e metilcelulose. A autora relata que os filmes de KGM apresentaram melhores propriedades mecânicas quando comparados aos demais polissacarídeos. A mistura ternária apresentou valores superiores de tensão na ruptura e alongamento quando utilizada KGM como componente majoritário.

Como curativo, há apenas dois trabalhos na literatura (Zhang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2007) combinaram KGM com CHI na forma de filme. Esta blenda apresentou absorção de água e perda de água por evaporação em níveis ótimos para manter um ambiente devidamente úmido, propício para a cicatrização de feridas, além de dar suporte à liberação contínua de agente bactericida na superfície de contato com a ferida.

Huang *et al.* (2015) estudaram a formação de filmes de KGM pura, tratada com os agentes alcalinos hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e hidróxido de potássio (KOH), como novos curativos. Os filmes apresentaram taxa de transmissão de vapor de água adequada para a aplicação, biocompatibilidade com células de fibroblastos L929 e células de queratinócitos HaCaT. *In vivo*, o filme de KGM tratado com Ca(OH)_2 promoveu a contração da ferida (redução do tamanho da ferida aberta) numa fase precoce, sendo que o teste histológico revelou considerável secreção de colágeno e desenvolvimento avançado de tecido de granulação e cobertura epitelial após 7 e 14 dias da cirurgia. O filme tratado com Ca(OH)_2 exibiu propriedades mais favoráveis ao intumescimento, resistência à tração e alongamento em comparação com o filme tratado com KOH, o que foi justificado pelo fato do íon Ca^{2+} apresentar carga eletrostática maior (mais cargas positivas dentro do mesmo raio) do que K^+ , por causa da divalência. O Ca^{2+} está assim associado mais fortemente com moléculas de água e com grupos OH das cadeias de KGM, através de interações íon-dipolo, em comparação com K^+ (Herranz *et al.*, 2012).

3.3.3.1 Mecanismo de gelificação da KGM

A formação de géis de KGM é comumente feita a partir do aquecimento da solução de KGM contendo componentes alcalinos ou grandes quantidades de sais neutros (Xu *et al.*, 2007; Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Alonso-Sande *et al.*, 2009).

Parâmetros como temperatura, massa molar e concentração de reagentes, influenciam a gelificação (Xu *et al.*, 2007; Alonso-Sande *et al.*, 2009). O aumento da concentração do polímero facilita as interações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio e entrelaçamento entre as cadeias poliméricas, pois aumenta-se o contato entre as moléculas devido à diminuição do espaço livre entre elas (Luo *et al.*, 2013).

Em solução alcalina, as carbonilas (C=O) presentes nos grupamentos acetila reagem com o álcali adicionado, ocorrendo a desacetilação e formação de estrutura em rede de gel de KGM, devido às ligações de hidrogênio, assim como interações hidrofóbicas entre as cadeias que compõem a estrutura do gel (Xu *et al.*, 2007; Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Alonso-Sande *et al.*, 2009).

Além disso, o álcali pode enfraquecer a associação intermolecular, devido aos efeitos da ionização e introdução de cargas negativas ao longo das cadeias do polímero e a repulsão eletrostática, resultando na redução da viscosidade, no entanto, a desacetilação reduz a solubilidade, e torna a aumentar a viscosidade (Williams *et al.*, 2000; Doyle, Lyons e Morris, 2009).

Os possíveis efeitos da adição de NaOH na molécula de KGM foram avaliados por Luo, He e Lin (2013). Os autores apresentaram uma ilustração (Figura 3) dos efeitos da desacetilação, interações eletrostáticas e enfraquecimento nas ligações de hidrogênio da hidratação.

A alta densidade de cargas negativas na molécula de KGM devido à adição de uma substância alcalina é responsável pelo efeito indutivo, ou seja, atua como um agente nucleofílico, induzindo a aproximação dos elétrons para o átomo de oxigênio do grupo hidroxila da cadeia, gerando um oxianion. A expansão da molécula polimérica na solução é dificultada pela força de repulsão eletrostática entre a cadeia ionizada da molécula e o íon hidróxido. Outro possível efeito do álcali na molécula de KGM é explicado pelo fato deste atuar como um

eletrólito, enfraquecendo as ligações de hidrogênio da hidratação entre a molécula do polímero e a molécula da água, resultando em expansão-supressão da molécula na solução (Luo, He e Lin, 2013).

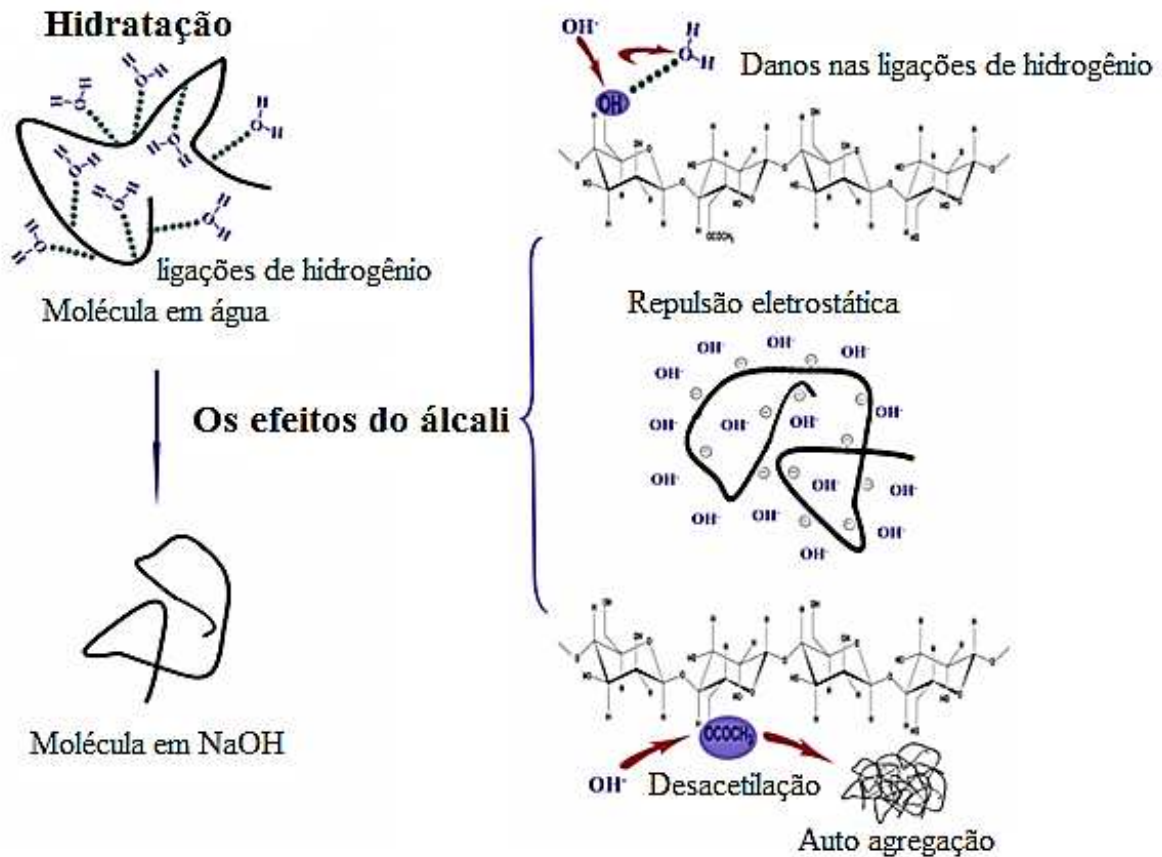


Figura 3 – Efeitos da adição de álcali na estrutura da KGM. Adaptado de Luo *et al.* (2013).

A reação de desacetilação pode ser favorecida pelo aumento da temperatura e, devido à energia cinética, as cadeias se movimentam mais. Por mais que o aumento da temperatura possa enfraquecer algumas ligações de hidrogênio, com o aumento da movimentação aumenta o entrelaçamento entre as cadeias, que é considerada uma interação mais forte (Luo *et al.*, 2013).

3.3.2 Quitosana

A quitosana (CHI) é a forma desacetilada da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza, que pode ser encontrado no exoesqueleto de crustáceos, artrópodes e de alguns moluscos. Alguns fungos também podem apresentar quitina em sua parede celular. Porém, a extração desse polímero é realizada basicamente a partir de cascas de caranguejos e camarões, que são descartadas pela indústria de pescados. A quitina é um biopolímero atrativo, pois é um

material de grande disponibilidade e de baixo custo (Kumar, 2000; Khoushab e Yamabhai, 2010; Dai *et al.*, 2011; Madihally, 2011).

A quitina é convertida em CHI através do processo de desacetilação termoquímica, em meio alcalino (Dash *et al.*, 2011). Estruturalmente, a CHI é um copolímero linear (Figura 4) que pode apresentar diferentes graus de desacetilação, o que interfere diretamente em suas propriedades químicas, físicas e biológicas (Chatelet *et al.*, 2001; Rinaudo, 2006).

A estrutura química da CHI é constituída pelos copolímeros β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, com grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário (Payne e Raghavan, 2007).

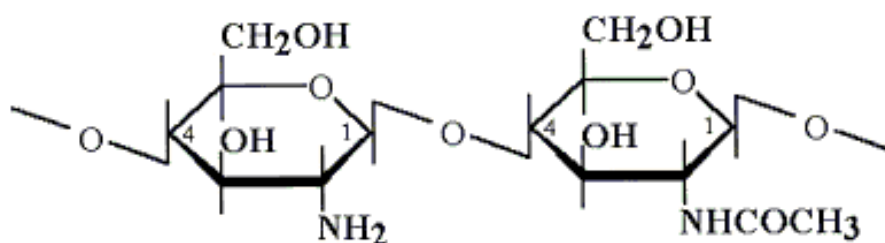


Figura 4 - Estrutura molecular da CHI. Fonte: Suh e Matthew (2000).

A CHI é um polissacarídeo que tem propriedades interessantes para o desenvolvimento de curativos, é um material biocompatível, não tóxico e não antigênico, bioadesivo, possui ação antimicrobiana, é bioativa e apresenta efeitos hemostáticos. Além disso, tem a vantagem de ser um material natural, biodegradável e não poluente (Huang e Fu, 2010; Dai *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013).

A quitosana é aprovada pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso em curativos. Porém, o método de preparação da CHI pode interferir na compatibilidade com o meio fisiológico. Resíduos de proteína podem causar reações alérgicas. Em geral, quanto maior a quantidade de cargas positivas na molécula de CHI, maior a biocompatibilidade (Croisier e Jérôme, 2013).

Há relatos de que a CHI melhora a coagulação do sangue e acelera a cicatrização de feridas, melhora as funções inflamatórias, pode estimular a proliferação de fibroblastos e interferir positivamente na síntese e deposição de fibras de colágeno (Kim *et al.*, 2008;

Muzzarelli, 2009; Jayakumar *et al.*, 2011), além de já ter se mostrado eficiente como curativo de feridas superficiais (Dash *et al.*, 2011).

No entanto, segundo Li *et al.* (2011), curativos de CHI tem baixa resistência à tração e elasticidade. Justificando a necessidade do desenvolvimento de compósitos com alta resistência mecânica que sejam biocompatíveis e que possam ajudar na cicatrização de feridas. A melhoria das propriedades de absorção e permeação de água é também necessária para os produtos derivados de CHI. Segundo o autor, a KGM pode melhorar significativamente as propriedades mecânicas da CHI. A resistência à tração e o alongamento na ruptura de filmes de blendas de KGM/CHI foram aumentados em cerca de 40% e 30%, respectivamente. Além disso, a adição de KGM melhorou a biocompatibilidade dos materiais (Nie *et al.*, 2011).

3.3.3 Fibroína de seda

A fibroína do bicho da seda (SF) é uma proteína fibrosa que tem sido utilizada no campo biomédico há vários anos como sutura. Recentemente, a SF está sendo estudada na confecção de matrizes para crescimento celular e na fabricação ou recobrimento de biomateriais devido à sua compatibilidade com diversos tipos de células, alta resistência mecânica e biodegradabilidade (Mori e Tsukada, 2000). Essas propriedades, aliadas ao fato da SF poder ser processada sob diversas formas como filmes (Nogueira, 2009), microesferas (Lv *et al.*, 2005) e hidrogéis (Kim *et al.*, 2004), ressaltam seu potencial de aplicação em diversas áreas. Também pode ser utilizada como fibras de diâmetro micrométrico, que é sua forma natural, conhecidas por serem resistentes mecanicamente.

As moléculas de fibroína são compostas por uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Figura 5), apresentando em média 16 aminoácidos, sendo os principais a alanina, a glicina, a serina e a tirosina, sendo que a fração molar destes quatro aminoácidos representam 90% da estrutura da fibroína (Sashina *et al.*, 2006).

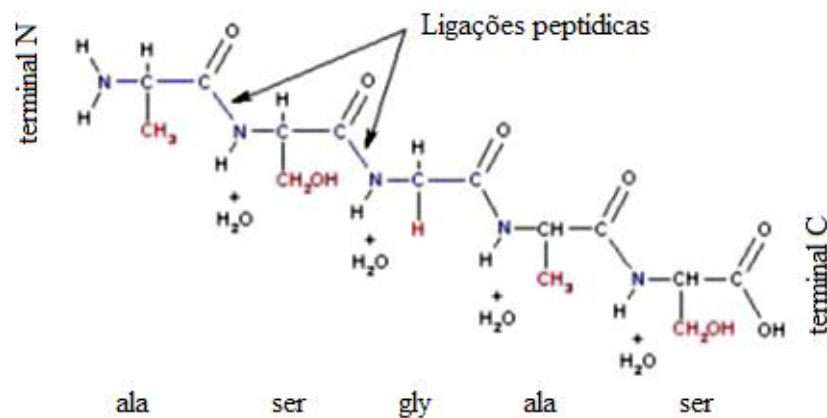


Figura 5 – Estrutura primária da fibroína de seda. Fonte: Nogueira, 2005.

A SF é separada da sericina, que é uma proteína que atua unindo as fibras de SF, à qual geralmente são atribuídas as reações alérgicas à seda, por um processo chamado de degomagem, no qual a sericina é dissolvida em soluções alcalinas ou água fervente, porém as fibras se mantêm estáveis (Altman *et al.*, 2003).

A SF livre de sericina possui propriedades adequadas para aplicações na área médica, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água, possibilidade de esterilização por autoclave, elevada resistência mecânica, térmica e microbiana (Um *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2003; Macintosh *et al.*, 2008). A SF é também capaz de dar suporte à adesão e proliferação de células epiteliais e fibroblastos, logo, promove a cicatrização de feridas (Malafaya *et al.*, 2007).

A solução salina de fibroína apresenta elevada força iônica, que promove a solvatação das fibras de fibroína, e portanto, pode ser estocada por vários meses sem que ocorra gelificação ou mudança conformacional. Para se obter uma solução aquosa de SF, para o preparo de biomateriais, é necessário dialisar a solução supersaturada de SF para a remoção dos sais. Nesse processo, os íons do sal são removidos da solução de SF por difusão para a água de diálise e a força iônica do solvente diminui. Qualquer perturbação na solução de fibroína metaestável (solução aquosa, obtida após diálise) poderá resultar em separação de fase instantânea, com formação de um hidrogel de fibroína (Moraes, 2014).

A SF é aprovada pela agência regulatória americana FDA e tem sido utilizada na medicina para uma ampla variedade de aplicações, incluindo liberação controlada de medicamento e engenharia de tecidos (Bettinger *et al.*, 2007).

A utilização das fibras de SF, em sua forma natural, já foi estudada no Lequip (Laboratório de Engenharia e Química de Produtos da Unicamp), como no reforço mecânico de membranas de alginato de sódio e também em hidrogéis de colágeno microestruturados com esta fibra. Em ambos os casos, a SF provou ser um material com elevada resistência mecânica, melhorando propriedades como resistência à tração, ao rasgo e também à compressão. Além disso, os materiais preparados, tanto na forma de membranas como de hidrogéis, não foram tóxicos às células, demonstrando o potencial de aplicação da SF como biomaterial (Moraes, 2010; Moraes *et al.*, 2012). Outro estudo realizado no Lequip revelou que membranas de fibroína de seda podem ser esterilizadas em condições de temperatura, umidade e pressão elevadas, sem causar degradação ou modificações estruturais significativas nas mesmas (Weska, 2009).

3.4 Técnicas para preparo de curativos microestruturados com polímeros naturais

A superfície da ferida deve ser úmida o suficiente para uma rápida cicatrização, porém o acúmulo de fluido pode favorecer infecções. Logo, curativos devem ser aptos a absorver o excesso de exsudato sem desidratar o leito da ferida. Nesse contexto, membranas assimétricas contendo uma camada superficial (voltada ao ambiente) mais densa e uma camada inferior (em contato com a ferida) mais porosa, podem apresentar as características desejadas, pois a camada densa evita a desidratação e impede a passagem de micro-organismos devido ao tamanho reduzido dos poros, enquanto que a camada porosa é capaz de drenar e absorver o excesso de fluido, além de promover uma boa adesão no leito da ferida (Hinrichs *et al.*, 1992).

Uma maneira de obter membranas assimétricas é pela técnica de inversão de fases por imersão-precipitação. Primeiramente, a solução de polímero é colocada em um molde para a formação de um filme fino, na sequência o filme é imerso em solução não solvente, onde o não solvente ocupa o lugar do solvente, ocorrendo a precipitação. Durante este processo o filme de polímero separa fase, dando origem a uma fase rica e outra pobre de polímero, formando a matriz e os poros da membrana (Vandezande *et al.*, 2008).

Porém, esse processo não permite controle sobre a estrutura formada, sendo necessárias algumas modificações para obter o produto como desejado. Mudar a composição da solução a ser moldada, ou do banho de coagulação, ou ainda adicionar etapas como evaporação são opções para se obter um maior controle da estrutura a ser formada (Lai *et al.*, 1996).

A espessura da camada densa, assim como do material como um todo, e a porosidade interferem diretamente na permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio. Quanto maior a espessura da camada densa, menor é a taxa de transmissão de vapor de água do material, e quanto maior a porosidade e tamanho de poros da subcamada, maior é essa taxa (Mi *et al.*, 2001).

Outra opção é a obtenção de membranas multicamadas (uma camada de cada polímero), onde cada camada de uma mesma membrana é moldada e então submetida ao processo de evaporação (*casting*), permanecendo com umidade suficiente para que a película não se solte do molde e para que a deposição da camada posterior seja satisfatória. Terminado o processo de deposição e secagem de todas as camadas, é necessário estabilizar os grupos funcionais de acordo com o material utilizado (Paiva, 2009).

A criogelificação é uma técnica que pode ser empregada para ajustar o tamanho de poros, pois quando a solução é congelada lentamente, os cristais de gelo crescem de maneira isotrópica, formando poros maiores e essa estrutura é mantida após degelo (Yuan *et al.*, 2009). Segundo Ma e Xiong (2008), que avaliaram o congelamento de géis de polivinil álcool, quando se reduz a temperatura para valores negativos (°C), o movimento das cadeias se torna restrito, aumentando o tempo de contato entre elas, facilitando o aparecimento de zonas de junção devido, provavelmente, ao enovelamento ou à ligações de hidrogênio entre as cadeias. Os cristalitos formados nesse processo funcionam como agentes reticulantes, produzindo uma estrutura tridimensional que se mantém estável quando ocorre o descongelamento.

O congelamento de hidrogéis induz a formação de cristais de gelo, que formam os poros. Dependendo da taxa de congelamento, a formação de poros ocorre de maneira diferente, podendo apresentar estrutura uniforme e isotrópica, como também poros alinhados. Além da estrutura, também se consegue poros de tamanhos diferentes, pois quando o congelamento ocorre lentamente os cristais de gelo têm mais tempo de crescer do que quando o processo é rápido, formando poros maiores (Hsieh *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009).

Estudos envolvendo o congelamento de hidrogéis de KGM já foram realizados no Lequip. O congelamento lento de hidrogéis de KGM possibilita a formação de uma estrutura de poros maiores do que o hidrogel congelado em alta taxa de congelamento (contato direto com nitrogênio líquido), que é uma propriedade normalmente almejada para um biomaterial, pois as células precisam de espaço suficientemente grande para se desenvolver. Outra vantagem

apresentada pelos hidrogéis de KGM submetidos ao congelamento lento, é que estes são cerca de quatro vezes mais resistentes à compressão do que os hidrogéis não congelados. Além disso, notou-se que a gelificação da KGM é lenta, sendo possível reduzir esse tempo com o processo de congelamento (Genevro, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O objetivo principal desta tese foi desenvolver membranas assimétricas para uso como curativos. Para tal, avaliou-se de maneira exploratória o preparo das membranas pela técnica de inversão de fases, comumente utilizada para o preparo desse tipo de material. Posteriormente, estudou-se a formação de membranas assimétricas por secagem parcial e congelamento, técnica desenvolvida nessa tese para alcançar o objetivo de obter em uma mesma membrana, uma parte densa e outra porosa. Para essa tecnologia, foi depositado pedido de patente no INPI sob o registro BR1020150319339 (Genevro *et al.*, 2015).

As descrições das metodologias utilizadas para os estudos supracitados estão divididas em tópicos, sendo o tópico 4.1 relativo àquelas preparadas por inversão de fases e o tópico 4.2 relativo às membranas preparadas por secagem parcial e congelamento. O Quadro 1 apresenta um resumo dos tipos de membranas preparados nesta tese e suas respectivas caracterizações.

Quadro 1– Resumo das caracterizações aplicadas para cada tipo de membrana avaliada.

Técnica de obtenção	Membranas	Caracterizações
Inversão de fases	CHI pura	Espessura + propriedades mecânicas
	KGM pura	Encolhimento
	CHI pura + congelamento	MEV
	KGM pura + congelamento	MEV
	Bicamada CHI/KGM + congelamento	MEV
	Bicamada KGM/CHI + congelamento	MEV + propriedade mecânica + permeabilidade ao vapor de água
Secagem parcial + congelamento	KGM 50% - SF 50% e KGM 75% - SF 25%	MEV + citotoxicidade direta
	KGM pura	MEV + propriedade mecânica + DRX + FTIR + TGA + permeabilidade ao vapor de água + FHC
	KGM pura + tratamento com etanol	MEV + propriedade mecânica + DRX + FTIR + TGA + permeabilidade ao vapor de água + citotoxicidade direta e indireta + atividade antimicrobiana + permeação microbiana

4.1 Preparo de membranas assimétricas obtidas por inversão de fases

4.1.1 Preparo das soluções de CHI e KGM

A solução de CHI foi preparada na concentração de 1% (m/v) dissolvendo-se a CHI (Sigma Aldrich, USA), extraída de carapaças de caranguejo, com um grau de desacetilação mínimo de 75%, em uma solução de ácido acético 3% (v/v) e mantendo-se o sistema sob constante agitação por cerca de 12 h, seguida de uma filtração a vácuo. Essa solução apresenta um pH de 3,3 e parte dela foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/L até uma concentração final de 0,8% de CHI (m/v), pH próximo de 5, com o intuito de aproximar o pH de 5,5. Tal procedimento foi feito, pois estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que membranas multicamadas de CHI e KGM apresentam camadas melhor definidas quando o pH da solução de CHI é ajustado para 5,5 (Neto *et al.*, 2014). Uma hipótese para explicar esse fato é que a quitosana em ácido acético (pH ~3) possui seus grupos aminos quase que completamente protonados, e quando eleva-se o pH da solução, aumenta-se a disponibilidade de grupos aminos desprotonados, os quais seriam responsáveis por interagir de forma mais homogênea com os grupos carboxila e hidroxila da glucomanana, dando origem a uma interface mais bem definida entre ambos polímeros (Neto *et al.*, 2014).

Foi utilizado o produto Konjac Powder (Konjac Foods, China), com massa molar média de $1,48 \times 10^6$ Da e índice de polidispersidade médio é igual a 1,01 (Genevro, 2013). Foram preparadas soluções 1% (m/v) de KGM em água destilada, sendo o sistema mantido sob agitação por pelo menos 4 h.

4.1.2 Preparo de membranas de KGM e CHI puras

Em um primeiro momento, foram avaliadas as condições de preparo das membranas de CHI e KGM isoladamente, para então planejar as condições de preparo das membranas assimétricas em camadas. Ou seja, as condições de secagem e composição do banho de inversão de fases para cada polímero foram estudadas individualmente, a fim de definir as melhores condições para cada material e posteriormente determinar uma condição ótima para ambos os polímeros.

Os não solventes utilizados para os testes de inversão de fases foram o hidróxido de sódio e o etanol, pois são capazes de precipitar a CHI e a KGM, respectivamente. Para o primeiro ensaio, as soluções poliméricas foram colocadas nos moldes (placas de Petri de

poliestireno) de 3,5 cm de diâmetro, e então secas em estufa a 60 °C, até 25% de umidade residual. Na sequência, as amostras foram imersas por 2 h em um único banho de inversão de fase composto por 50 mL de soluções aquosas dos não solventes citados. As concentrações de hidróxido de sódio foram 0,1 e 1 mol/L e de etanol foram 50, 75 e 100%.

Posteriormente, um planejamento de experimentos considerando as variáveis concentração de etanol, concentração de hidróxido de sódio e umidade residual foi desenhado de maneira a identificar a melhor combinação desses fatores. Para o planejamento, utilizou-se 2 níveis (Tabela 3) e foi executado para a KGM e CHI separadamente.

Tabela 3 - Tabela de níveis dos fatores estudados no processo de formação de membranas de KGM e CHI.

Variáveis	Níveis	
	-1	1
Etanol (%)	60	90
NaOH (mol/L)	0,50	2,00
Umidade residual (%)	10	40

As soluções foram espalhadas em moldes de 14 cm de diâmetro de modo que o conteúdo de massa seca fosse de aproximadamente 1 g. As amostras foram então colocadas em estufa a 60 °C para a evaporação parcial do solvente. Quando atingida a umidade residual desejada, as amostras foram submetidas ao banho de coagulação por aproximadamente 3 h. Na sequência, as membranas obtidas foram lavadas com água destilada até a neutralização do pH.

4.1.2.1 Preparo de membranas de KGM e CHI puras utilizando congelamento

Em paralelo com o estudo para otimizar as condições de preparo das membranas realizou-se uma experiência relativa ao uso da técnica de congelamento, com a finalidade de aumentar o tamanho dos poros da parte com maior conteúdo de água da membrana.

Membranas de CHI e KGM foram preparadas isoladamente. A solução polimérica foi vertida nos moldes de 14 cm de diâmetro, de maneira a conter aproximadamente 1 g de massa seca. Na sequência, parte do solvente foi evaporado em estufa a 60 °C, até atingir umidade residual de 25%. As membranas foram então congeladas em congelador convencional ($T = -6$

°C), por aproximadamente 24 h. Ainda congeladas, foram imersas no banho de inversão de fases por aproximadamente 3 h.

O banho de coagulação continha 1 mol/L de hidróxido de sódio e 100% de etanol. Como as amostras estavam congeladas, o banho foi colocado no congelador 2 h antes da imersão das membranas, com o intuito de igualar a temperatura do banho e das membranas para que o degelo ocorresse de maneira lenta. Após o degelo, as membranas foram lavadas com água destilada, de modo a neutralizar o pH das mesmas.

4.1.3 Preparo de membranas de KGM e CHI em camadas utilizando congelamento

Membranas contendo uma camada de KGM e outra de CHI foram produzidas. Para algumas membranas, a primeira camada (em contato com a placa de Petri) continha CHI e a segunda KGM, para outras o oposto. Porém o procedimento de preparo para os dois grupos de membranas ocorreu da mesma maneira, conforme descrito a seguir.

A solução polimérica da primeira camada foi espalhada no molde de 14 cm de diâmetro, com conteúdo de massa seca de 0,5 g, e colocada em estufa a 60 °C até atingir umidade residual de 10% em relação a umidade inicial. Na sequência, a solução do outro polímero foi depositada por cima da camada já preparada. Novamente a placa foi colocada na estufa a 60 °C, porém para a segunda camada a umidade residual foi de 25%. Essa distinção na umidade das camadas se deu pela intenção de fazer uma membrana assimétrica, a camada mais seca corresponderia ao lado denso da membrana e a parte com maior umidade, ao ser submetida ao congelamento, teria mais água disponível para formar cristais de gelo maiores e teoricamente obter um lado da membrana (camada mais úmida) com poros maiores.

Após a secagem, a membrana foi congelada em freezer convencional por pelo menos 24 h. A membrana foi então imersa em banho de coagulação contendo 1,25 mol/L de hidróxido de sódio e 75% de etanol por 3 h. Como as amostras estavam congeladas, o banho foi colocado no congelador 2 h antes da imersão das membranas, para que não houvesse uma diferença brusca de temperatura e o degelo ocorresse de maneira gradual. O pH das membranas foi neutralizado lavando-as com água destilada. O excesso de água foi removido com papel filtro, as membranas foram acondicionadas na geladeira em placas de Petri.

4.1.4 Caracterização das membranas

4.1.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a morfologia das amostras e condição de poros, estas foram secas por liofilização, fraturadas, recobertas com ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 440i disponível no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP.

4.1.4.2 Taxa de transmissão de vapor de água

A taxa de transmissão de vapor de água foi determinada de acordo com a norma ASTM E 96/E 96M-05. Utilizou-se um aparato disponível no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio) (FEQ/UNICAMP). Este aparato (Figura 6) consiste em um recipiente de acrílico de 500 mL (célula 1), hermeticamente fechado, o qual contém solução saturada de NaCl, com o intuito de manter a umidade relativa de 75%. No interior desta célula é colocada uma outra célula de acrílico (célula 2), com volume interno de 30 mL e abertura de 15,20 cm² (área de permeação). No interior da célula 2 é colocado cloreto de cálcio anidro granulado, material dessecante. A membrana a ser permeada é fixada no topo da célula 2, sendo que cada lado da membrana fica exposto aos ambientes com atmosferas diferentes (material dessecante de um lado e de outro, umidade relativa de 75%). A massa da célula 2 contendo a membrana é registrada a cada 12 h por 5 dias, sendo o aparato acondicionado à temperatura ambiente. O aumento de massa da célula 2 com o tempo corresponde à taxa de permeabilidade da membrana ao vapor de água.

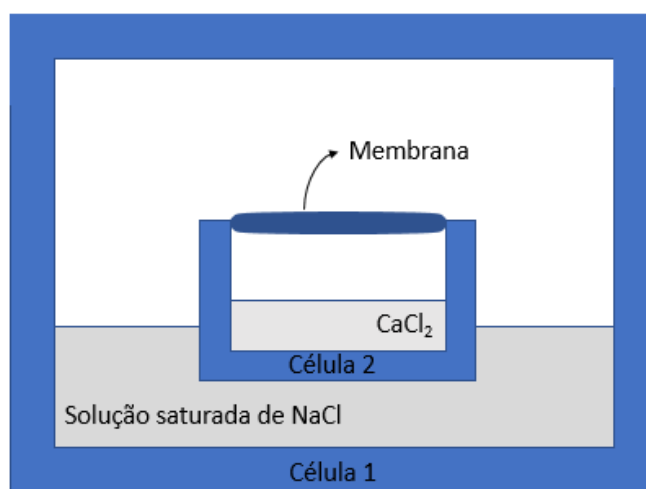


Figura 6 – Esquema do aparato utilizado para o teste de transmissão de vapor de água.

Previamente à realização do teste as membranas foram acondicionadas por 48 h em ambiente com 50% de umidade relativa.

Os dados de ganho de massa com o tempo foram ajustados a uma reta, sendo o coeficiente linear desta reta a taxa de variação de massa do sistema. A Equação 1 apresenta o cálculo para a transmissão de vapor de água das membranas.

$$TVA = \frac{(G/t)}{A} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

TVA é o coeficiente de transmissão do vapor de água (g/m².dia)

G/t é a taxa de variação de massa do sistema (g/dia)

A é a área permeada da membrana (m²)

4.1.4.3 Ensaio mecânicos

Os ensaios mecânicos de resistência à tração (ASTM D882-02) foram realizados utilizando um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD) com célula de carga de 50 kg, disponível no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio/FEQ/UNICAMP). Após a neutralização do pH das membranas, o excesso de água foi removido utilizando papel filtro. As membranas foram cortadas com dimensões de 7 x 2,5 cm e colocadas por 48 h em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio, a fim de manter o ambiente com 50% de umidade relativa, conforme determinado pela norma citada acima. A espessura foi medida com auxílio de um micrômetro digital (MDC-25S, Mitutoyo).

Para a realização do teste de resistência à tração, a distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de realização do teste de 10 mm/s. O ensaio foi realizado em 5 amostras e sua média calculada.

A tensão de ruptura e o percentual de alongamento das membranas foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3.

$$Tensão_ruptura = \frac{F}{A} = \frac{F}{e.L} \quad \text{Equação 2}$$

$$\%Alongamento = \frac{d}{H} . 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

F é a força na ruptura (N)

e é a espessura média da amostra (m)

L é a largura da amostra (m)

d é a distância percorrida pelas garras (mm)

H é a altura da amostra entre as garras (mm)

4.2 Membranas assimétricas obtidas por secagem parcial e congelamento

4.2.1 Preparo das fibras de SF

As fibras de SF foram obtidas a partir de casulos do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori*, fornecidos pela indústria brasileira Bratac (Bastos/Brasil). Os casulos foram degomados em solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 g/L a 85 °C por 30 minutos, procedimento repetido por 3 vezes e posteriormente os fios foram lavados em água destilada. Os fios foram secos à temperatura ambiente por um período de 24 a 48 horas. Quando secos, os fios foram moídos em moinho de rotor tipo ciclone (TE-651/2, Tecnal) (Moraes *et al.*, 2012).

4.2.2 Preparo das soluções de SF e KGM

A solução de SF foi preparada de maneira que para cada 5 g de fios moídos foram adicionados 100 mL de solução ternária de cloreto de cálcio, etanol e água ($\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:8 molar) e a suspensão obtida foi mantida a 85 °C em banho termostatizado até dissolução completa dos fios da seda por, no máximo, 1 h e 30 min (Um *et al.*, 2001).

A solução salina de SF a 5% (m/v) foi dialisada em água destilada por 3 dias, a 10 °C, para a remoção do cálcio presente na solução. A água da diálise foi trocada a cada 24 h, na proporção volumétrica solução de SF:água de 1:15 (Nogueira, 2005). Ao final da diálise obteve-se uma solução a 2,5% (m/v), que foi diluída em água destilada até a concentração final de 1% (m/v). A concentração da solução aquosa (após diálise) foi determinada vertendo a solução em

placa de Petri e pesando a massa seca remanescente após a completa evaporação do solvente. As membranas de diálise utilizadas foram membranas de acetato de celulose (Viscofan) com massa molar de corte de 3,5 kDa.

Para a KGM foram preparadas soluções em água destilada, na concentração de 1% (m/v), utilizando o produto Konjac Powder (Konjac Foods, China).

4.2.3 Métodos de preparo das membranas assimétricas

Para o preparo de membranas de KGM contendo fibras de SF, fez-se a incorporação dos fios de SF moídos na solução de KGM, na concentração de 25% de fibras em relação à massa seca de KGM.

Para o preparo das blendas, as soluções de KGM e SF foram misturadas lentamente, em agitador magnético a 200 rpm, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Foram preparadas diferentes proporções KGM:SF como 100:0, 75:25 e 50:50, em massa, respectivamente. Para misturas com mais de 50% de SF não houve formação de uma membrana resistente ao manuseio, portanto estas não foram consideradas no estudo.

Na sequência, foi adicionada solução de hidróxido de sódio (agente gelificante da KGM), de maneira a obter concentração de 0,1 mol/L deste componente na mistura. Para a obtenção das membranas, 60 g da blenda foram vertidas em placa de poliestireno ($d = 9$ cm) e o solvente foi evaporado em estufa a 60 °C, até 20% da massa inicial. As amostras foram então congeladas em freezer convencional por pelo menos 24 h. O degelo ocorreu em bancada. As membranas foram imersas em etanol 70 % por 2 h para reticulação da SF, seguido de lavagem com água destilada até a neutralização do pH.

4.2.4 Avaliação da influência do tratamento das membranas com etanol 70%

Devido ao fato dos materiais testados biologicamente terem sido descontaminados com etanol 70% para a realização dos ensaios, averiguou-se a influência do processo de desinfecção nas propriedades químicas e físicas do material. As amostras foram imersas em etanol 70% por 2 h, lavadas com água destilada e analisadas quanto à morfologia por MEV, resistência à tração, DRX, FTIR, TGA e permeabilidade ao vapor de água.

4.2.5 Caracterização das membranas

4.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a morfologia das membranas de KGM e SF, assim como identificar componentes nas amostras, utilizando a técnica de EDS – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia, estas foram secas por liofilização, recobertas com ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura, Quanta 400FEG ESEM/EDAX Genesis X4M, disponível no Centro de Materiais da Universidade do Porto/CEMUP. Também foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca LEO 440i no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP).

4.2.5.2 Testes biológicos

4.2.5.2.1 Citotoxicidade indireta

Citotoxicidade indireta é uma análise biológica realizada com o intuito de pré-selecionar materiais que futuramente poderão ser submetidos a ensaios *in vivo*. Este teste prevê a compatibilidade das amostras com células específicas. O teste foi realizado por colaboradores da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

Para a avaliação da compatibilidade das células selecionadas (CHO - células de ovário de hamster chinês) com as amostras desenvolvidas neste trabalho, foi seguida a norma ISO - 10993-5 (2009). A incubação da linhagem CHO – K1 foi feita a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, até atingirem confluência de aproximadamente 80% na placa de cultura. O processo de descolamento celular foi feito pela ação da solução de tripsina (solução tripsina 0,05% e EDTA 0,02% em tampão fosfato pH 7,2).

As células foram cultivadas em frasco de 75 cm² com 10 mL de meio de cultura apropriado RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Cada membrana foi cortada e descontaminada utilizando etanol 70% por 2 horas e posteriormente lavada com PBS estéril. Após descontaminação, as membranas foram colocadas separadamente em tubos estéreis e meio de cultura sem soro foi adicionado na proporção de 1 mL por 6 cm² de amostra. Para preparação dos extratos, os tubos foram mantidos a 37 °C por 72 h. Os extratos foram filtrados com membranas com poros de 0,45µm, e diluições com meio

de cultura RPMI em 7 concentrações seriadas foram realizadas para se alcançar concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78% de extrato. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura sem extrato. O experimento foi realizado em sextuplicata.

Em placas de 96 poços (0,28 cm² de área de cada poço) foram semeadas 2×10^4 células por poço, com RPMI suplementado com glutamina 1%, antibiótico 1% e soro fetal bovino 1%. As placas foram então incubadas por 24 horas. Na sequência, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados os extratos em suas respectivas diluições. As placas foram colocadas na incubadora úmida com 5% de CO₂ e 37 °C por 24 h. Após incubação, os extratos foram retirados, os poços lavados 2 vezes com PBS pH 7,4, para então ser adicionada a solução do corante vital Neutral Red (NR corante vermelho neutro). Após 3 horas de incubação, o meio foi retirado e foi adicionada a solução dessorb (1% ácido acético glacial, 50% etanol e 49% água destilada) e as placas agitadas por 10 minutos, sendo então levadas a uma leitora de ELISA e a absorbância em cada poço medida no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$VC(\%) = \left(\frac{OD_{amostra}}{OD_{controle}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

VC é a viabilidade celular

$OD_{amostra}$ é a densidade óptica do extrato

$OD_{controle}$ é a densidade óptica do controle de células do teste.

4.2.5.2.2 Citotoxicidade direta

Para a análise da citotoxicidade direta, realizada na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, as membranas foram cortadas em discos de aproximadamente 1,2 cm de diâmetro e colocadas em placas de 24 poços. Anéis de Teflon foram utilizados para assegurar que os discos não flutuassem no meio de cultura. Na sequência, as amostras foram descontaminadas com etanol 70% e então lavadas com PBS estéril por 3 vezes. O meio de cultura utilizado foi α -MEM (Meio de cultura de Eagle modificação alfa) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de fungizona e 1% de penicilina-estreptomicina.

Fibroblastos L929 foram semeados nas faces das membranas, na concentração de 2×10^4 células por poço. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 . A atividade metabólica foi avaliada no primeiro e quarto dia de cultura, utilizando o reagente resazurina, que é reduzido pelas células ativas para resorufina, uma forma fluorescente. Nos dias 1 e 4 de cultura, após a troca do meio de cultura, resazurina 10% foi adicionada aos poços, que foram incubados por 3 horas e 30 minutos, nas mesmas condições do cultivo. Então, $100\ \mu\text{L}$ da solução foi transferida para placas de 96 poços, pretas e de fundo transparente. A intensidade da fluorescência foi medida em leitora de microplaca (Synergy HTX – Biotek) a 530 e 590 nm de excitação e emissão, respectivamente.

A proliferação celular foi calculada através da Equação 5.

$$\%_{\text{proliferação_celular}} = \frac{I_{\text{dia4}} - I_{\text{dia1}}}{I_{\text{dia1}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que,

I é Intensidade de fluorescência

Foi utilizado o teste t-Student com auxílio do software Microsoft® Excel® 2013 para analisar os resultados. As diferenças entre as amostras foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$. Nos casos de comparação entre mais de duas médias, estas foram comparadas par por par.

Algumas amostras foram fixadas para posterior análise microscópica. Para análises de MEV as amostras foram fixadas cobrindo-as com glutaraldeído 2,5% (Sigma), lavadas com PBS por três vezes e armazenadas em geladeira. Posteriormente, desidratou-se as amostras com sucessivos banhos (10 min) em etanol 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% sucessivamente, seguido de banhos (10 min) em hexametildisilazano (Sigma) 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% sucessivamente. As amostras foram recobertas com ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 440i disponível no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP.

Para análises de microscopia confocal as amostras foram fixadas com formaldeído 3,5%, lavadas com PBS e armazenadas em geladeira. Previamente à análise, as amostras foram novamente lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,1% Titron X-100 por 30 min, coradas

com faloidina, usada para marcar o citoesqueleto das células, por 30 min, lavadas em PBS e coradas com PI (Iodeto de Propídio) (BD Biosciences), substância utilizada para marcar o núcleo das células, por 30 min. As amostras foram analisadas em microscópio confocal no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto.

4.2.5.2.3 Atividade antimicrobiana

Linhagens de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231) foram utilizadas para os experimentos de inibição microbiana. O teste foi realizado por colaboradores da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

Em placas de Petri foram adicionados 15 mL de meio TSA (Ágar tríptico de soja) onde foram inoculados na superfície 10^6 UFC/cm² de cada microrganismo testado. As membranas previamente cortadas em forma circular (0,9 cm de diâmetro) foram descontaminadas por 2 horas em etanol 70% e posteriormente lavadas com PBS estéril. As amostras foram colocadas sobre o meio de cultura inoculado, incubadas por 24 h a uma temperatura de 35 °C para as bactérias e 25 °C para a levedura. Após esse período foram efetuadas as determinações dos halos de inibição formados para cada amostra e classificados de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação da atividade antimicrobiana de acordo com o tamanho do halo de inibição do crescimento microbiano (Girata, 2011).

Dimensão do halo de inibição	Classificação da atividade antimicrobiana
Crescimento intenso sobre ou sob o corpo de prova	Não aceitável (NA)
0 – 1 mm	Aceitável (A)
2 – 5 mm	Satisfatório (S)
≥ 6 mm	Altamente satisfatório (AS)

4.2.5.2.4 Permeação microbiana

A capacidade das membranas em prevenir a penetração microbiana foi testada de acordo com a metodologia utilizada por Wittaya-arekul e Prahsarn (2006) com algumas modificações. Utilizou-se conexões de material PVC esterilizadas por radiação ionizante (Cobalto-60), encaixadas em frascos de vidro contendo 50 mL de meio TSB (caldo de soja tripticaseína). O

meio TSB é altamente nutritivo. As amostras de filmes foram cortadas com diâmetros de 5 cm e descontaminadas utilizando etanol 70% por 2 horas e posteriormente lavadas com PBS estéril. As amostras foram inseridas entre as conexões de PVC e os frascos. As conexões de PVC foram encaixadas nos frascos e vedadas com parafilme.

Como controle negativo, utilizou-se parafilme para fechar a área de permeação e também para vedar o encaixe entre a conexão e o frasco. Já para o controle positivo, não foram efetuadas vedações.

Os aparatos ficaram expostos por 10 dias em condições ambientes, sendo avaliada macroscopicamente a turvação da solução no interior dos frascos, indicativo de contaminação por micro-organismos nos dias 0, 5 e 10 do experimento.

4.2.5.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada utilizando-se o protocolo descrito no item 4.1.3.2.

4.2.5.4 Avaliação da capacidade de drenagem de fluido

A capacidade de drenagem de fluidos (*Fluid Handling Capacity* - FHC) de uma membrana é a medida da remoção do exsudado da ferida por curativos de feridas que manipulam o exsudado através da absorção e permeabilidade (*Moist Vapour Transmission Rate* - MVTR). A FHC foi examinada de acordo com o método BS EN 13726-1 para hidrocolóides e curativos (BSI, 2002).

Uma solução aquosa de cloreto de sódio e cálcio foi preparada, contendo 142 mmol/L de íons sódio e 2,5 mmol/L de íons cálcio. Essa solução foi chamada de fluido de exsudato simulado (SEF), pois simula a concentração dos íons cálcio e sódio frequentemente encontrada no exsudato de feridas (Thomas, 2007).

Previamente à realização do teste as membranas foram acondicionadas por 48 h em ambiente com 50% de umidade relativa.

Para a realização deste teste, as amostras foram cortadas em discos de 2,7 cm de diâmetro, pesadas, aplicadas nas bordas superiores de copos de Paddington modificados (Figura 7), e fixadas firmemente no lugar com anel de vedação. Os copos continham 20 mL de SEF.

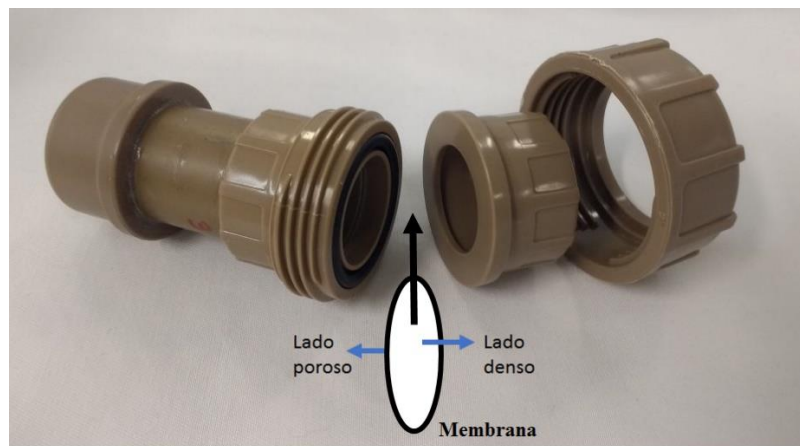


Figura 7 - Dispositivo empregado para a avaliação da capacidade de drenagem de fluido das membranas. Adaptado de Kimura *et al* (2016).

Os copos contendo as amostras foram pesados, invertidos de modo que as amostras ficassem em contato com o SEF e mantidos a 37 °C por 24h em um dessecador contendo sílica-gel. No final do ensaio, deixou-se o sistema em temperatura ambiente por 30 min e então os copos foram novamente pesados. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

A FHC e MVTR foram calculadas utilizando as Equações 6 e 7.

$$MVTR = \frac{m_{is} - m_{fs}}{t.A} \quad \text{Equação 6}$$

$$FHC = \frac{m_{is} - m_{fs}}{t.A} + \frac{m_{im} - m_{fm}}{t.A} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

m_{is} é a massa inicial do sistema

m_{fs} é a massa final do sistema após o período de drenagem

m_{im} é a massa inicial da membrana

m_{fm} é a massa final da membrana após o período de drenagem

A é a área de contato da membrana com o fluido

t é o tempo decorrido (24 h).

4.2.5.5 Ensaio mecânicos

Os ensaios mecânicos de resistência à tração (ASTM D882-02) e percentual de alongamento foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3. O módulo elástico foi obtido através do coeficiente angular da curva tensão *versus* deformação. Foi utilizado o teste t-Student com auxílio do software Microsoft® Excel® 2013 para analisar os resultados dos testes mecânicos. As diferenças entre as amostras foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

4.2.5.6 Difração de raios X (DRX)

A técnica consiste na incidência de um feixe de elétrons sobre a amostra e através da identificação dos raios X emitidos é possível determinar a composição da estrutura cristalina de regiões com até 1 μm de diâmetro. Para a realização das análises de raios X foi utilizado o equipamento X'PERT MPD, Philips Analytical X Ray, do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com radiação $\text{Cu-K}\alpha$, com comprimento de onda de 1,54 Å. A taxa de varredura utilizada foi de 0,6°/min, e 2θ variando de 5 a 80°. As membranas foram congeladas com nitrogênio líquido e secas por liofilização previamente à análise.

As distâncias interplanares médias entre as cadeias poliméricas podem ser calculadas utilizando-se a Lei de Bragg (Equação 8).

$$\lambda = 2.d.\text{sen}\theta \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

λ é o comprimento de onda do feixe de raios X, 1,54 Å

d é a distância interplanar (Å)

4.2.5.7 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Através deste método pode-se verificar a composição química das amostras. As moléculas são identificadas pela comparação dos valores de energia de radiação infravermelha absorvida, uma vez que cada molécula possui um espectro de vibração característico. Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700, Thermo Scientific, do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com acessório de reflexão total atenuada (ATR) Smart Omni sampler, na faixa de 670 a 4000 cm^{-1} .

4.2.5.8 Análises térmicas

A termogravimetria permite medir a variação da massa em função da temperatura e, assim, verificar o comportamento e estabilidade das membranas. Foi utilizado o Analisador Termogravimétrico TGA-50M, Shimadzu, do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com faixa de temperatura de 25 a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e vazão de nitrogênio de 50 mL/min. As amostras foram previamente secas por liofilização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Membranas assimétricas obtidas por inversão de fases

5.1.1 Membranas de KGM e CHI puras

Para o primeiro ensaio, no qual as amostras continham 25% de umidade residual e que foram imersas em banho de inversão de fase de etanol e hidróxido de sódio separadamente, com o intuito de definir as concentrações desses componentes no banho misto de inversão de fase do posterior planejamento, fez-se uma análise visual para cada amostra. Foi observado que o hidróxido de sódio sozinho, independentemente da concentração, não foi capaz de precipitar a KGM a ponto de formar uma membrana. Já para a CHI, mesmo em menor concentração de hidróxido de sódio, foi observada a formação de membrana. Porém, as membranas formadas de CHI não se apresentaram resistentes ao manuseio. Uma hipótese para essa deficiência é a baixa concentração de CHI, que pode ser solucionada com o aumento da concentração no preparo da solução ou o aumento do tempo de secagem de maneira a diminuir o teor de água presente nas amostras.

O uso do etanol, por sua vez, foi mais eficiente como não solvente para a KGM. Em todas as concentrações estudadas, houve formação de membrana. Ao aumentar a concentração de etanol, notou-se que a estrutura formada era mais resistente ao manuseio. Para a CHI, o etanol não apresenta grande influência na formação de membrana. Um banho de coagulação mais concentrado em etanol é capaz de formar uma membrana, porém esta membrana é pouco consistente e apresenta dificuldade de remoção do molde.

A formação da membrana de quitosana em meio alcalino se dá pelo fato de que à medida que o pH aumenta, os grupos amino da quitosana são desprotonados e o polímero perde sua carga tornando-se insolúvel (Cho *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2006). A neutralização dos grupos funcionais é necessária para estabilizar as matrizes tanto da CHI quanto de KGM.

He *et al.* (2011) estudaram a interferência de três diferentes soluções na neutralização de filmes de CHI, uma solução de NaOH, outra de etanol e uma terceira contendo tanto NaOH quanto etanol. A concentração de NaOH utilizada foi de 0,5 mol/L e de etanol 80%. Os autores relataram que após a neutralização, o filme estabilizado somente com etanol apresentou proporção de grupos amino maior que os demais filmes, indicando que a neutralização dos grupos funcionais da CHI com etanol é menos eficiente do que quando utilizado NaOH. Este é um álcali forte e pode reagir completamente com os ácidos. Portanto, os grupos amino nos

filmes neutralizados com as soluções contendo NaOH foram majoritariamente desprotonados. Por outro lado, o acetato da CHI foi hidrolisado quando tratado com solução de etanol sem NaOH. As moléculas de ácido acético geradas foram difundidas na solução de etanol e depois foram removidas. No entanto, esta reação de hidrólise é reversível e incompleta. Portanto, os grupos amino em filmes neutralizados com etanol foram parcialmente desprotonados.

O etanol é utilizado na extração de KGM como método de purificação: as impurezas se solubilizam na solução alcoólica, mas a KGM precipita. O etanol danifica as ligações de hidrogênio da KGM com a água, tornando a mesma insolúvel, ou seja, o etanol precipita a glucomanana, por desidratação (Dave *et al.*, 1998; Takigami, 2009). O NaOH é utilizado para promover a desacetilação da KGM e então promover a formação da estrutura em gel e interação intermoleculares, porém esse processo de gelificação somente ocorre após a desacetilação (Wen *et al.*, 2008). Como o processo de formação de gel da KGM não é instantâneo, a precipitação da KGM por etanol na presença do agente alcalino pode favorecer a formação da membrana, mantendo sua estrutura física enquanto ocorre a reação de desacetilação.

Então, se avalia como essencial a presença de ambos os não solventes quando se tem a intenção de inverter fases de membranas multicamadas, membranas que contenham KGM e CHI em camadas sobrepostas, pois um único não solvente não é capaz de agir nos dois polímeros, sendo então necessário avaliar o efeito da mistura do etanol e do hidróxido de sódio no banho de coagulação.

Com o intuito de avaliar a combinação dos não solventes no banho de inversão de fases e também a quantidade de água presente nas amostras em relação à quantidade de água inicial presente na solução, fez-se um planejamento experimental e avaliou-se as propriedades mecânicas e espessura das membranas de CHI (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados de espessura e propriedades mecânicas das membranas de CHI preparadas de acordo com o planejamento experimental.

Amostra	Concentração de EtOH (%)	Concentração de NaOH (mol/L)	Umidade residual (%)	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)
1	60	0,50	10	0,4625 ± 0,066	1,08 ± 0,17	77,22 ± 15,79
2	90	0,50	10	0,3700 ± 0,064	1,72 ± 0,53	79,68 ± 14,46
3	60	2,00	10	0,4545 ± 0,096	0,85 ± 0,17	33,22 ± 0,04
4	90	2,00	10	0,4678 ± 0,068	0,45 ± 0,22	26,79 ± 17,52
5	60	0,50	40	1,8417 ± 0,156	NA	NA
6	90	0,50	40	1,8913 ± 0,618	NA	NA
7	60	2,00	40	1,3990 ± 0,322	NA	NA
8	90	2,00	40	1,0813 ± 0,105	NA	NA

NA – Amostras não avaliadas devido à sua fragilidade.

Para a CHI, todas as amostras com menor teor de umidade (10%) mostraram-se mais resistentes ao manuseio e com aspecto mais homogêneo do que as mais úmidas (40% de umidade residual), as quais rompiam-se quando da tentativa de qualquer forma de manuseio. As membranas de CHI foram caracterizadas quanto à espessura, e o valor dos efeitos expostos na Tabela 6. Pode-se observar que a umidade residual é o fator principal quando analisada a espessura. Ainda, pelos resultados obtidos, verifica-se que o aumento na umidade residual das membranas é diretamente proporcional ao aumento da espessura.

O NaOH é também um fator estatisticamente significativo, demonstrando que quantidades elevadas de NaOH resultam em membranas mais finas. Esse fato pode estar relacionado com o aumento da interação intermolecular, resultando na compactação do material.

Tabela 6 – Tabela de efeitos para espessura das membranas de CHI.

Fatores	Efeitos	<i>p-valor</i>
[EtOH]	-0,07	> 0,05
[NaOH]	-0,31	< 0,05
Umidade residual	1,13	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]	-0,07	> 0,05
[EtOH]×Umidade residual	-0,06	> 0,05
[NaOH]×Umidade residual	-0,32	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]×Umidade residual	-0,11	> 0,05

As amostras de CHI com 40% de umidade residual não aderiram ao molde, porém nessa condição as membranas obtidas apresentaram-se frágeis ao ponto de romperem-se ao serem manuseadas. A concentração da solução polimérica influencia na taxa de troca do solvente pelo não solvente, pois a resistência à difusão é diretamente proporcional à concentração da solução polimérica. Quanto maior a taxa de transferência de massa, menor a espessura da camada de topo (densa) obtida, assim como uma camada porosa com poros maiores, em alguns casos podendo ocorrer a formação de poros dilatados (*macrovoids*), de maneira que acabam por prejudicar a integridade da estrutura, o que é indesejável (Vandezande *et al.*, 2008). As amostras

com maior quantidade residual de água apresentam por consequência menor concentração de polímero (pois secaram menos), logo, pode ter havido a formação de *macrovoids*, já que as amostras se rasgaram facilmente. Portanto, não foi possível caracterizá-las quanto a resistência à tração e porcentagem de alongamento. Essas respostas foram então obtidas para as membranas com 10% de umidade residual, sendo assim possível analisar a influência da concentração de hidróxido de sódio e etanol no banho de coagulação para estas membranas (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 – Tabela de efeitos para resistência à tração das membranas de CHI.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[EtOH]	0,12	> 0,05
[NaOH]	-0,75	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]	-0,52	> 0,05

Tabela 8 – Tabela de efeitos para % alongamento das membranas de CHI.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[EtOH]	-1,98	> 0,05
[NaOH]	-48,45	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]	-4,44	> 0,05

Ao avaliar a quantidade de hidróxido de sódio, observou-se que as amostras quando imersas em banho com maior teor de hidróxido de sódio (2 mol/L) apresentam menor resistência mecânica, o que pode estar relacionado com a taxa de troca do solvente e não solvente ser maior, pois é maior o gradiente de concentração, o que torna possível o aparecimento de poros muito grandes. Na Tabela 8 pode-se confirmar essas conclusões quando se analisa o valor dos efeitos, pois a concentração de hidróxido de sódio apresenta efeito negativo na resistência à tração.

Quanto à porcentagem de alongamento, observa-se na Tabela 8 que todos os efeitos (concentração de etanol e de hidróxido de sódio) apresentam valores negativos, sendo que a concentração de hidróxido de sódio é o fator que mais influencia negativamente essa resposta.

Quando se analisa o efeito da quantidade de etanol, observa-se que este apresenta valores positivos para resistência à tração e negativo quanto à porcentagem de alongamento. O aumento na quantidade de etanol favorece a desidratação, removendo a água entre as moléculas, o que pode favorecer interações intermoleculares, aumentando assim a resistência à tração. No caso da porcentagem de alongamento, a remoção da água influencia negativamente na capacidade de uma molécula escoar sobre a outra, reduzindo assim a sua capacidade de alongamento. A água atua como plastificante, ou seja, aumenta a processabilidade, flexibilidade e extensibilidade do polímero. Pois, um plastificante provoca mudanças nas propriedades físico-químicas do polímero, aumenta o espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local e, conseqüentemente, aumenta a mobilidade (Bodmeier e Paeratakul, 1997).

Segundo He *et al.* (2011), filmes de CHI neutralizados com solução composta por NaOH e etanol, apresentaram maior módulo elástico, menor alongamento e maior tensão na ruptura quando comparados com as neutralizações feitas com esses componentes isoladamente. Esses autores utilizaram a concentração de 0,5 mol/L de NaOH e 80% de etanol, ou seja, os níveis dos fatores concentração de etanol e NaOH estão adequados para a neutralização da CHI. A diferença está na concentração de polímero, que nesta tese utilizou-se solução 0,8% e os autores do estudo supracitado utilizaram 2%, e secaram até obtenção de um filme seco. A concentração de polímero na solução a ser moldada não foi variada, porém a umidade residual reflete nessa característica, pois membranas que secaram mais, ou seja, que têm maior quantidade de polímero, apresentaram melhores resultados.

Utilizou-se essa quantidade de polímero na formação das membranas, pois a KGM apresenta dificuldade de homogeneização e remoção de bolhas de ar nas soluções com concentrações maiores que 1%, devido à alta viscosidade.

Para a KGM, a avaliação da combinação dos não solventes no banho de inversão de fases e também a quantidade de água presente nas amostras em relação à quantidade de água inicial presente na solução, ficou comprometida devido a má formação das membranas. Então, a avaliação dos parâmetros em relação à análise de CHI ficou desemparelhada. Observou-se então o grau de encolhimento sofrido pelas membranas de KGM no banho de inversão de fases e fez-se uma breve descrição visual das características dessas membranas (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados de grau de encolhimento e descrição das membranas de KGM preparadas de acordo com o planejamento experimental.

Amostra	Concentração de EtOH (%)	Concentração de NaOH (mol/L)	Umidade residual (%)	Encolhimento (fração do diâmetro do molde)	Descrição das amostras
1	60	0,50	10	1,00 ± 0,00	Membrana lisa, resistente, maleável.
2	90	0,50	10	0,84 ± 0,02	Resistente, menos maleável que amostra 1.
3	60	2,00	10	0,93 ± 0,04	Resistente, transparente, maleável, levemente pegajosa.
4	90	2,00	10	0,54 ± 0,06	Transparente, frágil, pegajosa.
5	60	0,50	40	0,73 ± 0,02	Frágil, possui parte superior mais consistente, mas inferior gelatinosa.
6	90	0,50	40	0,62 ± 0,03	Frágil, com 2 camadas bem distintas, superior mais consistente e inferior gelatinosa.
7	60	2,00	40	0,22 ± 0,02	Membrana completamente desfigurada.
8	90	2,00	40	0,26 ± 0,02	Membrana completamente desfigurada.

Para analisar o efeito das variáveis no preparo das membranas, avaliou-se então o encolhimento das mesmas, pela medida da fração do diâmetro final das amostras em relação ao diâmetro do molde. Como as membranas não se apresentavam na forma circular, fez-se medidas de diâmetro, considerando as maiores e menores medidas do diâmetro de uma mesma membrana, para obter-se um valor aproximado. Valor este que foi utilizado para comparação com o valor do diâmetro do molde. A análise estatística considerando o encolhimento está exposta na Tabela 10.

Tabela 10 – Tabela de efeitos para encolhimento das membranas de KGM.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[EtOH]	-0,15	< 0,05
[NaOH]	-0,31	< 0,05
Umidade residual	-0,37	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]	-0,02	> 0,05
[EtOH]×Umidade residual	0,13	< 0,05
[NaOH]×Umidade residual	-0,12	< 0,05
[EtOH]×[NaOH]×Umidade residual	0,09	< 0,05

Os efeitos negativos para o encolhimento significam que são favoráveis ao encolhimento, pois apresentam menor fração do diâmetro do molde. Como pode-se observar na Tabela 10, a variável que apresenta maior efeito no encolhimento das membranas é a umidade residual. Sendo que, maior concentração de água nas membranas resulta em menor fração do diâmetro, ou seja, maior deformação das membranas. Todos os efeitos isolados favorecem o encolhimento. Fotos das membranas de KGM resultantes do planejamento experimental estão expostas na Figura 8. A combinação dos fatores 40% de umidade residual e 2 mol/L de NaOH, resultaram em membranas desfiguradas.

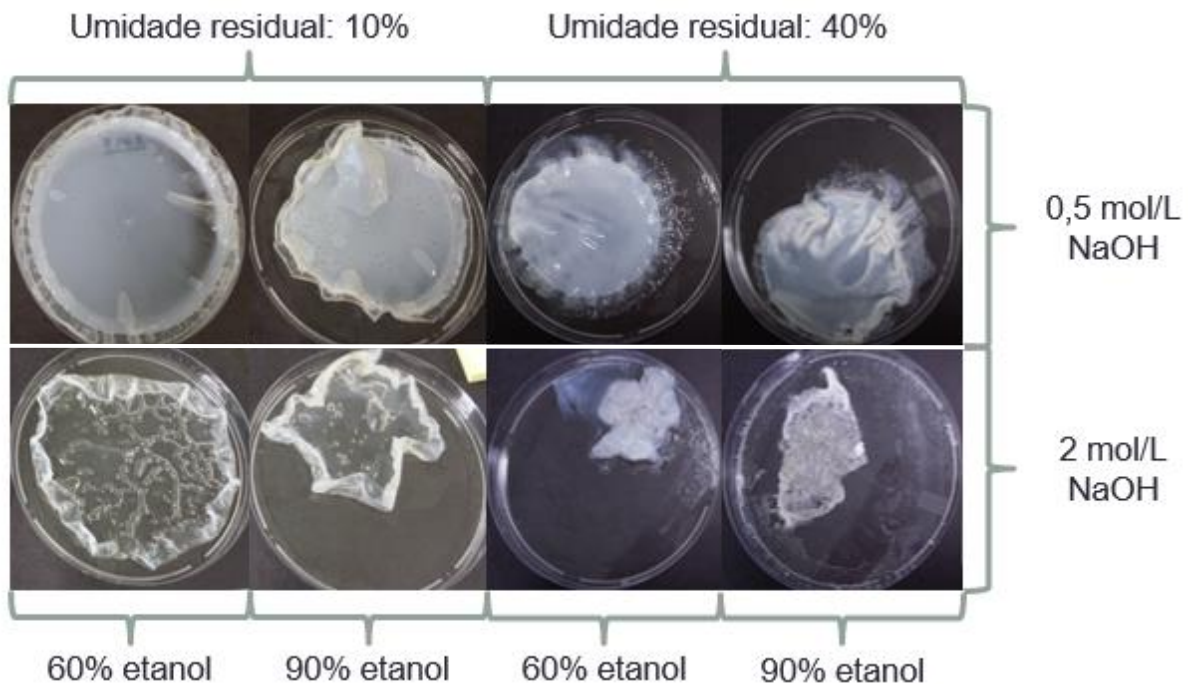


Figura 8 – Fotos das membranas de KGM do planejamento experimental.

A concentração de hidróxido de sódio presente no banho foi um fator bastante relevante, pois as amostras imersas em banho com maior concentração desse componente alcalino apresentaram maior encolhimento. Esta variável apresenta efeito negativo maior do que a concentração de etanol, que em maior concentração também resulta na perda de seu tamanho original, devido à desidratação. Esse resultado demonstra que a concentração de etanol e hidróxido de sódio deve ser ajustada, de modo a garantir a formação das membranas, mas sem desidratá-las a ponto de interferir na integridade da sua estrutura. O etanol é essencial para precipitação da KGM, mas em grandes quantidades acaba por deformar as membranas, especialmente quando misturado com quantidades elevadas de hidróxido de sódio. A interação dos fatores concentração de etanol e NaOH apresentou efeito negativo, ou seja, a mistura dos não solventes utilizados acaba por intensificar o encolhimento das membranas, de maneira que as membranas que apresentam as maiores concentrações de etanol e NaOH apresentaram-se mais retorcidas.

A concentração de KGM na solução polimérica deveria ter sido avaliada, pois como pode-se observar na Tabela 10, a umidade residual, que está diretamente relacionada com a concentração do polímero, apresenta efeito significativo no encolhimento das membranas, tanto isolada quanto em qualquer interação com os demais fatores. Uma maior concentração do polímero na solução influenciaria negativamente na taxa de transferência de massa entre o

solvente e o não solvente, ou seja, ocorreria de maneira mais lenta, o que provavelmente auxiliaria na manutenção da estrutura física da membrana a ser formada.

Essa primeira avaliação dos fatores necessários ao processo de obtenção das membranas, demonstrou que a umidade residual é o fator principal no que diz respeito à formação de membranas resistentes ao manuseio, passíveis de serem caracterizadas. Assim, para o preparo das membranas em camadas, a umidade residual deve ser menor do que 40%, pois nessa condição tanto membranas de KGM quanto de CHI não apresentaram resistência suficiente para manipulação.

Outro procedimento que pode influenciar o processo de inversão de fases, diminuindo a taxa de transferência entre o solvente e o agente coagulante, é o congelamento das membranas. Pois, dessa maneira, adiciona-se um segundo fenômeno termodinâmico ao processo de obtenção das membranas. O solvente primeiramente precisa passar do estado sólido ao líquido para só então dar lugar ao não solvente (agente coagulante), ocorrendo assim a inversão de fases. A utilização de congelamento e inversão de fases é descrita a seguir, no item 5.1.2.

5.1.2 Membranas de KGM e CHI puras utilizando congelamento

As membranas de CHI e KGM avaliadas nesse tópico não apresentaram encolhimento, demonstrando que uma maior concentração do polímero é primordial para a obtenção de membranas íntegras, especialmente de KGM. As membranas de CHI resultaram em um material resistente, com bom aspecto visual.

Para a KGM o resultado foi surpreendente, pois a estrutura mostrou-se visivelmente porosa, resistente ao manuseio, maleável. Ao se analisar a morfologia por MEV, notou-se que a membrana não apresentou uma região densa, ou seja, a membrana obtida não é assimétrica. Mas, por outro lado apresentou poros grandes, na ordem de 200 μm , como se mostra na Figura 9b.

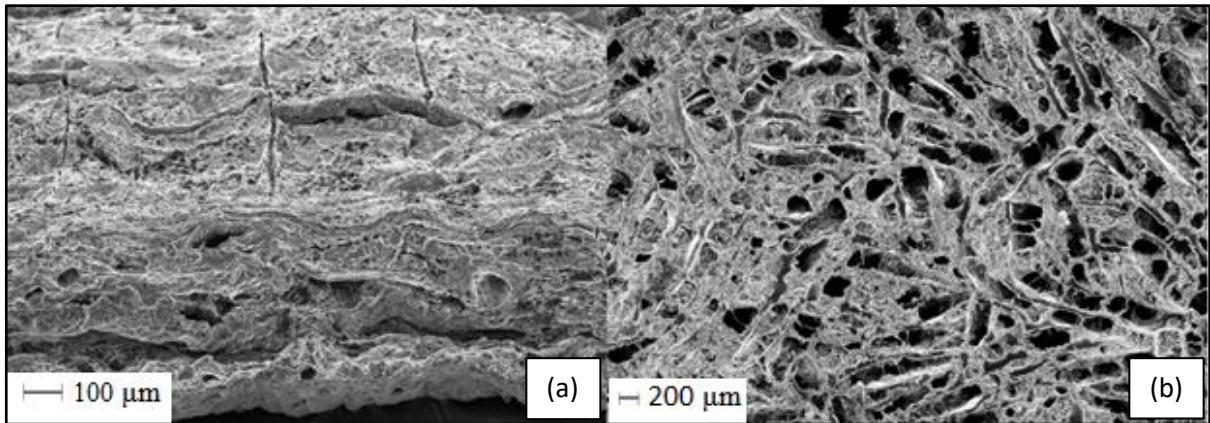


Figura 9 – Micrografias de membranas de a) CHI (fratura) e b) KGM (superfície) submetidas ao congelamento.

As membranas de CHI também não se mostraram assimétricas (Figura 9a), apresentando poros pequenos quando comparados com os poros da membrana de KGM, podendo ser considerada uma membrana densa (ou com poros menores). Ao congelar as amostras e posteriormente imergir em banho para inversão de fases, combina-se duas técnicas de obtenção de poros. Se fosse considerado somente o congelamento das amostras, esperava-se um comportamento parecido entre os dois polissacarídeos, porém quando comparamos as imagens de microscopia da KGM e CHI observa-se uma grande diferença, o que leva a concluir que a taxa de troca entre solvente e não solvente para a KGM ocorre de maneira mais rápida, apesar da baixa temperatura. Outro fator que pode ser levado em conta é a grande concentração de etanol, que pode estar limitando a transferência de massa entre o hidróxido de sódio e o solvente da CHI. Outros autores já relataram que o uso de álcoois em alta concentração no banho de coagulação pode interferir na taxa de transferência de massa, sendo usado para evitar a formação de *macrovoids* (Vandezande *et al.*, 2008).

5.1.3 Membranas de KGM e CHI em camadas utilizando congelamento

Membranas compostas por uma camada de KGM e outra de CHI foram satisfatoriamente preparadas. As membranas nomeadas KGM/CHI referem-se àquelas em que a primeira camada é composta por KGM e a segunda CHI, e quando o oposto, nomeadas de CHI/KGM.

A membrana KGM/CHI apresentou leve encolhimento, o que não foi observado, ou pelo menos é muito sutil, na membrana CHI/KGM. Ambas membranas são pouco resistentes

ao manuseio, apesar de serem maleáveis. A membrana CHI/KGM adere ao molde, resultando em dificuldade na remoção.

Quando se analisa a morfologia das membranas KGM/CHI (Figura 10), pode-se observar que a membrana possui duas faces, uma porosa e outra densa. Portanto, a obtenção de uma membrana assimétrica com camadas de ambos os polímeros em investigação foi alcançada.

Comparando as faces da membrana obtida com as membranas puras, observa-se claramente que a parte porosa da membrana KGM/CHI é similar à membrana de KGM pura. O interessante é que, teoricamente, da maneira como foi preparada essa membrana, esperava-se obter uma membrana mais densa de KGM, visto que é a camada base e a umidade residual é de apenas 10%. Uma hipótese para o ocorrido é o fato da KGM ser altamente hidratável, podendo ter absorvido água da solução de CHI.

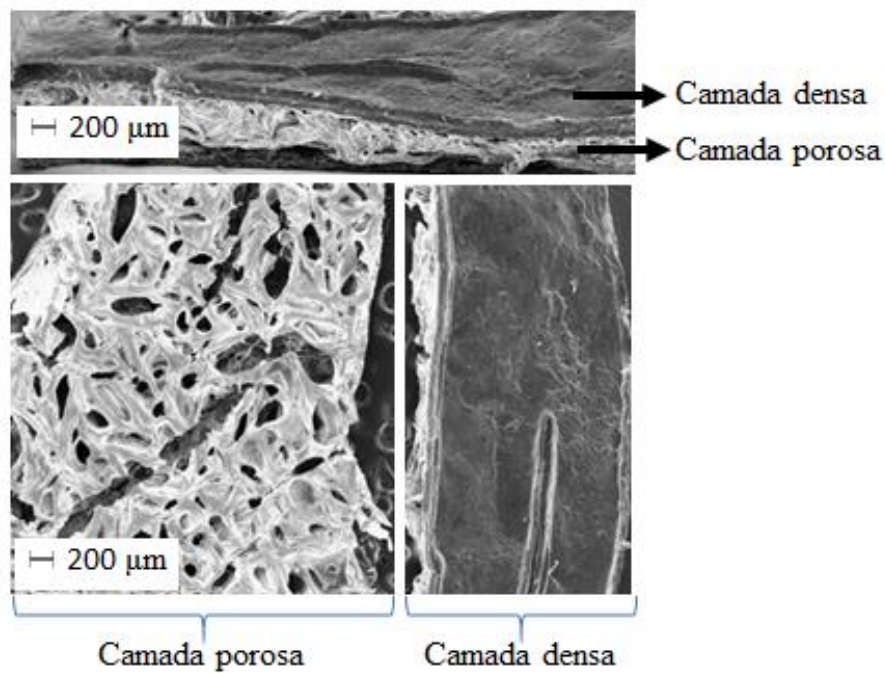


Figura 10 – Micrografias da fratura e superfícies de membranas KGM/CHI.

Apesar de ter apresentado encolhimento nas bordas, a membrana KGM/CHI apresentou características mais próximas das que se buscava, pois é maleável e possui as faces, porosa e densa, bem definidas.

Na Figura 11 pode-se observar a morfologia da membrana CHI/KGM. Nota-se que na fratura (Figura 11a) há uma camada mais densa e outra porosa. Porém, quando se analisa as faces dessa membrana, nota-se que há uma película densa sobre a região porosa (Figura 11b). Não é possível afirmar, mas como a KGM apresentou estruturas com poros grandes nas membranas puras, supõe-se que a camada porosa na membrana CHI/KGM também se refere à KGM, camada superior. Esta camada possui uma porcentagem de água residual intencionalmente maior que a base para que posteriormente, com o congelamento, haja a formação de cristais de gelo, resultando nos poros após o degelo. Na etapa de secagem, é possível que ocorra a formação de uma película na interface com o meio, o que pode justificar o fato da membrana CHI/KGM não apresentar qualquer face com poros aparentes.

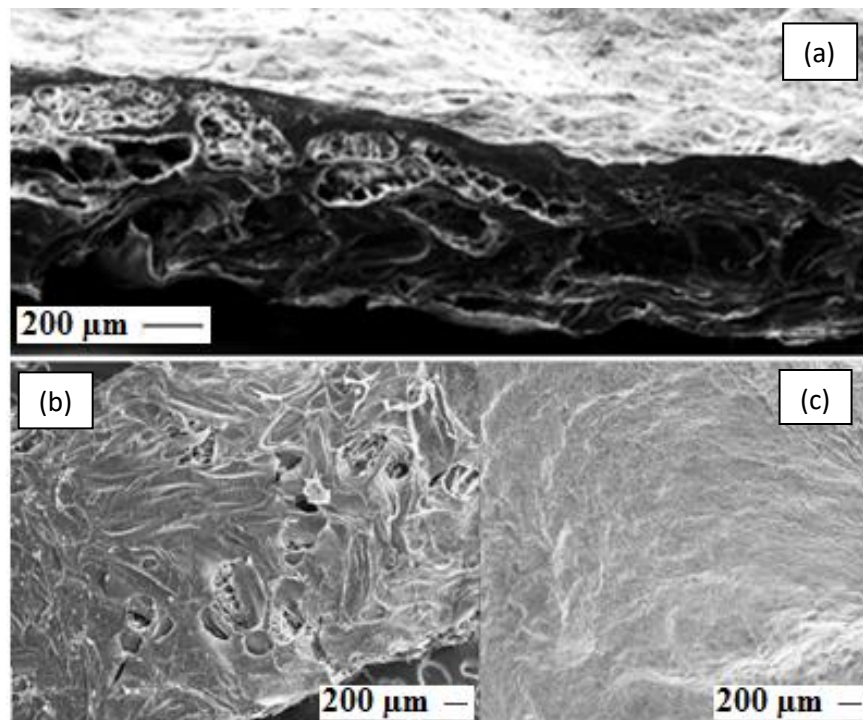


Figura 11 – Micrografias da a) fratura, b) superfície de fundo e c) superfície de topo das membranas CHI/KGM.

Uma vez que a membrana KGM/CHI apresentou estrutura assimétrica melhor definida, deu-se continuidade nas caracterizações apenas para este tipo de membrana.

5.1.3.1 Caracterizações físicas

A taxa de transmissão de vapor de água (TVA), através da superfície da membrana, determina o ambiente úmido da ferida que é crucial para o processo de cicatrização.

Uma TVA excessiva provoca rápida perda de fluido, resultando em desidratação da ferida e também adesão do curativo no leito da ferida, que pode causar desconforto e dor, principalmente quando for necessária a remoção do mesmo. Por outro lado, um baixo valor de TVA pode resultar em retenção do exsudato, excesso de umidade, que leva a maceração do tecido saudável circundante da ferida (Elsner e Zilberman, 2010; Chen *et al.*, 2011).

A TVA depende das propriedades estruturais (espessura e porosidade) dos curativos, e também das propriedades químicas do material a partir do qual é fabricado (Morgado *et al.*, 2014). A TVA das membranas assimétricas é diretamente proporcional à porosidade da camada esponjosa, e a difusão de moléculas de água diminui com o aumento da espessura da camada densa (Chen *et al.*, 2011). Fatores como umidade relativa e temperatura também podem influenciar a TVA (Dias *et al.*, 2011).

Neste contexto, os curativos devem apresentar taxas de transmissão de vapor de água adequadas, para garantir um ambiente propício à cicatrização. A TVA das membranas assimétricas KGM/CHI observadas neste estudo é de $261,8 \pm 85,9 \text{ g/m}^2\cdot\text{dia}$. Este valor de transmissão de vapor de água está de acordo com a faixa de valores de curativos comerciais ($76 - 9360 \text{ g/m}^2\cdot\text{dia}$), encontrados na literatura (WU *et al.*, 1995). Foram avaliadas também a tensão de ruptura e a porcentagem de alongamento das membranas KGM/CHI, que apresentaram valores de $70,2 \pm 47,9 \text{ kPa}$ e $22,23 \pm 8,37 \%$, respectivamente. A pele humana apresenta valores de tensão na ruptura no intervalo de 2,5 a 16 MPa (Silver, 1994 *apud* Wang *et al.*, 2002). Os valores de tensão na ruptura obtidos para as membranas KGM/CHI desenvolvidas nesse trabalho são inferiores aos da pele normal. As membranas são pouco resistentes ao manuseio, pois rompem-se facilmente. O percentual de alongamento das membranas também foi baixo para a finalidade proposta, já que a pele humana apresenta elasticidade de aproximadamente 70% (Hansen e Jemec, 2002). Os valores variam com a região da pele e com a idade da pessoa. O envelhecimento é responsável pela diminuição da hidratação da pele e, como a água atua como plastificante, interfere diretamente na sua resistência ao alongamento.

Os baixos valores nos ensaios mecânicos provavelmente estão relacionados aos grandes espaços vazios (*macrovoids*) formados na camada porosa. Uma nova metodologia deve ser investigada de modo a reduzir essas falhas mecânicas, sendo que uma maior concentração dos polímeros e/ou menor quantidade residual de água nas membranas podem interferir

positivamente nas propriedades mecânicas. Uma camada densa mais espessa provavelmente proporcionaria um aumento na tensão de ruptura desses materiais.

5.1.4 Conclusão parcial

O estudo de obtenção das membranas de CHI e KGM possibilitou o entendimento sobre quais são os fatores principais no processo de formação desses materiais. Verificou-se que o hidróxido de sódio não atuou como coagulante para a KGM nas concentrações estudadas apesar de ser muito usado na formação dos géis desse polissacarídeo e que o etanol sozinho não é capaz de precipitar a CHI. Então, o banho de coagulação para membranas em camadas de CHI e KGM deve conter uma combinação desses dois não solventes.

Para ambos os polímeros, a umidade apresentou efeitos significativos na obtenção das membranas, pois em todos os casos a alta umidade se mostrou inapropriada, resultando em estruturas frágeis, algumas até perderam a sua integridade estrutural. O uso de etanol em altas concentrações também se mostrou um fator negativo, principalmente na obtenção de membranas de KGM, que sofrem com encolhimento devido à desidratação.

A combinação das técnicas, congelamento e inversão de fases, apresentou resultados satisfatórios, membranas de KGM resultantes desse procedimento apresentaram poros na ordem de 200 μm , enquanto que a CHI apresentou uma estrutura com poros menores. Quando os polímeros foram combinados em camadas, essas características permaneceram, sendo que a membrana KGM/CHI apresentou uma estrutura assimétrica bem definida, bastante interessante para a aplicação em questão. Porém, essa membrana apresentou baixa resistência mecânica, rompendo-se ao ser manuseada, o que dificulta o seu uso como curativo.

5.2 Membranas assimétricas obtidas por secagem parcial e congelamento

5.2.1 Membranas assimétricas de KGM e SF

Primeiramente, tentou-se incorporar os fios de SF moídos na solução de KGM. Mas a granulometria dos fios resultantes da moagem não era homogênea, o que resultava em uma dispersão irregular. Para conseguir uma mistura mais homogênea era necessária a separação manual dos fios (utilizar somente os fios mais finos). Além disso, é difícil a dispersão das fibras de SF na solução de KGM, devido à sua alta viscosidade. Portanto, decidiu-se trabalhar com blendas de SF e KGM. Na Figura 12 estão expostas imagens das soluções de KGM contendo os fios de seda moídos e solução contendo fios após a separação manual.

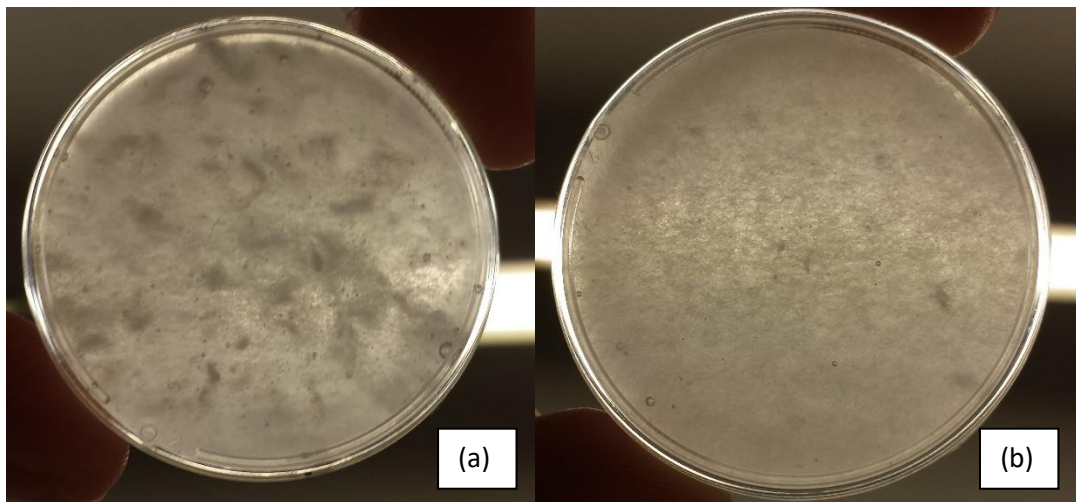


Figura 12 – Aspecto das soluções (vista inferior de placas de Petri) de KGM com fios de SF
a) moídos e b) moídos e separados manualmente.

As blendas foram produzidas em condições favoráveis a formação de gel de KGM, ou seja, na presença de NaOH. Essa condição alcalina permite uma boa interação entre os biopolímeros, não havendo separação de fases. As interações entre as moléculas de SF são enfraquecidas em valores de pH básicos, pois nessas condições há predominância de conformação seda I, com maior exposição dos sítios ativos (Du *et al.*, 2009), favorecendo assim a interação entre os biopolímeros.

Segundo Kim *et al.* (2004) há uma grande influência do pH na interação entre as moléculas de SF, sendo que a interação intermolecular da SF é acentuada a medida que o pH diminui de 7. A solução se torna gradativamente mais viscosa e turva, sendo que em pH 5 as interações são fortes a ponto de haver a formação de gel, com predominância de conformação estável (seda II).

A solução de etanol 70% foi utilizada para estabilizar a fibroína de seda, pois na presença deste solvente, a SF é induzida para sua conformação estável, tipo Seda II, devido à desidratação de suas cadeias (Nam e Park, 2001).

Devido à dificuldade do preparo de membranas assimétricas de KGM por inversão/precipitação, combinou-se técnicas de preparo de gel de KGM, contendo NaOH, com secagem parcial, adicionando uma etapa de congelamento para auxiliar na formação dos poros na região da membrana com maior quantidade de água. Essa estratégia baseou-se no fato de que a técnica de inversão de fases utiliza-se do processo de secagem parcial para obter regiões

com diferentes quantias de água, com a finalidade de alterar a taxa de troca do solvente pelo não solvente, para obtenção de estruturas diferentes. E, também, que o hidróxido de sódio não coagula instantaneamente a KGM, mas é o responsável pela gelificação da mesma.

Com o intuito de preparar membranas assimétricas, contendo uma camada superficial (voltada ao ambiente) mais densa e uma camada inferior (em contato com a ferida) mais porosa, preparou-se um material de maneira a formar um hidrogel fino durante a etapa de secagem (*casting*). As membranas foram secas até restar 20% da massa inicial das mesmas. A umidade residual foi definida baseada nos estudos preliminares de formação das membranas, apresentadas no tópico 5.1, onde foi apresentado que membranas com grande conteúdo de água são frágeis e muitas delas não resistem ao manuseio. Porém, para conseguir uma estrutura assimétrica é necessário que a membrana apresente uma fração significativa de água residual.

No processo de secagem, ocorre a formação de uma película na superfície da amostra, onde o material encontra-se mais concentrado devido à perda da umidade para o meio. Essa face da membrana fica com poros menores em relação à face inferior da membrana.

A membrana obtida é um material bastante resistente ao manuseio, com aspecto muito interessante para a aplicação em questão. A Figura 13 mostra a fotografia da amostra com 100% de KGM.



Figura 13 – Fotografia da membrana contendo 100% de KGM.

Ao analisar a morfologia das membranas de KGM puras e blendas de SF por MEV (Figura 14), notou-se que todas as membranas analisadas apresentaram uma face mais densa e outra mais porosa, porém a membrana com 100% KGM (Figura 14b) apresentou uma estrutura de poros interconectados e melhor definidos do que as demais, apresentando a estrutura que se almejava.

Na Figura 14e, observa-se a presença de algumas partículas sobre a superfície, que foram identificadas, utilizando a técnica de EDS, como cálcio, proveniente da solução de cloreto de cálcio utilizada para dissolver a SF. A solução de SF passa por uma etapa de diálise para a remoção dos sais de cálcio utilizados para solubilização das fibras, porém o processo não remove completamente os sais, de forma que pequenas quantidades de cloreto de cálcio ficam ainda retidas no material (Reis *et al.*, 2016). Como essa membrana apresenta maior quantidade de SF, ficou mais evidente a presença de cálcio na sua superfície.

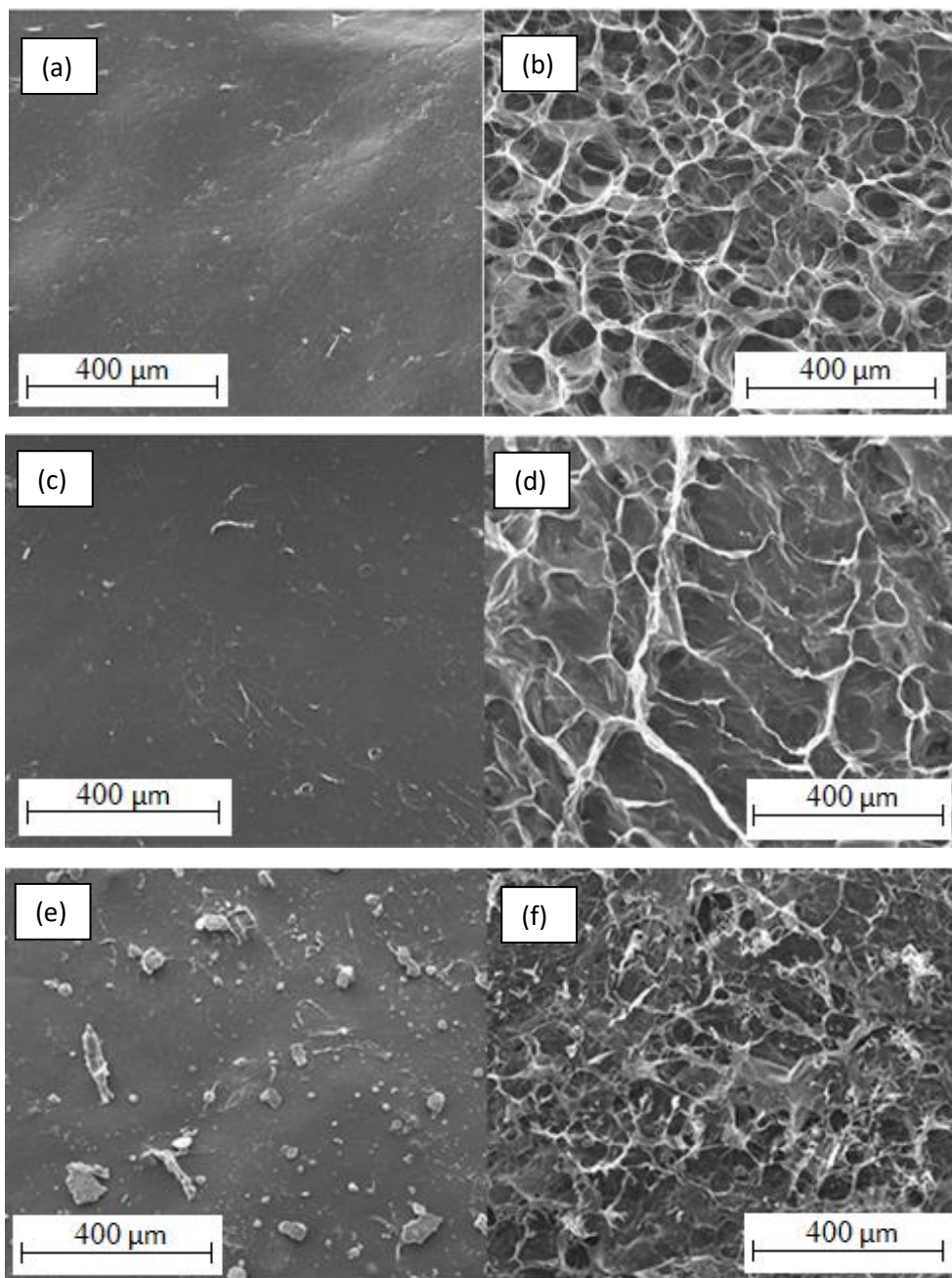


Figura 14 - Micrografias de membranas de a) e b) 100% KGM, c) e d) 75% KGM e 25% SF, e) e f) 50% KGM e 50% SF. As imagens a), c) e e) referem-se às superfícies de topo das membranas e as demais, às faces inferiores (fundo).

5.2.1.1 Citotoxicidade direta

A proliferação celular nos dias 1 e 4 de cultura foi quantificada pela medida da intensidade de fluorescência resultante da reação do reagente resazurina com células viáveis. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da proliferação celular nas membranas de KGM 100%, KGM 75% - SF 25% e KGM 50% - SF 50%.

Membranas	Proliferação celular	Proliferação celular
	na superfície de topo (%)	na superfície de fundo (%)
KGM 100%	673 ± 155	789 ± 219 ^a
KGM 75% - SF 25%	842 ± 181	805 ± 350 ^{a,b}
KGM 50% - SF 50%	1032 ± 302	985 ± 198 ^b

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t-Student.

Pode-se observar que a adição de SF apresenta capacidade de proliferação de células similar às amostras de KGM pura, sendo que há diferença significativa apenas entre as amostras KGM 100% e KGM 50% - SF 50% na superfície de fundo. Os fibroblastos foram capazes de proliferar em ambas as superfícies, não apresentando diferença estatisticamente significativa na proliferação de células entre elas. A proliferação celular em todas as membranas testadas foi expressiva, mostrando que os materiais produzidos são capazes de dar suporte ao crescimento celular, pois as células foram capazes de aderir e proliferar no material.

A placa de cultura sem membranas foi utilizada como controle. A proliferação celular para o controle foi inferior às amostras, 305 ± 234%, isto pode ser explicado pelo fato de que as membranas apresentam uma área superficial maior para células se aderirem, uma vez que há a possibilidade das células migrarem para o interior do material devido à presença dos poros. Por isso, o erro associado às medidas do controle no quarto dia de cultura é maior (Tabela 12), pois algumas amostras possivelmente já haviam atingido confluência e se descolado da placa.

Tabela 12 – Valores de intensidade de fluorescência das amostras e do controle no primeiro e no quarto dia de cultura celular.

Amostras	Intensidade de fluorescência (u. a.)	
	Dia 1	Dia 4
Placa	5268 ± 788 ^a	22278 ± 13583 ^a
KGM 100% topo	3363 ± 405 ^{b,c}	25935 ± 5443 ^a
KGM 100% fundo	3174 ± 206 ^b	28098 ± 6924 ^a
KGM 75% - SF 25% topo	3285 ± 363 ^b	30635 ± 5009 ^{a,c}
KGM 75% - SF 25% fundo	3278 ± 206 ^b	29953 ± 12629 ^a
KGM 50% - SF 50% topo	3358 ± 229 ^b	38309 ± 11496 ^{b,c}
KGM 50% - SF 50% fundo	3771 ± 134 ^c	40784 ± 6860 ^b

^{a,b,c} letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t-Student.

Pode-se observar na Tabela 12 que no primeiro dia todas as membranas apresentavam aproximadamente a mesma intensidade de fluorescência, indicando que havia aproximadamente o mesmo número de células viáveis nas amostras. No dia 4, observa-se aumento na proliferação para todas as amostras. O erro associado às medidas é grande, especialmente no cultivo das células direto na placa (controle) e como já citado anteriormente, é justificado pelo fato de que no quarto dia de cultura a concentração de células era muito alta, algumas amostras possivelmente se encontravam em confluência. Ou seja, o fato de algumas amostras conterem menos células não necessariamente indica que não proliferaram, pode ser que já haviam crescido demasiadamente e descolaram da placa e/ou das membranas.

Do ponto de vista de preparo das amostras, o fato das membranas KGM 100% apresentar capacidade de proliferação de células similar aos materiais contendo SF é favorável, pois o preparo da solução de KGM é simples quando comparado com a SF, além de ser um material 100% de origem vegetal.

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentadas imagens das amostras 100% KGM durante a cultura celular. A Figura 15 apresenta imagens de microscopia confocal e a Figura 16 imagens de microscopia eletrônica de varredura.

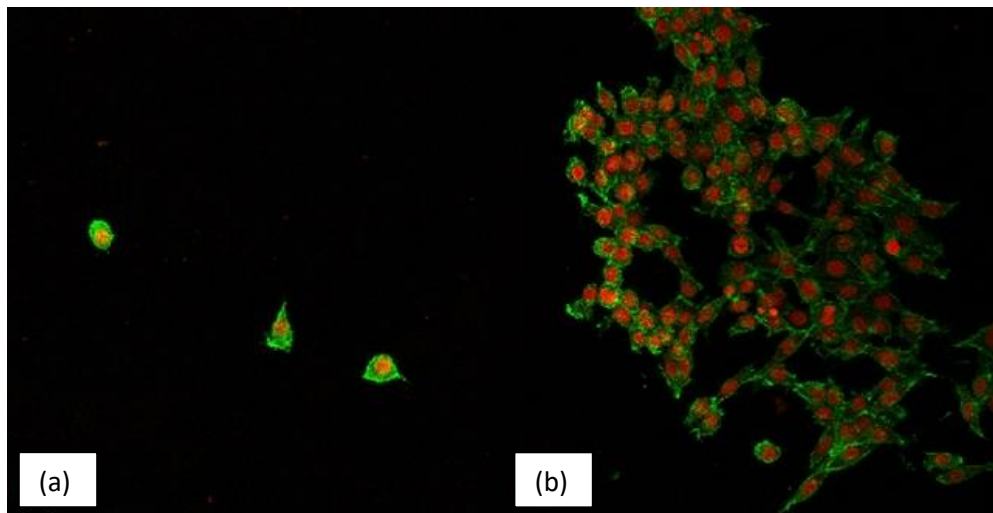


Figura 15 – Imagens de microscopia confocal das membranas de KGM 100% nos dias (a) 1 e (b) 4 de cultura celular.

Na Figura 15 pode-se observar em verde o citoesqueleto das células e em vermelho o núcleo. Após 1 dia de cultura a concentração celular era baixa e as células apresentavam-se arredondadas, o que pode ser justificado pelo fato das células ainda estarem se adaptando ao material. Já no quarto dia de cultura a população de células aumentou consideravelmente e boa parte das células apresentavam formato alongado, típico de fibroblastos bem instalados.

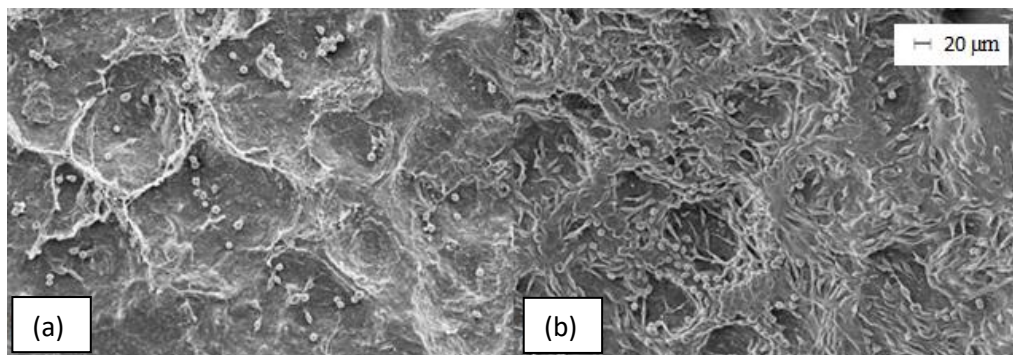


Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica da cultura celular nos dias (a) 1 e (b) 4 nas membranas 100% KGM.

Na Figura 16 novamente pode-se observar que a população de células no primeiro dia de cultura era baixa e que as células proliferaram bem, ocupando quase que totalmente a superfície da membrana de KGM no quarto dia de cultura. A morfologia das células é observada nas imagens de microscopia eletrônica e confirma as características descritas na imagem de microscopia confocal.

Curativos que precisam ser removidos não devem apresentar adesão de células para não danificar o tecido regenerado, mas não devem apresentar citotoxicidade. Portanto, estudos futuros serão necessários para verificar detalhadamente o período de adesão das células na membrana e então definir o tipo da aplicação do curativo. O curativo precisa ser trocado antes que ocorra adesão do tecido regenerado no material, ou então, deve ser absorvido pelo organismo, sem a necessidade da remoção (troca).

As amostras de KGM pura apresentaram resultados dos testes biológicos similares às amostras contendo SF. Uma vez que o processamento da SF é mais trabalhoso e demanda tempo consideravelmente maior que o procedimento de preparo de membranas puras de KGM, além de ser um material de origem animal, decidiu-se continuar investigando apenas as membranas de KGM para uso como curativo.

Um dos objetivos desta tese era o desenvolvimento de tecnologia passível de ser transferida para a indústria. No decorrer destes experimentos oportunamente tivemos contato com a Inova, agência de inovação da Unicamp, que nos aconselhou sobre o interesse de indústrias em processos simples e de baixo custo. Isto nos encorajou a seguir na decisão de estudar as membranas puras de KGM como curativos. Portanto, as caracterizações que seguem neste trabalho foram feitas apenas para as membranas assimétricas de KGM pura.

5.2.2 Membranas assimétricas 100% KGM

5.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Analisou-se a morfologia de membranas KGM sem a etapa de congelamento (Figura 17), para verificar se a estrutura assimétrica já era alcançada sem essa etapa. A membrana sem congelar tem aspecto diferente ao tato nas superfícies de topo e fundo. Conforme pode-se observar na Figura 17a, as superfícies de topo e fundo apresentam rugosidades diferentes, porém nas imagens de MEV não foi possível detectar estruturas densa e porosa bem definidas. Na fratura observa-se poros pequenos em relação às amostras que foram congeladas, mas é possível perceber uma divisão, um lado apresenta maior concentração de poros de diâmetros maiores.

Apesar de não passar pela etapa de congelamento, era esperado verificar alguma diferença entre as faces, pois a parte de topo da membrana que fica exposta ao meio no momento da secagem, fica mais concentrada em polímero visto que perde mais água. Então, mesmo não

apresentando poros grandes promovidos pela formação de cristais de gelo, o espaçamento entre as cadeias poliméricas deve ser maior onde há maior quantidade de água. Portanto, prosseguiu-se com os experimentos utilizando a etapa de congelamento, a fim de se obter uma estrutura assimétrica bem definida nas membranas.

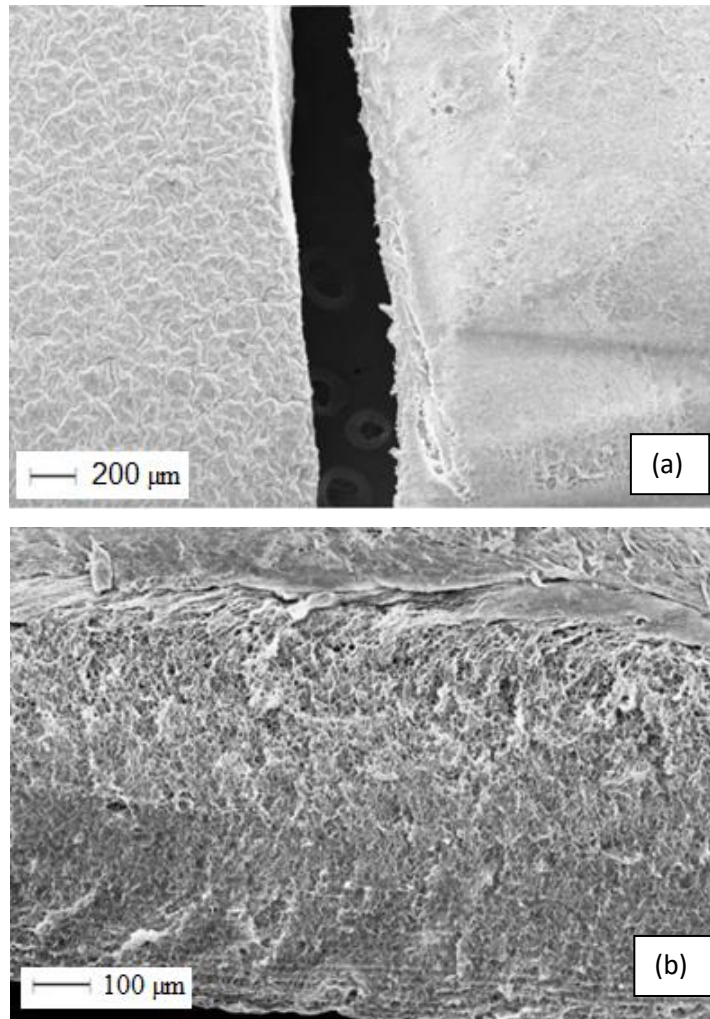


Figura 17 – Micrografias de membranas de KGM sem a etapa de congelamento da a) superfície de fundo e topo e b) fratura.

A fim de verificar a influência da desinfecção com etanol nas propriedades das membranas obtidas, foi feita a imersão das membranas no etanol 70% e suas propriedades foram comparadas com as da membrana que não passaram pelo processo de desinfecção (não tratadas). A Figura 18 apresenta micrografias de membranas 100% KGM que foram tratadas com etanol 70% em comparação com membranas que não passaram por esse tratamento.

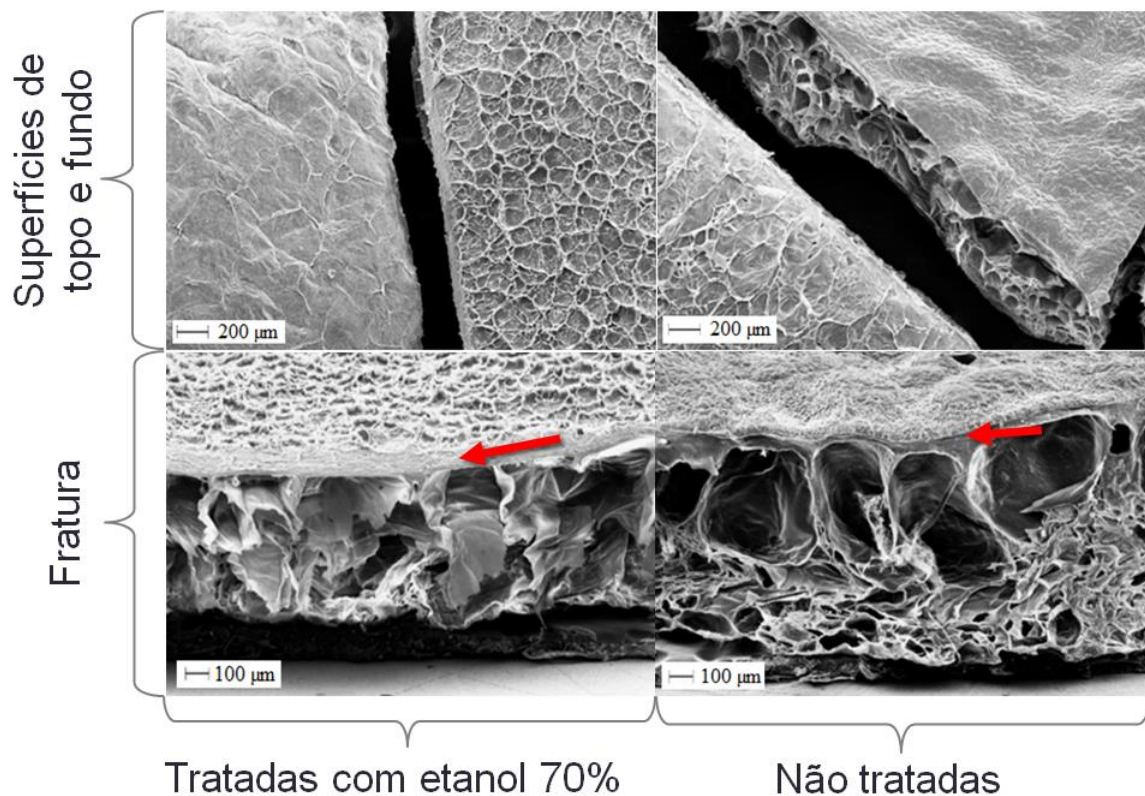


Figura 18 – Micrografias de membranas de KGM tratadas com etanol 70% e não tratadas. Imagens das superfícies de topo e fundo e fraturas. As setas indicam as camadas densas das membranas.

Pode-se observar nas imagens de fraturas da Figura 18 que tanto as membranas tratadas com etanol quanto às não tratadas apresentam estrutura porosa no seu interior, e também uma camada mais densa. Apesar da superfície de topo da membrana tratada aparentar ser mais porosa, nota-se na fratura que é uma estrutura superficial, sem conexão com o interior.

Em ambas as amostras a superfície de fundo não mostra poros abertos. Uma fina camada (película) parece cobrir os poros, pois na fratura não é possível distinguir essa camada. Para a amostra não tratada foi possível observar que em alguns pontos essa película se rompe e os poros ficam visíveis (Figura 19).

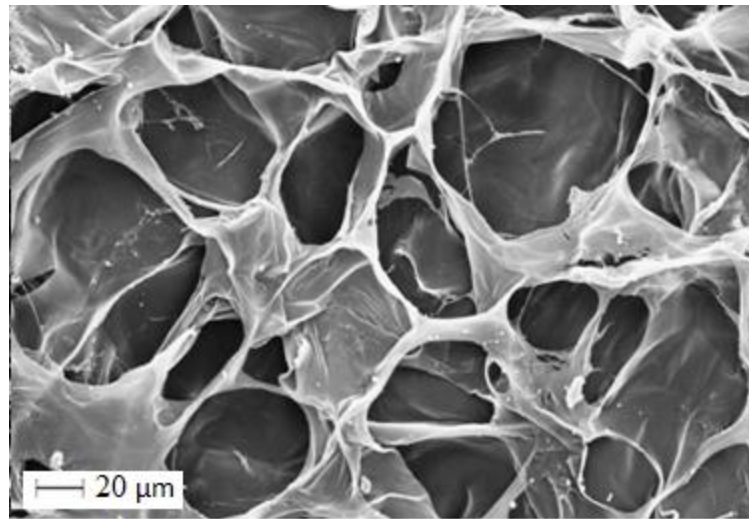


Figura 19 – Micrografias da superfície de fundo de membranas de KGM não tratadas com etanol.

Foi observado que durante o procedimento de desinfecção as membranas se desidratam e perdem a maleabilidade. Na etapa de lavagem, as membranas absorvem água e se tornam flexíveis novamente. Apesar do tratamento com etanol 70% alterar as características da membrana durante a imersão na solução alcoólica, não foram observadas alterações significativas na estrutura final das membranas.

5.2.2.2 Análises mecânicas

Um biomaterial deve possuir características mecânicas adequadas para sua aplicação, além de permitir seu fácil manuseio e armazenamento. Um curativo deve resistir às deformações naturais exercidas pela pele sem ser danificado, deve ser flexível, mas, ao mesmo tempo, estável e resistente o suficiente para cobrir a superfície da ferida ao longo do período de cicatrização. Deve apresentar fácil manuseio durante a cobertura da ferida, maximizando o conforto do paciente (Liu *et al.*, 2013 e Elsner e Zilberman, 2010). Assim, foram avaliadas a tensão de ruptura, a porcentagem de alongamento e o módulo elástico das membranas assimétricas de KGM. Os resultados dos testes mecânicos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados do teste de resistência à tração das membranas assimétricas de KGM tratadas com etanol e não tratadas.

	Tensão de ruptura (MPa)	% Alongamento	Módulo elástico (MPa)
Membranas tratadas com etanol 70%	0,77 ± 0,18 ^a	76,09 ± 9,27 ^a	1,04 ± 0,13 ^a
Membranas não tratadas	0,51 ± 0,12 ^a	80,84 ± 23,27 ^a	0,54 ± 0,10 ^b

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t-Student.

Na literatura, descreve-se que módulo elástico da pele varia entre 0,42 e 0,85 MPa para os testes de torção, 4,6 e 20 MPa para os ensaios de tração e entre 0,05 e 0,15 MPa para os testes de sucção. No entanto, estes valores podem variar de acordo com vários fatores, como idade, cor da pele, lesões anteriores e herança genética (Zahouani *et al.*, 2009). O módulo de Young é dependente da espessura dos materiais e porosidade e também das técnicas de processamento utilizadas na sua produção.

Tal como visto no capítulo 4.3.3.1, a pele humana apresenta valores de tensão na ruptura entre 2,5 a 16 MPa (Silver, 1994 *apud* Wang *et al.*, 2002) e elasticidade de aproximadamente 70% (Hansen e Jemec, 2002). Conhecendo estes dados e considerando-os como parâmetros, os valores do percentual de alongamento das membranas foram considerados adequados para a finalidade proposta, enquanto que os valores de tensão na ruptura obtidos foram inferiores. Contudo, as membranas apresentaram resistência ao manuseio e, assim, sua utilização como curativos é factível. Vale ressaltar que os testes foram realizados nas membranas úmidas e que a água atua como um plastificante natural, sendo incorporada na estrutura do polímero, aumentando sua flexibilidade e consequentemente, diminuindo sua tensão de ruptura (Hu *et al.*, 2008).

Após a desinfecção, as membranas não apresentaram valores de tensão de ruptura e porcentagem de alongamento estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das membranas não tratadas. O tratamento com etanol 70% proporcionou um aumento significativo no módulo elástico das membranas, o que é bastante interessante, pois além de atuar na desinfecção do material o etanol aumenta a tensão na ruptura para uma mesma deformação das membranas, aumentando assim

a rigidez das mesmas elasticamente. Isso pode estar relacionado com o fato do etanol desidratar os materiais e, possivelmente a quantidade de água presente entre as cadeias, mesmo depois da remoção do etanol, é menor, fazendo com que haja uma maior interação entre as moléculas do polímero.

5.2.2.3 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas em geral, são gráficos que indicam a posição angular e a intensidade dos feixes difratados pelo material, em relação às suas regiões cristalinas.

Na Figura 20 apresenta-se o difratograma das membranas de KGM tratadas com etanol e das não tratadas.

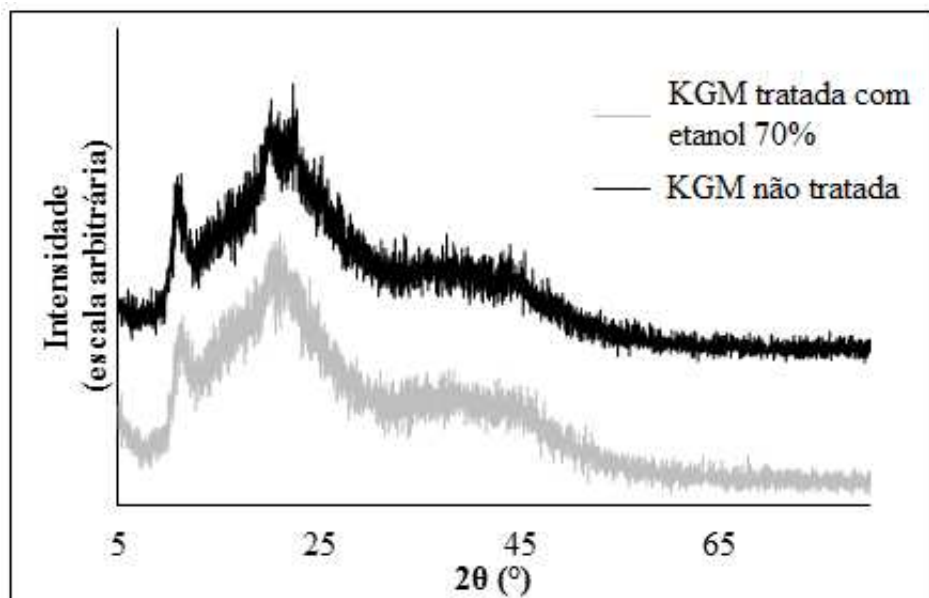


Figura 20 - Difratogramas de raios X para as membranas de KGM não tratadas e tratadas com etanol 70%.

As membranas assimétricas de KGM são materiais amorfos, com halo de cristalinidade em torno de 20 graus, que corresponde à distância interplanar de 4,57 Å de acordo com a lei de Bragg. Alguns autores relatam a existência de halos menos intensos na região de 11 e 36 graus aproximadamente (Ogawa *et al.*, 1991). O halo em 11 graus sugere a presença de um domínio cristalino devido ao grau de desacetilação (Jin *et al.*, 2015).

Na Figura 20 podemos observar um halo menos intenso na região entre 35 e 45 graus. Esse halo pode estar relacionado com interações de hidrogênio intermoleculares, favorecidas pelo uso do hidróxido de sódio para a formação da estrutura em rede do gel (Xu *et al.*, 2007).

Apesar de existirem relatos na literatura de que o etanol interfere na desacetilação da KGM (Gao *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2008; Liu, *et al.*, 2010), as amostras que foram tratadas com etanol 70%, não apresentaram alterações na cristalinidade em relação às membranas que não passaram por esse procedimento.

5.2.2.4 FTIR

Na Figura 21 apresenta-se o espectro de infravermelho obtido para as membranas de KGM.

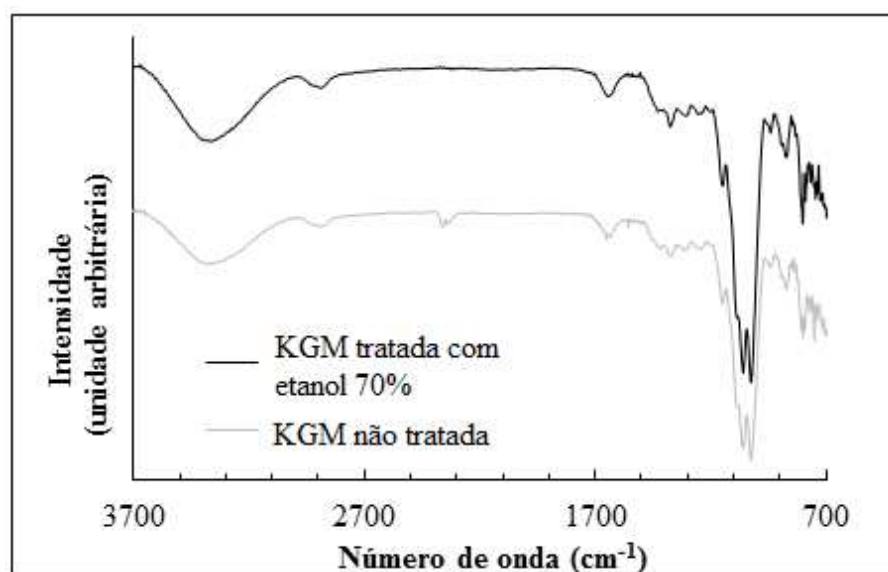


Figura 21 - Espectros de infravermelho para as membranas de KGM tratadas com etanol 70% e não tratadas.

Nos espectros das membranas assimétricas de KGM a ampla banda na faixa de 3000 a 3700 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento O–H, e os picos por volta de 2900 cm^{-1} , ao estiramento C–H da metila nas moléculas de KGM. O duplo pico por volta de 2300 cm^{-1} no espectro da membrana não tratada com etanol é referente ao CO_2 . O pico em 1645 cm^{-1} é referente às ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto que os picos em 1305 e 1375 cm^{-1} , às absorções do dobramento –OH e do estiramento C=O. As bandas em 1364 e 1418 cm^{-1} são atribuídas à deformação angular da ligação C–H. Os picos na região de 1031 a 1153 cm^{-1}

indicam a presença de ligação β -glicosídica, e os picos característicos das bandas de absorção de manose na KGM aparecem em 807 e 880 cm^{-1} (Chen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Alvarez-Manceñido *et al.*, 2008; An *et al.*, 2011). Na literatura, para a KGM pura, há um pico em 1730 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C=O da carbonila dos grupos acetila, relacionado à solubilidade da KGM (Chen *et al.*, 2005). Porém, como a membrana foi tratada com hidróxido de sódio para formar o gel, esse pico não é encontrado no espectro das membranas, o que indica a desacetilação da molécula de KGM, que está diretamente ligada com a formação da estrutura em rede do gel.

O tratamento com etanol 70% não interferiu quimicamente nas membranas de KGM, uma vez que os espectros para ambas as condições analisadas foram similares.

5.2.2.5 Análises Térmicas

As propriedades térmicas da membrana assimétrica de KGM foram avaliadas por TGA e os termogramas obtidos estão expostos na Figura 22.

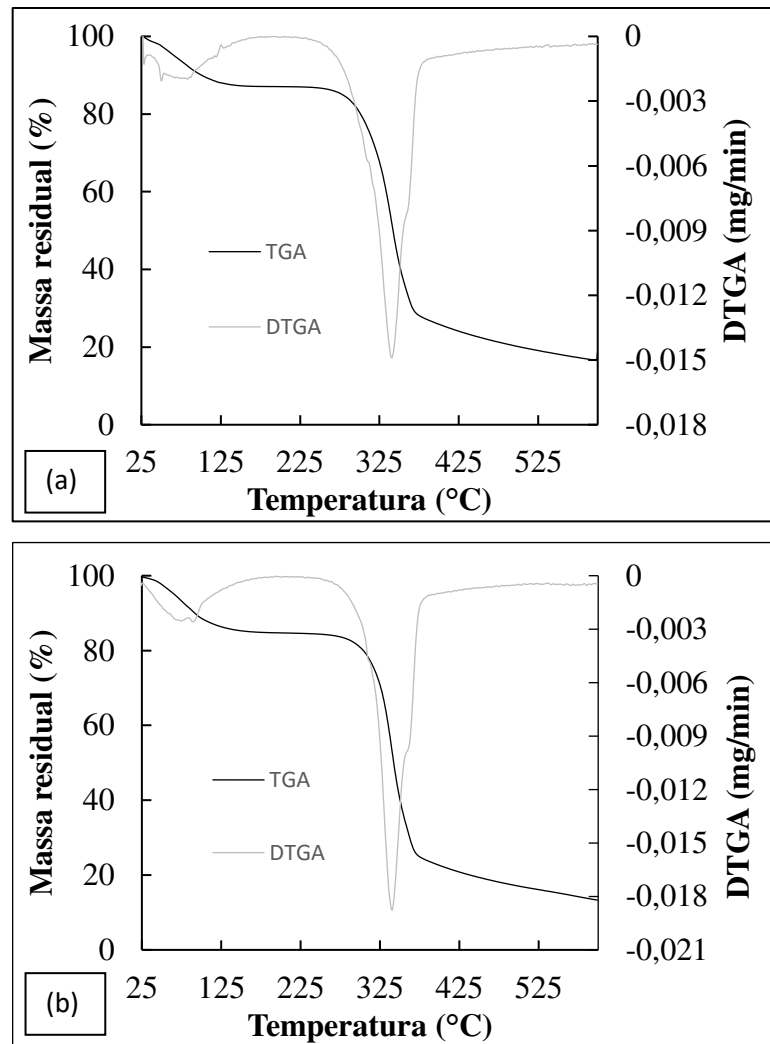


Figura 22 – Comportamento térmico da membrana assimétrica de KGM a) não tratada e b) tratada com etanol 70%.

As curvas termogravimétricas obtidas apresentam uma queda de aproximadamente 10% da massa inicial no início do aquecimento, possivelmente relacionado com a remoção de umidade residual. Porém, a degradação do material começa a partir de 240 °C, com taxa de perda de massa máxima em aproximadamente 340 °C. Nesta etapa de perda de massa acentuada, cerca de 70%, ocorre a degradação dos anéis sacarídicos e a desintegração da cadeia da molécula (Yu *et al.*, 2007). Após 370 °C observa-se uma perda de massa lenta, sendo que ao final da análise a massa residual foi de aproximadamente 16%.

Os resultados obtidos para as membranas assimétricas de KGM são próximos dos resultados obtidos para a KGM pura estudada por Yu *et al.* (2007), sendo que a KGM pura

apresentou início da degradação em 250 °C. O comportamento térmico das membranas tratadas com etanol 70% foi semelhante ao das membranas não tratadas.

5.2.2.6 Propriedades de barreira

A função normal da pele de controlar os fluidos corpóreos é prejudicada quando existe uma lesão nesse tecido. Em alguns casos pode ocorrer alta perda desses fluidos por evaporação. O uso de curativos, portanto, tem a importante função de minimizar essas perdas, mas ao mesmo tempo evitar que o excesso de umidade se acumule no tecido lesionado, evitando, assim, a maceração do tecido saudável no entorno da lesão.

As taxas de transmissão de vapor de água das membranas assimétricas de KGM estão expostas na Tabela 14.

Tabela 14 – Taxa de transmissão de vapor de água das membranas assimétricas de KGM

Membrana	TVA (g/m ² .dia)
KGM não tratada	279,5 ± 23 ^a
KGM tratada com etanol 70%	347,2 ± 82 ^a

^a letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t-Student.

A TVA das membranas assimétricas de KGM apresentou valor comparável ao das membranas assimétricas de KGM/CHI apresentadas no tópico 5.1 desta tese. Apesar da membrana de KGM/CHI apresentar uma camada porosa com poros dilatados, a capacidade de o vapor de água permear pela membrana foi praticamente a mesma. Nas imagens de MEV é possível verificar que a espessura da camada densa das membranas de KGM/CHI é maior do que a camada densa das membranas assimétricas de KGM puras, fato que possivelmente é o responsável pela membrana de KGM/CHI apresentar valores similares às membranas de KGM, mesmo apresentando poros maiores na camada porosa. Como já explicado anteriormente, a TVA das membranas assimétricas aumenta com o aumento da porosidade da camada esponjosa e a difusão de moléculas de água diminui com o aumento da espessura da camada densa (Chen *et al.*, 2011).

O tratamento com etanol não alterou a capacidade da membrana em permear vapor de água. Como já apresentado no tópico 5.1, estes valores de TVA estão de acordo com a faixa de

valores de curativos comerciais (76 - 9360 g/m².dia) encontrados na literatura (Wu *et al.*, 1995). Esses valores de TVA de curativos comerciais apresentados foram obtidos na temperatura de 35 °C, e o sistema composto por água em uma das faces dos dispositivos testados, e do outro lado, o ambiente era mantido em 32% de umidade relativa, pelo uso uma solução saturada de cloreto de magnésio.

Na norma ASTM E96/E96M está estabelecido que experimentos de permeabilidade ao vapor de água podem ser conduzidos utilizando água ou material dessecante no interior do recipiente onde a massa é controlada com o passar do tempo. Quando é utilizado material dessecante, a umidade relativa nominal é 0%, e quando contém água, a umidade relativa nominal é 100%. Essa norma estabelece ainda que a temperatura de execução da análise varia de acordo com a aplicação. Portanto, na literatura encontram-se valores de TVA obtidos de maneiras distintas no que diz respeito ao gradiente de concentração de vapor de água e temperatura de realização do experimento.

Segundo Yannas *et al.* (1982), o valor ideal de permeabilidade ao vapor de água para um curativo é de 1.200 g/m².dia, já para Wu *et al.* (2004) e Mi *et al.* (2001) o valor adequado é de 2.500 g/m².dia. Kim *et al.* (2007) citam que valores entre 2000 e 5000 g/m².dia são adequados para favorecer a cicatrização. Ou seja, não há consenso quanto a este aspecto.

A pele humana normal possui permeabilidade de 204 ± 12 g/m².dia, a pele com queimaduras de primeiro grau 278 ± 26 g/m².dia, já quando há formação de tecido de granulação o valor da taxa é de 5.138 ± 202 g/m².dia (Ruiz-Cardona *et al.*, 1996). Os valores de TVA citados neste parágrafo foram obtidos em condições de temperatura de 32 °C e umidade relativa de 25% de um lado da membrana e do outro 100% (água).

Como o gradiente de concentração e temperatura do sistema interferem diretamente na transferência de massa de vapor de água pelo curativo, pode-se concluir que, mesmo em condições desfavoráveis à TVA (menor temperatura), as membranas assimétricas de KGM desenvolvidas nesse estudo se enquadram na faixa de curativos comerciais e são capazes de permear vapor de água pelo menos para lesões com baixa produção de exsudato.

Para uma melhor comparação com a literatura realizou-se outro experimento, para quantificar de maneira mais específica para curativos, a capacidade de drenagem de fluido do leito da ferida.

A capacidade de drenagem de fluido é um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de curativos, pois estes devem ser capazes de impedir o acúmulo de exsudato e a desidratação excessiva da lesão. A condição ótima para a cicatrização de feridas se dá pela aplicação de curativos, que mantenham o ambiente de cicatrização livre de umidade excessiva e ressecamento, evitando assim maceração da pele saudável e aderência do material no leito da ferida (Thomas e Young, 2008).

Na Tabela 15 são apresentados os valores médios de capacidade de drenagem de fluido das membranas de KGM. A FHC dos materiais leva em consideração a absorção de água na membrana, porém, a membrana assimétrica de KGM é um material hidratado e perde água para o meio durante a realização do teste. Ou seja, o cálculo da quantidade de água absorvida no material resulta em valores negativos, o que implica em menores valores para FHC do que para a MVTR.

Tabela 15 – Propriedades de drenagem de fluido das membranas de KGM.

Amostras	FHC (g/m ² .dia)	MVTR (g/m ² .dia)
Membranas assimétricas de KGM	3530,8 ± 1663,3	3984,8 ± 1641,7

Thomas e Young (2008) avaliaram as propriedades de drenagem de fluido de acordo com o método padronizado pela BS de dois curativos comerciais que apresentam estrutura assimétrica (compostos por uma camada densa e uma porosa), que são o Active heal (Advanced Medial Solutions) e Allevyn adhesive (Smith & Nephew). Os autores encontraram MVTR de 1670 e 12350 g/m².dia para o Active heal e Allevyn adhesive, respectivamente.

Segundo Kimura *et al.* (2016), feridas com tecido de granulação e queimaduras de terceiro grau geram entre 3400 e 5100 gramas de exsudato em um período de 24 h. Assim, os curativos desenvolvidos nesta tese apresentam capacidade de drenagem de fluido em taxa compatível com feridas de moderados a altos níveis de produção exsudato. No entanto, mesmo membranas altamente permeáveis podem apresentar alguns casos de acúmulo de líquido sob a cobertura de feridas. O que pode ser justificado pelo bloqueio parcial dos poros da membrana por partículas biológicas tais como células e outros detritos (Behar, 1986).

Comparando os valores de TVA e MVTR, podemos concluir que as condições da realização do experimento interferem significativamente na capacidade de permear/drenar o

excesso de umidade de uma das faces do dispositivo. Quando se analisou somente TVA, pôde-se concluir que as membranas de KGM são no mínimo capazes de atender feridas com baixos níveis de produção de exsudato, porém, os valores obtidos de MVTR mostram que a capacidade de drenagem de fluido é maior.

O valor de MVTR das membranas de KGM se enquadra entre os valores obtidos para os curativos assimétricos comerciais supracitados, o que indica o potencial de aplicação das membranas de KGM como curativo no quesito capacidade de drenagem de fluido.

5.2.2.7 Testes biológicos

5.2.2.7.1 Citotoxicidade indireta

Membranas assimétricas de KGM foram analisadas quanto à citotoxicidade indireta. Na Figura 23 são apresentados os resultados da viabilidade celular de células CHO das membranas assimétricas de KGM.

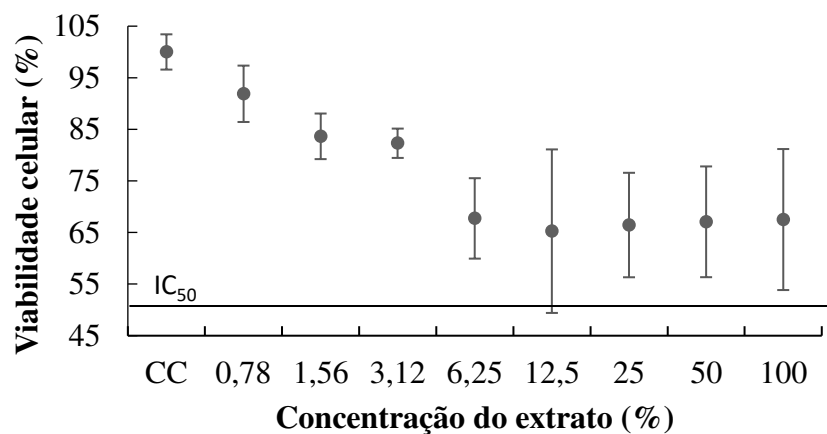


Figura 23 – Viabilidade celular das membranas assimétricas de KGM.

Observa-se que os extratos das membranas a partir da concentração de 6,25% apresentaram viabilidade celular constante de aproximadamente 65%. Nenhuma das membranas causou redução da viabilidade celular para valores inferiores ao IC₅₀, que representa a morte de 50% das células.

Neste ensaio as células não foram colocadas em contato direto com as membranas, somente o meio de cultura. Como há uma redução na viabilidade celular até aproximadamente 65%, provavelmente o meio RPMI esteja extraindo alguma substância das membranas que não

favorecem a cultura de células. Possivelmente há resíduo do etanol 70%, utilizado para desinfecção das amostras, que interfere negativamente na viabilidade das células nas maiores concentrações do extrato. Porém, como visto no ensaio de citotoxicidade direta, com o passar do tempo as células conseguem proliferar. As hipóteses para o aumento da proliferação com o passar do tempo são que, com o tempo as células conseguem se adaptar ao novo meio e/ou que as trocas do meio de cultura, que são necessárias na cultura celular, diluem a concentração das substâncias que inicialmente impactam a viabilidade das células cultivadas em contato com o extrato e/ou com as membranas de KGM.

A KGM é conhecida por apresentar propriedades não tóxicas. Curativos (filmes) desenvolvidos à base de KGM por Huang *et al.* (2015) foram testados em contato com fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT. Para ambas as linhagens de células a KGM não foi tóxica. Além disso, o biomaterial apresentou compatibilidade com sangue e acelerou o processo de contração e reepitelização de feridas em ratos.

5.2.2.7.2 Atividade antimicrobiana

Por meio da Tabela 16, observa-se que as membranas avaliadas apresentaram atividade bacteriostática em relação às bactérias analisadas, pois não houve crescimento intenso de nenhum dos tipos celulares estudados. Não houve a formação de halos de inibição, o que já era esperado, pois não há agente antimicrobiano incorporado nas membranas, logo não há difusão. Mas houve inibição por contato. O crescimento dos micro-organismos sob o corpo de prova foi inibido ou pelo menos, reduzido.

Filmes de KGM analisados por Du *et al.* (2013) não apresentaram nenhuma atividade inibitória para com as linhagens *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os autores também analisaram o efeito de filmes blendas contendo KGM e CHI, e chegaram na conclusão de que para a linhagem *S. aureus* as membranas podem estar formando uma camada na superfície da membrana celular, impedindo a entrada de nutrientes nas células. Essa interpretação pode ser estendida aos resultados encontrados nesta tese para as membranas assimétricas de KGM, visto que não possuem nenhum agente antimicrobiano inserido nos materiais, sendo o efeito de barreira física à entrada de nutrientes para os micro-organismos uma hipótese cabível.

Porém, para o fungo *Candida albicans* as membranas não apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que houve crescimento sob as amostras.

Tabela 16 – Atividade antimicrobiana das membranas assimétricas de KGM

Microrganismo	Atividade antimicrobiana
<i>Escherichia coli</i>	Aceitável
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aceitável
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aceitável
<i>Candida albicans</i>	Não aceitável

5.2.2.7.3 Permeação microbiana

A pele atua como barreira física e química, defendendo o organismo contra invasões microbianas. O sebo (rico em ácidos graxos insaturados) e o suor (possui enzima lisozima) atuam como barreira química, desencorajando o crescimento microbiano. A epiderme, composta de camadas de células epiteliais recobertas de queratina, apresenta um bloqueio físico efetivo à invasão de micro-organismos. A renovação periódica dessa camada da pele também auxilia na inibição, pois remove bactérias e/ou fungos possivelmente aderidos na superfície da pele (Spolidorio e Duque, 2013).

Os curativos devem desempenhar funções similares às da pele no controle antimicrobiano, ou seja, devem apresentar um bloqueio físico aos micro-organismos, pois são utilizados em tecidos que estão desprotegidos devido à falta total ou parcial da epiderme. Nos testes de penetração microbiana, os frascos de controle positivo foram testados para assegurar que o caldo nutritivo (meio TSB) era adequado para o crescimento bacteriano, enquanto os frascos de controle negativo foram testados para representar a condição que está livre de contaminação bacteriana. Na Figura 24, podemos observar que não houve turvação da solução TSB contida nos frascos para o controle negativo (C-), ou seja, a vedação com parafilme não permite a passagem de micro-organismos. Já o controle positivo (C+), no qual a solução ficou exposta ao meio sem proteção, a solução TBS apresenta-se turva, indicando a contaminação.

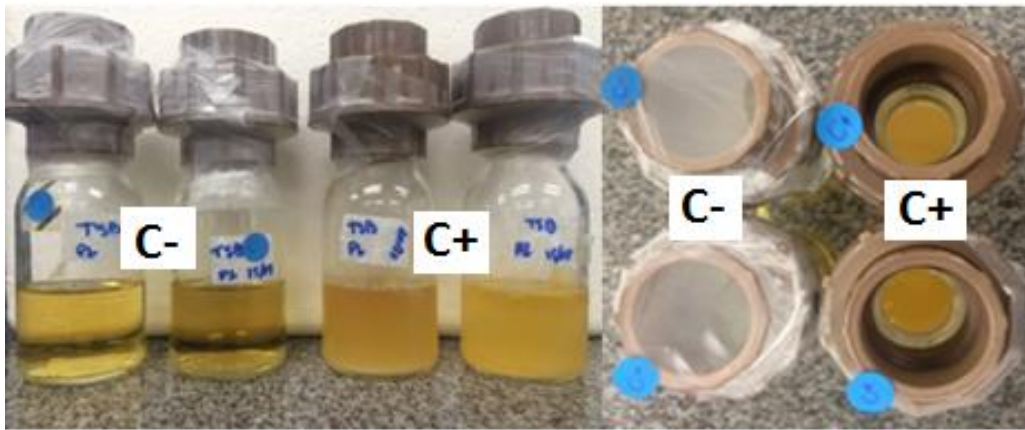


Figura 24 – Fotografias dos frascos contendo os controles positivo e negativo para o teste de permeação microbiana, em duplicata.

A Figura 25 mostra as membranas assimétricas de KGM submetidas ao teste de permeação microbiana, em quadruplicata. Pode ser observado que as membranas não permitiram a penetração de micro-organismos, demonstrando que as mesmas podem ser utilizadas como barreira física, na proteção de lesões de pele.



Figura 25 – Imagens do sistema contendo membranas assimétricas de KGM submetidas ao teste de permeação microbiana, em quadruplicata.

Na Tabela 17 estão expostas as observações relativas às amostras com o passar do tempo do experimento. A presença (+) ou ausência (-) de crescimento microbiano logo após a montagem do experimento (T0) e após 5 (T5) e 10 (T10) dias. Observa-se que o controle positivo apresentou turvação do meio TSB já no quinto dia do experimento, mas as membranas de KGM foram capazes de prevenir a passagem de micro-organismos mesmo após os 10 dias analisados.

Tabela 17 – Resultados das amostras versus o tempo de análise

Amostras	T0	T5	T10
KGM	-	-	-
Controle +	-	+	+
Controle -	-	-	-

5.2.3 Conclusão parcial

As membranas preparadas nesse estudo apresentaram faces com porosidades distintas, ou seja, são membranas assimétricas. A membrana contendo 100% de KGM apresentou estruturas melhor definidas em relação às membranas contendo SF.

Todas as membranas apresentaram capacidade de suportar o crescimento celular, uma vez que as células foram capazes de aderir e proliferar nos materiais. Novamente, a composição 100% KGM apresentou resultados ligeiramente superiores. Desta maneira, optou-se por continuar os estudos somente com a membrana de 100% KGM por apresentar melhores resultados em termos morfológicos e biológicos e apresentar metodologia de preparo mais simples e barata.

A desinfecção com etanol 70% não alterou as características físico-químicas da membrana. Sendo que, após o tratamento, as membranas mantiveram a tensão na ruptura e elasticidade e apresentaram maior módulo elástico.

As membranas de KGM apresentaram capacidade de bloquear a passagem de micro-organismos, foram capazes de reduzir o crescimento dos mesmos sem adição de agentes antimicrobianos.

As membranas assimétricas desenvolvidas nesse estudo têm alto potencial de aplicação, pois apresentam características adequadas para uso como curativos, em especial para feridas com baixa produção de exsudato, devido à taxa de transmissão de vapor de água ser baixa. Além disso, estas membranas apresentam processo de obtenção simples, e são produzidas com matéria-prima de origem vegetal.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um material, de um modo geral, deve levar em consideração os requisitos mínimos exigidos de todas as propriedades e analisá-las conjuntamente. No caso de curativos, os materiais devem apresentar uma série de características, tais como atoxicidade, capacidade de barreira à entrada de micro-organismos, resistência ao manuseio e ao uso, especialmente quando o curativo é designado a uma região articulada, maleabilidade, boa cobertura, capacidade de manter a umidade necessária para a cicatrização e permitir uma taxa controlada de permeação ao vapor de água e ao oxigênio, entre outras.

Além de todas essas características intrínsecas aos materiais, o custo de produção dos produtos é crucial para a aceitação mercadológica do mesmo. Um processo de produção simplificado e de baixo custo, viabiliza a produção em larga escala e permite um maior acesso da população a esses produtos.

Dentre as membranas obtidas pelo processo de inversão de fases, as membranas de KGM/CHI foram as mais promissoras para a aplicação proposta. Apresentaram estrutura assimétrica bem definida e capacidade de permear vapor de água dentro de uma condição usual para curativos, porém apresentaram baixa resistência mecânica. Esta característica limitou o desenvolvimento do material, pois o mesmo é frágil ao ponto de se romper ao ser manuseado.

Além dessa limitação, outro fator desfavorável, porém não limitante, é o processo de obtenção. A inversão de fases é um processo que utiliza grandes volumes de reagentes em relação às massas de produto obtidas e, por consequência, gera uma grande quantidade de resíduo líquido que precisa ser tratado antes de ser descartado, ou seja, aumentando os custos de produção.

O processo desenvolvido nesse trabalho para obtenção de membranas assimétricas, por secagem parcial e congelamento, exclui a necessidade do processo de inversão de fases. Logo, elimina a etapa de processo relacionado com o banho de coagulação. Não são, portanto, necessários grandes volumes de reagentes e também não são gerados resíduos. O processo é simples, envolvendo poucas operações unitárias.

As membranas de KGM obtidas por secagem parcial seguida de congelamento, apresentaram uma combinação de características desejadas para uso como curativos. São

maleáveis, resistentes ao manuseio, apresentam excelente porcentagem de alongamento, taxa de transmissão de vapor de água adequada e dentro da faixa de curativos comerciais. Além disso, não são citotóxicas e são capazes de impedir a invasão microbiana. Logo, as membranas assimétricas de KGM apresentam alto potencial de aplicação como curativos.

Apesar de a proposta inicial ter sido o desenvolvimento de materiais que unissem as qualidades de todos os polímeros naturais abordados em um único material, o desenvolvimento desses materiais combinados mostrou-se inviável no decorrer do trabalho. Assim, observou-se que as membranas assimétricas de KGM puras foram as mais promissoras, apresentando resultados mais satisfatórios, desde o processo de obtenção até as características físico-químicas.

Estudos disponíveis na literatura utilizando membranas assimétricas no tratamento de feridas são bastante limitados a alguns poucos polímeros, principalmente quitosana e poliuretano. A KGM foi pouco explorada na área de cicatrização de feridas e substitutos dérmicos até o momento. Nesse trabalho fica explícito o seu potencial.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito da esterilização por óxido de etileno e radiação UV nas propriedades das membranas;
- Incorporar ativos no material desenvolvido, que possam auxiliar no processo de cicatrização e dor local;
- Estudar a adição de glicerol como agente plastificante, de forma a melhorar as propriedades mecânicas das membranas formadas.
- Estudar a viabilidade econômica das membranas desenvolvidas.
- Realizar testes de degradação com lisozima humana para estimar o tempo de degradação das membranas e avaliar o período de adesão celular, a fim de definir a necessidade ou não de trocas frequentes do curativo desenvolvido.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S. *et al.* Classes of materials used in medicine. In: RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 67-233, 2004.

AHAMED, M. I. N. *et al.* Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 680-686, 2015.

ALONSO-SANDE, M. *et al.* Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 453-462, 2009.

ALTMAN, G. H. *et al.* Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.

ALVAREZ-MANCENIDO, F. *et al.* Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 11-18, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: ASTM, 2002. (ASTM D 882-02).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for water vapor transmission of materials. Philadelphia: ASTM, 2005. (ASTM E 96/E 96M-05).

AN, N.T. *et al.* Synthesis and characterization of water-soluble O-carboxymethyl glucomannan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 645-652, 2011.

ANSELMO, M. I. *et al.* The effectiveness of educational practice in diabetic foot: a view from Brazil. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, 2010.

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

BETTINGER, C. J. *et al.* Silk Fibroin Microfluidic Devices. **Advanced Materials**, v. 19, p. 2847-2850, 2007.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: <http://www.bapbaptista.com>. Acesso em: 20 de junho 2013.

BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1991.

BOATENG, J. S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BRITISH STANDARDS INSTITUTE – BSI. (2002). BS EN 13726-1:2002: Test methods for primary wound dressings. Part 1: Aspects of Absorbency, section 3.3 Fluid Handling Capacity. London: BSI.

CESCHIN *et al.* Qualidade de vida na velhice. **Revista portal de Divulgação**, n. 20, p. 45-48, 2012.

CHATELET, C. *et al.* Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.

CHEN, J.; LI, J.; LI, B. Identification of molecular driving forces involved in the gelation of konjac glucomannan: Effect of degree of deacetylation on hydrophobic association. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 865-871, 2011.

CHEN, K.-Y. *et al.* Asymmetric Chitosan Membrane Containing Collagen I Nanospheres for Skin Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1642-1649, 2009.

CHEN, L.G. *et al.* Synthesis and properties of degradable hydrogels of konjac glucomannan grafted acid for colon-specific drug delivery. **Polymer**, v. 46, p. 6274-6281, 2005.

CHEN, Y. *et al.* Asymmetric Polyurethane Membrane with In Situ-Generated Nano-TiO₂ as Wound Dressing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 3, p. 1532-1541, 2011.

CHO, Y. W. *et al.* Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-14, 2000.

- CHUA, M. *et al.* Traditional uses and potential health benefits of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N.E.Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 268-278, 2010.
- CORISIER, F.; JÉROME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780-792, 2013.
- DAI, T. *et al.* Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, p. 857-879, 2011.
- DASH, M. *et al.* Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.
- DIAS, A. M. A. *et al.* Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 9-19, 2011.
- DOYLE, J. P.; LYONS, G.; MORRIS, E. R. New proposals on “hyperentanglement” of galactomannans: Solution viscosity of fenugreek gum under neutral and alkaline conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1501-1510, 2009.
- DU, C. L. *et al.* Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: Structure and properties. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 29, n. 1, p. 62-68, 2009.
- DU, X. *et al.* Antibacterial activity of konjac glucomannan/chitosan blend films and their irradiation-modified counterparts. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1302-1307, 2013.
- EDWARDS, J. V.; YAGER, D. R.; COHEN, I. K. Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, p. 50-58, 2001.
- ELSNER, J. J.; ZILBERMAN, M. Novel antibiotic-eluting wound dressings: An in vitro study and engineering aspects in the dressing's design. **Journal of Tissue Viability**, v. 19, n. 2, p. 54-66, 2010.

FEOLA, G. Curativos a base de água ajudam a cicatrizar feridas. AUN Agência Universitária de Notícias, 2013. Disponível em: <http://200.144.182.150/aun/exibir.php?id=5433>. Acesso em: 08/10/2013.

FIELD, C. K. e KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v.167, p. 2-6, 1994.

FONDER, M. A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, 2008.

GAO, S.; GUO, J.; NISHINARI, K. Thermoreversible konjac glucomannan gel crosslinked by borax. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 315-325, 2008.

GENEVRO, G. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de glucomanana para aplicação como biomaterial. 82 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

GENEVRO, G. M.; GOMES NETO, R.; MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. **Processo de obtenção de membranas assimétricas, membranas assim obtidas e uso**. Brasil, BR1020150319339, INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2015.

GIRATA, A. K. Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. 129 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GOMES, M. *et al.* Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering*, cap. 16, p. 145-192, 2008.

HANSEN, B. e JEMEC, G.B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. **Archives of Dermatology**, v.138, n.7, p.909-1011, 2002.

HE, Q. *et al.* Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 2791-2802, 2011.

HERRANZ, B. *et al.* Effect of alkalis on konjac glucomannan gels for use as potential gelling agents in restructured seafood products. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 145-153, 2012.

HILTON, J. R. *et al.* Wound Dressings in Diabetic Foot Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p. 100-103, 2004.

HINRICHS, W. L. J. *et al.* Fabrication and Characterization of an Asymmetric Polyurethane Membrane for Use as a Wound Dressing. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 3, p. 287-303, 1992.

HSIEH, C.-Y. *et al.* Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 1, p. 124-132, 2007.

HU, X. *et al.* Dynamic protein-water relationships during beta-sheet formation. **Macromolecules**, v. 41, n. 11, p. 3939-3948, 2008.

HUANG, S.; FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 149-159, 2010.

HUANG, Y.-C. *et al.* Alkali-Treated Konjac Glucomannan Film as a Novel Wound Dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 778-787, 2015.

IBGE, Projeção da População do Brasil, 2008. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1isp272. Acesso em: 28 de Abril de 2012.

IBGE, Sinopse do Censo Demográfico 2010, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1866&id_pagina=1. Acesso em: 28 de Abril de 2012.

IBGE, Tábuas completas de mortalidade 2010, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2032&id_pagina=1. Acesso em: 28 de Abril de 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of medical devices – part 5 tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland: ISO, 2009. (ISO 10993-5).

ITA, E. E.-O.; CLARKE, S. H. Use of glucomannan hydrocolloid as filler material in prostheses. United States Patent, PI 6537318. 2003.

JANNESARI, M. *et al.* Composite poly(vinyl alcohol)/poly (vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. **Internacional Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 993-1003, 2011.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 322-337, 2011.

JIN, W. *et al.* Analysis of deacetylated konjac glucomannan and xanthan gum phase separation by film forming. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 320-326, 2015.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, v. 8, p. 217-233, 2017.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1988-2012, 2010.

KIM, I. Y. *et al.* Evaluation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer for wound dressing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p. 35-43, 2007.

KIM, I.-Y. *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 1-21, 2008.

KIM, U. J. *et al.* Structure and properties of silk hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 786-792, 2004.

KIMURA, V. T., *et al.* The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film. **Polímeros**, v. 26, n. 2, 2016.

KUMAR, M. N. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LAI, J-Y, *et al.* Effect of nonsolvent additives on the porosity and morphology of asymmetric TPX membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 118, p. 49-61, 1996.

LEI, Q. *et al.* Biomimetic thermoplastic polyurethane porous membrane with hierarchical structure accelerates wound healing by enhancing granulation tissue formation and angiogenesis. **RSC Advances**, v. 6, p. 99595-99603, 2016.

LIU, C.; CHEN, Y.; CHEN, J. Synthesis and characteristics of pH-sensitive semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on konjac glucomannan and poly(aspartic acid) for in vitro drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 500-506, 2010.

LIU, L. *et al.* Fabrication and evaluation of polyurethane-based asymmetric membranes. **Journal of Materials Science**, v. 48, n. 5, p. 1902-1910, 2013.

LUGÃO, A. B.; ARAKI, K. Curativos avançados de baixo custo e altamente absorventes, à base de hidrogel com nanopartículas de prata. **Projeto SIBRATEC – SisNANO Redes de Inovação Tecnológica em Nanomateriais e Nanocompósitos**. 2016. Disponível em: https://www.ipen.br/portal_por/conteudo/NIT/Ademar_B_Lugao%20Premio.pdf. Acesso em: 20 de Abril de 2017.

LUO, X.; HE, P.; LIN, X. The mechanism of sodium hydroxide solution promoting the gelation of Konjac glucomannan (KGM). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 92-99, 2013.

LV, Q. A. *et al.* Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12662-12669, 2005.

MA, R.-Y.; XIONG, D.-S. Synthesis and properties of physically crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels. **Journal of China University of Mining & Technology**, v. 18, n. 2, p. 4, 2008.

MACINTOSH, A. C. *et al.* Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 71-80, 2008.

MADIHALLY, S. V. Processing chitosan for tissue regeneration. **Current Trends in Polymer Science**, v. 15, p. 83-88, 2011.

MAEDA, Y. *et al.* Immunolocalization of glucomannans in the cell wall of differentiating tracheids in *Chamaecyparis obtusa*. **Protoplasma**, v. 213, n. 3-4, p. 148-156, 2000.

MALAFAYA, P. B. *et al.* Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 207–233, 2007.

MAMANI, H. N. C. Produção e caracterização de filmes compostos de metilcelulose, glucomanana, pectina, gelatina e lipídios. 158 f. Doutorado em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

McINTOSH, C. Are hydrocolloid dressings suitable for diabetic foot ulcers? **Wound Essentials**, v. 2, 170-172, 2007.

MI, F.-L. *et al.* Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, p. 165-173, 2001.

MI, F. L. *et al.* Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 438-449, 2002.

MI, F. L. *et al.* Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. **Journal of Membrane Science**, v. 212, n. 1-2, p. 237-254, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015. Relatório de gestão 2015. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/31/Relat--rio-de-Gest--o-da-SAS-2015-Final.pdf>. Acesso em: 20 de Abril de 2017.

MORAES, M. A. Obtenção e caracterização de blendas e compósitos poliméricos de fibroína de seda e alginato de sódio. 116 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MORAES, M. A. *et al.* Mechanical and Biological Performances of New Scaffolds Made of Collagen Hydrogels and Fibroin Microfibers for Vascular Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, p. 1253-1264, 2012.

MORAES, M. A. Obtenção e caracterização de materiais micro e nanoestruturados contendo fibroína de seda combinada a outros polímeros biocompatíveis para contato com células. 150 f. (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MORGADO, P. I. *et al.* Poly(vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 262-271, 2014.

MORGADO, P. I.; AGUIAR-RICARDO, A.; CORREIA, I. J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. **Journal of Membrane Science**, v. 490, p. 139-151, 2015.

MORI, H.; TSUKADA, M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 95-103, 2000.

MULDER, G. *et al.* Standard, Appropriate, and Advanced Care and Medical-Legal Considerations: Part One - Diabetic Foot Ulcerations (B). **Wounds**, v. 15, 2003.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate polymers**, v. 76, p. 167-182, 2009.

NAM, J.; PARK, Y. H. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 81, n. 12, p. 3008-3021, 2001.

NETO, R. J. *et al.* Production and characterization of chitosan and glucomannan microstructured membranes for wound dressing application. Anais do XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. João Pessoa, PB, 2014.

NIE, H. *et al.* Electrospinning and characterization of konjac glucomannan/chitosan nanofibrous scaffolds favoring the growth of bone mesenchymal stem cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 681-686, 2011.

NISHINARI, K. Konjac Glucomannan. In: DOXASTAKIS, G. e KIOSSEOGLOU, V. (Ed.). **Novel Macromolecules in Food Systems**: Elsevier, v.41, 2000.

NOGUEIRA, G. M. Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. (2005). 78 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

NOGUEIRA, G. M. Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais. 137 f. Doutorado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIZUNO, T. X-Ray Diffraction Study of Glucomannans and Their Acetates. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 7, 1991.

PAIVA, R. G. Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre. 95 f. Mestrado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PAYNE, G. F.; RAGHAVAN, S. R. Chitosan: a soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components. **Soft Matter**, v. 3, n. 5, p. 521-527, 2007.

PÉREZ, R. A. *et al.* Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 471-496, 2013.

REIS, L. S. *et al.* Calcium release evaluation during silk fibroin dialysis. In: **XV Simposio Latinoamericano de Polímeros**, Cancun - Riviera Maya, 2016.

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

RUIZ-CARDONA, L. *et al.* Application of benzyl hyaluronate membranes as potential wound dressings: evaluation of water vapour and gas permeabilities. **Biomaterials**, v.17, n.16, p.1639-643, 1996.

SANTOS, V. L. C. G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte, Y. A. O. e DIOGO, M. J. D. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, p.265-306, 2000.

SASHINA, E. S. *et al.* Structure and solubility of natural silk fibroin. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 869-876, 2006.

SHAW, J. E. *et al.* Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2010.

SLEPIAN, M. J.; MASSIA, S. P. Local polymeric gel cellular therapy. United States Patent, PI 6290729. 2001.

SPOLIDORIO, D. M. P., DUQUE, C. Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica. São Paulo: Artes médicas, 2013.

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

SULANDER, T. The association of functional capacity with health-related behavior among urban home-dwelling older adults. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.52, p. e11-e14, 2011.

TANG, C. *et al.* Preparation of Drug-loaded Asymmetric Chitosan Films towards Wound Dressing Using Supercritical Solution Impregnation. **Acta Polymerica Sinica**, n. 6, p. 774-781, 2014.

THOMAS, B. S. Fluid handling properties of Allevyn Dressing. **Wound Management Communications**, 2007. Disponível em: <http://www.medetec.co.uk/documents/Fluid%20handling%20properties%20of%20Allevyn%20foam%20dressing.pdf>. Acesso em: 20 de Abril de 2017.

THOMAS, S.; YOUNG, S. Exudate-handling mechanisms of two foam-film dressings. **Journal of Wound Care**, v. 17, p. 309-315, 2008.

UM, I. C. *et al.* Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 2001.

VANDEZANDE, P.; GEVERS, L. E. M.; VANKELECOM, I. F. J. Solvent resistant nanofiltration: separating on a molecular level. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 365-405, 2008.

VELEMA, J.; KAPLAN, D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. In: **Tissue Engineering I: Scaffold Systems for Tissue Engineering**. p. 187-238, 2006.

VIGITEL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 2011. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Ago/22/vigitel_2011_final_0812.pdf acesso em: 20 de Junho de 2013.

WANG, B.; JIA, D-Y.; RUAN, S-Q.; QIN, S. Structure and properties of collagen-konjac glucomannan-sodium alginate blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, p. 327-332, 2007.

WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A. e LIM, L.Y. Chitosan-Alginate PEC Membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)**, v.63, p.610-618, 2002.

WELLER, C.; SUSSMAN, G. Wound Dressings Update. **Journal of Pharmacy Practice and Research**, v. 36, n. 4, 2006.

WEN, X. *et al.* Preparation of konjac glucomannan hydrogels as DNA-controlled release matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 256-263, 2008.

WESKA, R. F. Estudo da esterilização e da calcificação in vitro de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial. (2009). 88 f. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

WHITING, D. R. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, p. 311-321, 2011.

WILLIAMS, M. A. K. *et al.* A Molecular Description of the Gelation Mechanism of Konjac Mannan. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 440-450, 2000.

WU, P. *et al.* In vitro assessment of water-vapor transmission of synthetic wound dressings. **Biomaterials**, v. 16, n. 3, p. 171-175, 1995.

WU, Y-B.; YU, S-H.; MI, F-L.; WU, C-W.; SHYU, S-S.; PENG, C-K. e CHAO, A-C. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosana/cellulose blends. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p.435-440, 2004.

XU, H. *et al.* Asymmetric polyurethane membrane with inflammation-responsive antibacterial activity for potential wound dressing application. **Journal of Materials Science**, v. 48, n. 19, p. 6625-6639, 2013.

XU, X. *et al.* Characterization of konjac glucomannan-gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 192-197, 2007.

YANNAS, I.V. *et al.* Design principles and preliminary clinical performance of an artificial skin. In: COOPER, S.L. e PEPPAS, N.A. **Interfacial phenomena and applications**, p.476-481, 1982.

YI, H. *et al.* Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 2881-94, 2005.

YU, H. *et al.* Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 29-40, 2007.

YUAN, N.-Y. *et al.* Effects of the cooling mode on the structure and strength of porous scaffolds made of chitosan, alginate, and carboxymethyl cellulose by the freeze-gelation method. **Carbohydrate Polymer**, v. 78, p. 349-356, 2009.

ZAHOUANI, H. *et al.* Characterization of the mechanical properties of a dermal equivalent compared with human skin in vivo by indentation and static friction tests. **Skin Research and Technology**, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2009.

ZHANG, H. *et al.* Immobilization of derivatized dextran nanoparticles on konjac glucomannan/chitosan film as a novel wound dressing. **BioFactors**, v. 30, p. 227-240, 2007.

ZHANG, Y. Q. *et al.* Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 27-31, 2005.