



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**NÃO-TECIDO BICAMADA PRODUZIDO POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO
UTILIZANDO BORRACHA NATURAL, POLI(ÁCIDO LÁTICO) E NANOPARTÍCULAS
BACTERICIDAS PARA APLICAÇÕES EM CURATIVOS DE PELE**

Víttor Paulo Vieira da Costa*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

***bolsista CAPES - 88882.426516/2019-01**

São Carlos - SP
2023

VÍTTOR PAULO VIEIRA DA COSTA

**Não-Tecido Bicamada Produzido por Fiação por Sopros em Solução
Utilizando Borracha Natural, Poli(Ácido Lático) e Nanopartículas
Bactericidas para Aplicações em Curativos de Pele**

Monografia da Defesa de Tese apresentada ao
Programa de Doutorado em Biotecnologia do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Alice Martins
EMBRAPA Instrumentação – CNPDIA

Profa. Dra. Mônica Lopes Aguiar
Departamento de Engenharia Química – UFSCar

Profa. Dra. Natalia Mayumi Inada
Instituto de Física da USP de São Carlos – IFSC

Prof. Dr. Jorge Augusto de Moura Delezuk
Instituto Federal do Paraná – IFPR

São Carlos
2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho *in memoriam* a Zilda Aparecida. Onde quer que esteja, espero que esteja orgulhosa de seu neto.

Dedico este trabalho à minha mãe, Sueli, por ser um exemplo de persistência e dedicação durante tempos difíceis.

Dedico este trabalho, também, a Raven S. Strozzi, por sua inestimável companhia e amizade durante tempos difíceis.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho também foi financiado pela CAPES por meio de bolsa de Doutorado Direto (Processo n° 88882.426516/2019-01) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio de bolsa de Mestrado (Processo n° 131768/2018-2).

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de estudo.

Agradeço à EMBRAPA Instrumentação e instituições parceiras pela disponibilização de espaço, equipamentos e recursos humanos que tornaram este trabalho possível.

Agradeço à Dra. Maria Alice Martins por ceder o látex utilizado neste trabalho, e à Dra. Natália Inada e equipe pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Agradeço a meu orientador e a todo o grupo de pesquisa pelo apoio e companhia.

Agradeço à minha família, amigos e conhecidos; todos aqueles que, de uma forma ou de outra, permitiram que eu chegasse onde hoje estou.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes – Sir Isaac Newton

Costa, Víttor Paulo Vieira da. **Não-Tecido Bicamada Produzido por Fiação por Sopros em Solução Utilizando Borracha Natural, Poli(Ácido Lático) e Nanopartículas Bactericidas para Aplicações em Curativos de Pele**. 2023. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

O tratamento adequado de lesões cutâneas associado a um processo de cicatrização rápido e efetivo ocasionam economia de despesas médicas e também reduzem a incidência de complicações funcionais e estéticas. Membranas bicamada são materiais promissores para uso como curativo de pele devido às suas diferentes camadas porosas que permitem simultaneamente a proteção contra infecções, o fluxo de ar e umidade, e também a promoção de um ambiente favorável à adesão e multiplicação celular. A borracha natural (BN) é um polímero extensivamente utilizado na confecção de biomateriais, mas muito pouco explorado na produção de micro-nanofibras para compor não-tecidos bicamada. Neste projeto foram desenvolvidas mantas de não-tecido bicamada pela técnica de fiação por sopros em solução, compostas por: uma camada inferior, destinada ao contato direto com a região lesionada, composta de uma blenda de BN, poli(ácido lático) (PLA) e polietilenoglicol (PEG) na proporção respectiva 2:1:3 m/m; e uma camada superior, para revestimento externo do curativo e prevenção de infecções, composta de fibras de PLA com incorporação de nanopartículas (NPs) de ZnO, com as concentrações testadas 1%, 2,5% e 5% m/m em relação ao PLA, e posterior aspersão de suspensão de NPs de Ag. Foi observado que, embora o uso de PEG modifique a morfologia da camada inferior, ela passa a apresentar hidrofobicidade moderada, adequada para a adesão celular (ângulo de contato variando de $51,95 \pm 0,64$ a $83,99 \pm 2,26$ para as amostras com Ag). O uso de PEG combinado com ZnO enfraquece mecanicamente o material, mas a resistência é recuperada com aumento do teor de ZnO, e as NPs de Ag conferem atividade antimicrobiana por contato direto ao material. A presença e distribuição das NPs de ZnO e Ag foi confirmada por espectroscopia de dispersão de energia de raios X, e a ausência de reações químicas entre os componentes foi verificada por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier. Dessa forma, o não-tecido bicamada pôde ser obtido com sucesso por um processo de produção simples e de baixo custo, sem necessidade de modificações químicas dos componentes, visando potencial aplicação em curativos de lesões cutâneas.

Palavras-chave: Borracha Natural, Fiação por Sopros em Solução, Membrana Assimétrica, Nanotecnologia, Curativo.

Costa, Vítto Paulo Vieira da. **Bilayer Nonwoven Produced by Solution Blow Spinning Using Natural Rubber, Poly(Lactic Acid) and Bactericidal Nanoparticles for Wound Dressing Applications**. 2023. Thesis (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

ABSTRACT

The treatment of skin wounds and a fast and effective healing process results in savings on medical costs and also reduces the incidence of functional and aesthetical complications. Bilayer membranes are promising materials for usage as wound dressings because its different porous layers simultaneously allow the protection against infections, air and humidity flow, and also promote a favorable environment for cellular adhesion and growth. The natural rubber (NR) is a polymer extensively used in the manufacturing of biomaterials, but very little explored in the production of micro-nanofibers which could compose bilayer nonwovens. This research project proposed the development of a bilayer nonwoven, using NR as one of the components, through the solution blow spinning technique. The produced material is composed of: an inferior layer, destined to the direct contact with the wounded area, made out of a blend of NR, poly(lactic acid) (PLA) and polyethyleneglicol (PEG) at the respective ratio of 2:1:3 w/w; and a superior layer, for external coating of the wound dressing and protection against infections, composed of PLA with incorporated ZnO nanoparticles (NPs), at the tested concentrations of 1%, 2.5% and 5% w/w relative to the PLA, and later aspersion of Ag NPs suspension. It was observed that, although the usage of PEG modifies the inferior layer's morphology, it presents moderate hydrophobicity, adequate to cellular adhesion (contact angle ranging from $51,95 \pm 0,64$ to $83,99 \pm 2,26$ for the samples containing Ag). The usage of PEG combined with ZnO mechanically weakens the material, although the resistance is recovered by increasing the ZnO load, and the Ag NPs provide antimicrobial properties to the material through direct contact. The presence and distribution of Ag and ZnO NPs was confirmed through X-ray energy dispersion spectroscopy, and the absence of chemical reactions between the components was verified through Fourier Transformed infrared spectroscopy. Thus, the nonwoven bilayer could be successfully obtained by a simple and low-cost production process, without the need for chemical modifications of the components, aiming at potential application in wound dressings for skin lesions.

Keywords: Natural Rubber. Solution Blow Spinning. Asymmetric Membrane. Nanotechnology. Wound Dressing.

LISTA DE FIGURAS

	página
Capítulo 1 – Introdução	
Figura 1.1 Representação de uma manta de não-tecido bicamada.	19
Figura 1.2 Ilustração do funcionamento básico das técnicas de eletrofiação e fiação por sopro em solução.	24
Figura 1.3 Fotografia de uma luva coberta por fibras produzidas pelo sistema de fiação por sopro em solução.	25
Figura 1.4 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Electrospinning” e b) “Solution Blow Spinning” ou “Airbrush”, de 2009 até 2022.	27
Figura 1.5 Comparação entre quantidade de artigos mencionando, simultaneamente: a) “Electrospinning” e “Wound dressing” e b) “Solution Blow Spinning” ou “Airbrush” e “Wound dressing”, de 2009 até 2022.	28
Figura 1.6 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Wound dressing” e b) “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane” ou “Janus fabric” e “Wound dressing”, de 2009 até 2022.	28
Figura 1.7 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Electrospinning” e b) “Airbrush” ou “Solution blow spinning”, filtrando-se os resultados para pesquisas realizadas no Brasil, de 2009 até 2022.	29
Figura 1.8 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Wound dressings”; b) “Wound dressings” e “Electrospinning”, “Solution blow spinning” ou “Airbrush”; c) “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane”; e “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane” e “Wound dressing”. Todos os resultados foram filtrados para “Brasil” e para o período de 2009 a 2022.	29
Figura 1.9 Representação da estrutura química do cis-1,4-poliisopreno.	32
Figura 1.10 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Natural rubber”, b) “Natural rubber” e “Wound dressing”, c) “Natural rubber” e “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane”, e d) “Natural rubber” e “Electrospinning” ou “Solution blow spinning”, de 2009 até 2022.	33
Figura 1.11 Representação da estrutura química dos polímeros a) PLA e b) PEG.	34
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	
Figura 2.1 Esquema do equipamento para fiação por sopro em solução: 1) manômetro que permite visualização e controle da pressão de ar; 2) seringa contendo a solução polimérica; 3) equipamento que une o cânulo de saída de ar e a seringa que ejeta a solução; e 4) coletor rotativo.	40
Figura 2.2 Fluxograma proposto para guiar a variação de parâmetros durante os testes de fiação por sopro em solução.	41
Figura 2.3 Processo de produção do não-tecido pela técnica de fiação por sopro em solução: 1) deposição de fibras de PLA, 2) deposição de fibras de blenda de borracha sobre as fibras de PLA, e 3) aspersão de Ag sobre a camada de PLA. 4) Representação das duas camadas do material produzido.	42
Figura 2.4 Representação simples da estrutura da pele para ilustrar a aplicação pretendida do material produzido: a camada composta pela blenda de borracha fica “para baixo”, em contato direto com a ferida, enquanto a camada formada por PLA, com ou sem NPs, fica “para cima”, protegendo a camada inferior da exposição direta ao ambiente.	43
Figura 2.5 Fotografia da MNTB obtida.	44
Figura 2.6 Exemplo de imagem obtida durante o ensaio de ângulo de contato. Em destaque, os ângulos medidos para se determinar o ângulo de contato médio.	47
Figura 2.7 Esquema do ensaio de halo de inibição para cada amostra testada.	50

Figura 2.8	Esquema dos ensaios de concentrações inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas sendo usados de maneira complementar. Em destaque, os poços a que são atribuídas as referidas concentrações.	53
Figura 2.9	Representação do ensaio de penetração microbiana.	56
Capítulo 3 – Resultados e Discussão		
Figura 3.1	Análise por DLS da suspensão aquosa de NPs de Ag. Análise do tamanho (diâmetro) hidrodinâmico médio em termos do número de partículas. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	58
Figura 3.2	Análise das NPs de ZnO obtidas. a) Imagem de MEV-FEG e b) difratograma de DRX. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	59
Figura 3.3	Imagem gerada por MEV das fibras obtidas por SB-Spinning de BN pura preparada em solução de clorofórmio-ácido fórmico 98:2 v/v.	60
Figura 3.4	Imagem gerada por MEV para a blenda BN-PLA 2:1.	61
Figura 3.5	Imagens obtidas por MEV de cada manta bicamada: camada inferior, sem adição de PEG (a, c, e, g), e superior (b, d, f, h), respectivamente, para as condições: a) e b) sem NPs na camada superior; c) e d) com NPs de ZnO a 1% m/m; e) e f) com NPs de ZnO a 2,5% m/m; g) e h) com NPs de ZnO a 5% m/m.	62
Figura 3.6	Imagens obtidas por MEV das mantas bicamada: camada inferior, com adição de PEG (a, c, e, g), e superior com adição de Ag (b, d, f, h), respectivamente, para as condições: a) e b) sem ZnO na camada superior; c) e d) com NPs de ZnO a 1% m/m; e) e f) com NPs de ZnO a 2,5% m/m; g) e h) com NPs de ZnO a 5% m/m. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	64
Figura 3.7	Imagem obtida por MEV da seção transversal de uma das amostras do material contendo PEG e ZnO a 5% m/m. Traduzido com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	66
Figura 3.8	Ângulo de contato para as amostras sem PEG: a) camada inferior e b) camada superior. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p < 0.05$).	67
Figura 3.9	Ângulo de contato para as mantas com adição de PEG para todas as concentrações de ZnO testadas. Resultados obtidos pela análise a) da camada inferior e b) da camada superior de cada material. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).	68
Figura 3.10	Ângulo de contato das amostras com PEG e Ag para todas as concentrações de ZnO testadas, em comparação ao branco. Resultados obtidos pela análise a) da camada inferior e b) da camada superior de cada material. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).	69
Figura 3.11	Análise por espectroscopia no infravermelho para as mantas produzidas. Respectivamente, camada inferior e superior para as MNTBs contendo como aditivos: somente ZnO (a e b); ZnO e PEG (c e d); ZnO, PEG e Ag (e e f). g) corresponde aos polímeros isolados, para comparação dos perfis obtidos. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	71
Figura 3.12	Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 1% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	74
Figura 3.13	Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 2,5% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	75

Figura 3.14	Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 5% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	76
Figura 3.15	Distribuição das nanopartículas na face inferior da manta contendo ZnO a 5% e Ag.	77
Figura 3.16	Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 5%. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	78
Figura 3.17	Ensaio i) CIM e ii) CBM para as bactérias: a) <i>Escherichia coli</i> , b) <i>Salmonella enterica</i> e c) <i>Staphylococcus aureus</i> . Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	82
Figura 3.18	Representação da parede celular de bactérias a) Gram-positivas e b) Gram-negativas.	83
Figura 3.19	Ensaio de difusão em ágar para <i>E. coli</i> , testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	85
Figura 3.20	Ensaio de difusão em ágar para <i>S. enterica</i> , testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	86
Figura 3.21	Ensaio de difusão em ágar para <i>S. aureus</i> , testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	87
Figura 3.22	Ensaio de penetração microbiana para as amostras a) sem adição de Ag e b) com adição de Ag, para as diferentes concentrações de ZnO testadas. Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	88
Figura 3.23	Ensaio de citotoxicidade para amostras: a) sem NPs ou contendo somente ZnO, nas concentrações mínima e máxima testadas, e b) contendo somente Ag ou Ag e ZnO para as concentrações mínima e máxima de ZnO testadas. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$). Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	89

LISTA DE TABELAS

	página
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	
Tabela 2.1 Composição teórica das mantas produzidas.	45
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	
Tabela 3.1 Diâmetros médios das fibras produzidas para mantas sem PEG.	63
Tabela 3.2 Diâmetros médios das fibras produzidas para mantas com PEG e Ag. Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	65
Tabela 3.3 Tempo de absorção do líquido de teste pelo material.	70
Tabela 3.4 Picos característicos da espectroscopia no infravermelho e atribuições. Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.	72
Tabela 3.5 Ensaio mecânico das mantas produzidas.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINT	Associação Brasileira das Indústrias de Não-Tecidos e Tecidos Técnicos
AC	Ângulo de Contato
BN	Borracha natural
BN-P	Blenda de borracha natural e poli(ácido láctico)
BN-P-P	Blenda de borracha natural, poli(ácido láctico) e polietilenoglicol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMA	Análise Dinâmico-Mecânica
DMF	N,N-dimetilformamida
ES	Eletrofiação
FPS	Quadros por segundo
FTIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada
ISO	<i>International Organization for Standards</i>
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura – Espectroscopia de Espalhamento de Energia de Raios X
MH	Meio Mueller-Hinton/Müller-Hinton
\overline{M}_n	Massa molar média – média numérica
MNTB	Manta de Não-Tecido Bicamada
MO	Microscopia Ótica
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
\overline{M}_w	Massa molar média – média ponderada por massa
NIBIB	<i>National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NP	Nanopartícula
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Poli(óxido de etileno)
PLA	Poli(ácido láctico)
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotações por minuto
SB-Spinning	Fiação por sopro em solução

UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	página
Capítulo 1 – Introdução	15
1.1 Lesões cutâneas	15
1.2 Curativos	15
1.3 Biomateriais	16
1.4 Membranas bicamada	18
1.5 Nanotecnologia	19
1.5.1 Nanopartículas metálicas e cerâmicas	20
1.5.2 Micro- e nanofibras poliméricas	22
1.6 Polímeros de interesse	30
1.6.1 Blendas poliméricas	31
1.6.2 Borracha natural	31
1.6.3 Polímeros auxiliares	33
1.7 Objetivos	34
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	36
2.1 Materiais utilizados	36
2.1.1 Polímeros	36
2.1.2 Solventes	37
2.1.3 Nanopartículas	37
2.2 Ensaio para produção da manta	38
2.2.1 Ensaio de solubilidade e compatibilidade	38
2.2.2 Preparo das soluções para fiação	39
2.2.3 Definição de parâmetros da fiação	39
2.3 Caracterização dos materiais produzidos	45
2.3.1 Análise por microscopia	45
2.3.2 Análise do Ângulo de Contato	46
2.3.3 Análise por ensaio mecânico de tração	47
2.3.4 Análise por Espectroscopia na região do Infravermelho	47
2.3.5 Análises de propriedades antimicrobianas	48
2.3.5.1 Ensaio de atividade antibacteriana	48
2.3.5.1.1 Ensaio de difusão em ágar	48
2.3.5.1.2 Concentração Inibitória Mínima	50
2.3.5.1.3 Concentração Bactericida Mínima	53
2.3.5.2 Ensaio de Penetração Microbiana	54
2.3.6 Análise de citotoxicidade	56
2.3.7 Análise estatística	57
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	58
3.1 Caracterização das nanopartículas	58
3.2 Otimização dos parâmetros experimentais de fiação	59
3.3 Ângulo de contato e correção da hidrofobicidade	66
3.4 Análise por espectroscopia no infravermelho	70
3.5 Análise da distribuição das nanopartículas	73
3.6 Ensaio mecânico de tração	78

3.7 Análises biológicas	81
Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras	90
Referências	92

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Lesões cutâneas

Lesões cutâneas ou feridas podem ser definidas como lesões ou interrupções na estrutura da epiderme, resultantes de danos mecânicos, físicos ou químicos, ou de condições médicas (BORDA et al. 2016). No caso de traumas provocados, a lesão produzida tende a se recuperar dentro de um intervalo previsível, sendo considerada aguda. No caso de lesões que persistem por tempo indeterminado ou que reincidem, consideradas crônicas, há a presença de complicações médicas, como doenças, alterações cardiovasculares e infecções persistentes (BOATENG et al. 2008; BORDA et al. 2016). As lesões cutâneas também podem ser classificadas quanto à sua causa e à extensão do dano provocado em termos de área lesionada ou profundidade da ferida, como: restrita às camadas mais superficiais da pele, ou atingindo inclusive tecidos subjacentes (BOATENG et al., 2008; BORDA et al., 2016). Embora lesões mais simples se recuperem espontaneamente, a manutenção de um ambiente propriamente úmido e protegido contra microrganismos muitas vezes se faz necessária. Além disso, o controle apropriado do ambiente da lesão também evita a formação de cicatrizes, que resultam em perda estética e funcional do tecido lesionado (KARPPINEN et al., 2019; SEN, 2019). A promoção de um ambiente mais controlado e favorável à recuperação tecidual é obtida pelo uso de curativos.

1.2 Curativos

Curativos são dispositivos aplicados sobre feridas, de forma a protegê-las contra infecções e permitindo controle da umidade local, auxiliando na sua rápida recuperação (BOATENG et al., 2008; BORDA et al., 2016; VOWDEN; VOWDEN, 2017; ARAGÓN et al., 2019). Existem, no entanto, diferentes tipos de lesão, considerando-se extensão e profundidade afetada, bem como teor de umidade presente. Dessa forma, o desenvolvimento de novos materiais que consigam atender a especificidades de cada tipo de lesão para proporcionar um ambiente favorável à recuperação tecidual é uma

promissora área de pesquisa (BOATENG et al., 2008; BORDA et al., 2016; VOWDEN; VOWDEN, 2017; ARAGÓN et al., 2019) e de mercado (SEN, 2019; FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2020; HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020; PRECEDENCE RESEARCH, 2021; GMINSIGHTS, 2022).

Idealmente, curativos não provocam reações adversas como alergias, respostas inflamatórias e irritações, e são capazes de manter o ambiente da lesão com umidade adequada, absorvendo o excesso de exsudato ou impedindo o ressecamento da ferida, ao mesmo tempo em que previnem a contaminação por microrganismos presentes no ambiente e permitem a troca de gases (BOATENG et al., 2008; BORDA et al., 2016; VOWDEN; VOWDEN, 2017; ARAGÓN et al., 2019). Outras características desejáveis são: o estímulo a recrutamento e proliferação celular para aceleração da regeneração tecidual, e a capacidade de ser bioabsorvido para que não seja necessário o procedimento de remoção. Na impossibilidade de se evitar a remoção do curativo durante ou após o tratamento, deseja-se que a sua remoção não provoque desconforto ao paciente nem interfira no processo de reparo tecidual (BOATENG et al., 2008; BORDA et al., 2016; VOWDEN; VOWDEN, 2017; ARAGÓN et al., 2019). Essas diferentes propriedades podem ser obtidas através do estudo e combinação de materiais diversos.

1.3 Biomateriais

Biomateriais são definidos pelo *National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering* (NIBIB, 2017), divisão do *National Institutes of Health* (NIH, EUA), como:

Qualquer matéria ou superfície capaz de interagir com sistemas biológicos. Biomateriais podem ser derivados da natureza ou sintetizados em laboratório usando-se componentes metálicos, poliméricos, cerâmicos ou materiais compósitos. Dispositivos médicos feitos de biomateriais são frequentemente usados para substituir ou melhorar uma função natural. Exemplos incluem válvulas cardíacas, reposições de quadril, e materiais usados regularmente em odontologia e cirurgia. (Tradução nossa).

Ainda segundo o NIBIB (2017), os biomateriais também podem ser compostos por células e tecidos vivos, e encontram aplicações médicas como: implantes médicos, de

stents e reposições de articulações a dispositivos de estímulo a nervos; métodos de cura de tecidos, como suturas, grampos e curativos dissolvíveis; tecidos humanos regenerados, formados por um biomaterial atuando como suporte para células e moléculas bioativas, ou mesmo órgãos completos produzidos em laboratório; sondas moleculares e nanopartículas para imageamento e terapia; biossensores, como dispositivos de monitoramento de parâmetros fisiológicos e sensores de atividade cerebral; e sistemas de liberação de fármacos. Dessa forma, o estudo de biomateriais também abrange o desenvolvimento de novos curativos.

Os biomateriais apresentam grande importância econômica, tendo movimentado 110 bilhões de dólares em 2020 (PRECEDENCE RESEARCH, 2021). As estimativas de crescimento ao ano do mercado variam de acordo com a agência de pesquisa: de 12,2% a 15,2%, com projeções para 2027 de 245,6 a 390,92 bilhões de dólares/ano (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2020; PRECEDENCE RESEARCH, 2021). Em específico, o mercado de têxteis com propriedades antimicrobianas movimentou mais de 14,5 bilhões de dólares em 2022, e estima-se um crescimento anual de 6,5% até 2032 (GMINSIGHTS, 2022). Os gastos a serem evitados com cuidados pós-atendimento e com métodos mais invasivos para tratar complicações ocasionadas pelo desenvolvimento de feridas crônicas também atingem a cifra de bilhões de dólares anualmente, e o desenvolvimento e aprimoramento de curativos inteligentes reduziria não apenas a incidência de feridas crônicas, mas também o tempo de recuperação e os cuidados exigidos (HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020; SEN, 2019).

O crescimento observado no mercado de biomateriais pode ser atribuído a diversos fatores, como: o envelhecimento populacional; a maior incidência de doenças crônicas; a necessidade de tratamentos alternativos a antibióticos devido ao surgimento de microrganismos resistentes; e também à recente pandemia ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2, que aumentou a atenção para produtos antimicrobianos em geral. Especialmente durante o período da pandemia, no qual ainda não existiam propostas de prevenção ou tratamento específicos para CoViD-19, e sabia-se que o vírus poderia ser disseminado por aerossóis ou contato com superfícies contaminadas (FALAH I; KENARKOOHI, 2020), as

principais medidas de combate à disseminação da doença eram baseadas em ações preventivas, como uso de máscara de proteção, manutenção de distanciamento físico, e boas práticas de higiene, tanto pessoal quanto no cuidado para limpeza de superfícies. Nesse contexto, máscaras, roupas em geral, luvas e outros materiais que pudessem oferecer algum tipo de neutralização do vírus (CANO-VICENT et al., 2021; KARAGOZ et al., 2021) ganharam atenção. Além disso, muitos hospitais no Brasil utilizaram altas dosagens de antibióticos de forma preventiva em pacientes internados com CoViD-19, a fim de se tentar impedir infecções em pacientes muito debilitados; esta prática, no entanto, resultou na aceleração do surgimento de superbactérias (MENEZES, 2021).

1.4 Membranas bicamada

Para aplicações como curativos, visando-se as propriedades desejáveis, os biomateriais compostos por membranas bicamada são bastante promissores (ARAGÓN et al., 2019; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). As membranas bicamada, também chamadas de membranas assimétricas ou tecido de Janus, são biomateriais compostos de duas camadas distintas. As membranas assimétricas empregadas como curativos, em geral, apresentam uma camada fina e densa (*skin*), e outra espessa e porosa (*sponge*), que simulam a estrutura da epiderme. Estas duas camadas podem ser compostas pela mesma substância ou substâncias distintas, permitindo-se o ajuste de suas propriedades. Entre os diversos métodos de produção de membranas bicamada, a produção de mantas de não-tecidos bicamada (MNTB) se destaca pela elevada porosidade e área superficial, pela estrutura fibrosa que simula a matriz extracelular, e pela simplicidade de obtenção do material em comparação às outras técnicas de produção de membranas bicamada (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Enquanto o termo “membrana” está mais atrelado à porosidade e capacidade de permeação do material, ele é mais utilizado do que “manta”, que remete à estrutura fibrosa do material. Alguns autores se referem às MNTBs como “membranas bicamada fibrosas”. Uma ilustração de MNTB utilizada como curativo é apresentada na Figura 1.1.

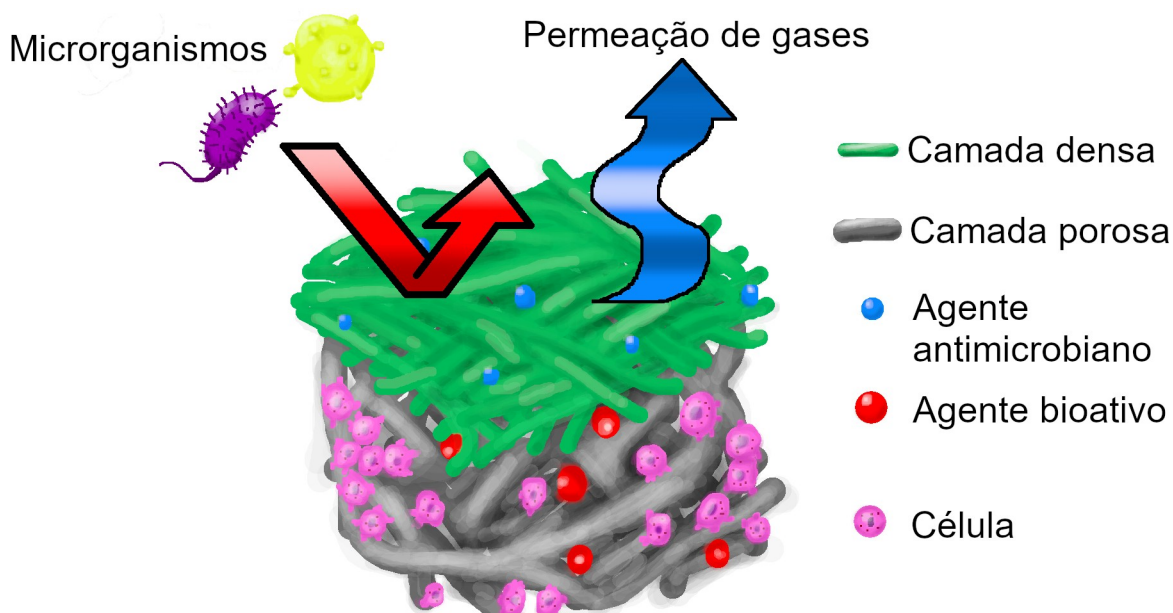


Figura 1.1 Representação de uma manta de não-tecido bicamada.

Uma MNTB utilizada como curativo apresenta uma camada densa com a finalidade de proteger a região lesionada contra microrganismos do ambiente, seja pela própria estrutura física capaz de reter bactérias e fungos, seja por propriedades químicas do material ou de aditivos capazes de neutralizar os microrganismos que tentem atravessar o material (ARAGÓN et al., 2019; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). A capacidade de reter ou inativar vírus, ou de apresentar melhor eficiência para tipos específicos de microrganismos, dependeria do material ou aditivo utilizado. A camada mais porosa do material propicia um ambiente mais favorável à adesão e multiplicação celular, ajudando o processo de regeneração a ocorrer de forma mais rápida. As duas camadas apresentam poros interconectados que permitem o fluxo de ar e vapor de água, permitindo que a ferida respire e oferecendo algum grau de controle de umidade (ARAGÓN et al., 2019; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015).

1.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia pode ser definida como o desenho, fabricação e aplicação de materiais na escala nanométrica (10^{-9} m). Nesta escala, o aumento da superfície

específica, ou seja, a proporção entre a superfície e o volume do material, traz novas propriedades de nível quântico que não são observadas em escala macroscópica, ou mesmo micrométrica (10^{-6} m) (CAO, 2004; SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022). Isso ocorre porque, com o aumento de superfície livre, quantidades maiores de átomos e moléculas encontram-se “expostos” ao ambiente, realizando interações químicas com menos átomos ou moléculas vizinhas do mesmo material. Dessa forma, surge um desequilíbrio de forças na superfície do material, tornando-a mais energética e mais influenciável por efeitos quânticos (CAO, 2004). Essa energia disponível para interação confere aos nanomateriais propriedades distintas, como *band gap* ajustável de semicondutores e reatividade química, influenciando, por exemplo, na atividade catalítica do material (CAO, 2004).

Os nanomateriais podem ser produzidos de acordo com duas metodologias: *top-down* (“de cima para baixo”) ou *bottom-up* (“de baixo para cima”). As metodologias *top-down* baseiam-se na redução das dimensões de um material macroscópico até atingir as dimensões micro/nanométricas desejadas, como, por exemplo, em um processo de moagem (CAO, 2004). As metodologias *bottom-up* consistem de técnicas de aglomeração ou crescimento dos precursores para que formem as micro/nanoestruturas desejadas, que poderiam ser representadas por técnicas de produção de partículas ou fibras a partir de soluções (CAO, 2004). Tipicamente, materiais que apresentam pelo menos uma dimensão de 1 a 100 nm, como partículas, fibras ou folhas, são chamados de nanomateriais (CAO, 2004; SANFELICE; PAVINATTO; CORRÊA, 2022) devido às propriedades quânticas de maior intensidade que emergem com o tamanho diminuto, embora materiais com dimensão(ões) abaixo de 1 μm ainda possam ser considerados “nano” e também apresentar propriedades de interesse.

1.5.1 Nanopartículas metálicas e cerâmicas

Partículas em escala nanométrica tornam-se mais reativas, permitindo-se uma redução do teor de aditivo para se obter o mesmo efeito desejado e conseqüentemente menos problemas ambientais decorrentes do seu processamento e descarte, uma vez que

uma quantidade menor de material residual precisaria ser recuperada e tratada (SAHOO et al., 2007). Ao se usar uma menor carga de materiais considerados como poluentes, resíduos não-tratados ou acidentalmente lançados ao ambiente ocasionariam uma menor difusão destes componentes. Propriedades das nanopartículas (NPs), como reatividade, atividade antimicrobiana, *band gap* de semicondutores e mesmo a coloração observada na suspensão, seja sob excitação de luz visível ou ultravioleta (UV), estão relacionadas não somente à composição química, mas também à morfologia e ao tamanho das NPs (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Dessa forma, diferenças na síntese ou processamento das NPs podem ocasionar variações em suas propriedades, permitindo ajustes de acordo com a finalidade pretendida. Por outro lado, materiais tidos como seguros em escala macrométrica podem passar a apresentar algum nível de toxicidade quando usados na forma de NPs, o que também levanta preocupações ambientais (AMEEN et al., 2021; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; KRÓL et al., 2017; REDDY et al., 2007). Dessa forma, ao se utilizar NPs metálicas como aditivos em materiais de aplicação biológica, como curativos (RODRÍGUEZ-TOBIÁS et al., 2014), deve-se analisar o perfil de liberação destas partículas ao longo do tempo, garantindo-se que haja uma concentração consideravelmente estável que seja ao mesmo tempo eficaz para o uso pretendido e não-tóxica.

O óxido de zinco (ZnO) é amplamente empregado nas indústrias cosmética e farmacêutica por ser uma fonte segura de zinco, envolvido em processos de reparo tecidual (LANSDOWN et al., 2007). Além disso, o ZnO também apresenta atividade antimicrobiana e pode até mesmo ser usado como protetor solar devido à sua capacidade de absorção de luz UV (GOYAL et al., 2016; REDDY et al., 2007; RODRÍGUEZ-TOBIÁS et al., 2014). No entanto, ZnO na forma de NP apresenta efeito citotóxico dependente de sua concentração e tamanho (REDDY et al., 2007), então deve-se tomar o cuidado de manter a sua liberação sob controle. Reddy et al. (2007) observaram que, para linfócitos T, NPs de ZnO com 11 nm de diâmetro apresentavam efeito citotóxico em concentrações a partir de 5 mM, enquanto pó de ZnO, processado acima da escala nanométrica, não apresentou citotoxicidade para as concentrações testadas. NPs de prata (Ag), também amplamente empregadas pela indústria na confecção de têxteis, embalagens, e mesmo próteses,

apresentam atividade bactericida (BALLESTEROS; CORREA; ZUCOLOTTO, 2020; DARISTOTLE et al., 2020; SOUZA NETO, 2016), mas também podem ser citotóxicas em elevadas concentrações (AMEEN et al., 2021; BECARO et al., 2021; BURDUŞEL et al., 2018; DARISTOTLE et al., 2020; HASAN et al., 2022). Burduşel et al. (2021) apontaram que, embora NPs de Ag sejam muito utilizadas pelo seu efeito antimicrobiano, estudos que melhor esclareçam seu potencial citotóxico ainda precisam ser conduzidos. Becaro et al. (2021) observaram que mesmo concentrações de NPs de Ag abaixo de limites recomendados por órgãos de saúde internacionais para alimentos (50 µg/kg) podem resultar em alterações no desenvolvimento de embriões de ratos.

1.5.2 Micro- e nanofibras poliméricas

Micro- e nanofibras em geral são materiais com elevada superfície específica, e mantas destes materiais apresentam alta porosidade. Essas mantas são comumente denominadas não-tecidos, pois, de acordo com a norma NBR-13370, não-tecidos são estruturas planas, flexíveis e porosas compostas de fibras ou filamentos que possuem orientação direcional ou randômica, enquanto tecidos, definidos pela norma ABNT/TB-392, são estruturas produzidas pelo entrelaçamento de fibras formando ângulos iguais (ou próximos) a 90° (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE NÃO-TECIDOS E TECIDOS TÉCNICOS (ABINT), 2021). Estas características, aliadas à maior energia disponível na superfície de nanomateriais, permitem que nanofibras apresentem grande aplicabilidade como filtros de poluentes (ALVARENGA; CORREA, 2021; CORREA et al., 2019; MERCANTE et al., 2017a; ZAMEL; KHAN, 2021), sensores (ANDRE et al., 2015, 2021; DINCER et al., 2019; MERCANTE et al., 2017b, 2019; MIGLIORINI et al., 2020) e materiais esportivos de alta performance, como tecidos simultaneamente hidrofóbicos e respiráveis (HARIFI; MONTAZER, 2017). Por outro lado, a estrutura fibrosa mimetiza a matriz extracelular, e os poros interconectados permitem a migração e penetração de células, tornando os não-tecidos excelentes materiais para aplicações em curativos (AMBEKAR; KANDASUBRAMANIAN, 2019; CHAGAS et al., 2021; HOMAEIGO HAR; BOCCACCINI, 2020; RODRÍGUEZ-TOBÍAS et al., 2014; SANTOS et al., 2018; ZHANG et al., 2005). Entre as

técnicas de produção de micro/nanofibras, destacam-se a Eletrofiação (*Electrospinning*, ES) e a Fiação por Sopros em Solução (*Solution Blow Spinning*, SB-Spinning).

A técnica de ES consiste em submeter uma gota de solução polimérica contida num capilar a uma alta tensão elétrica, cujo acúmulo de cargas elétricas gera uma repulsão eletrostática, deformando a gota em um cone denominado Cone de Taylor (MERCANTE et al., 2017b; RODRÍGUEZ-TOBIAS et al., 2014; MERCANTE et al., 2021; TEODORO et al., 2022). Quando a força de repulsão eletrostática supera a força de tensão superficial, do ápice do cone ocorre a ejeção de um capilar que se move em direção a um coletor condutor neutro ou com carga elétrica oposta, conforme ilustrado na Figura 1.2. Durante a trajetória, o solvente é evaporado e os capilares formam micro- ou nanofibras que se depositam no coletor (CAO, 2004; CHAGAS et al., 2021; CORREA et al., 2019; KENRY; LIM, 2017; MERCANTE et al., 2021; SCHIFFMAN; SCHAUER, 2008; TEODORO et al., 2022). A ES permite o uso de uma grande variedade de solventes e polímeros, desde que a solução seja polar ou polarizável para que a aplicação de campo elétrico surta efeito.

O processo de SB-Spinning, algumas vezes referido como “airbrush”, foi criado em 2009 por Medeiros et al. como uma alternativa à ES. No lugar de um campo elétrico, a técnica utiliza um fluxo de gás pressurizado, normalmente ar comprimido, para realizar o estiramento da solução (MEDEIROS et al., 2009), conforme ilustrado na Figura 1.2. O fluxo de ar produz uma força de cisalhamento na gota de solução, deformando-a em um cone, e também gera uma zona de baixa pressão na região imediatamente à frente do cânulo ejetor de solução (MEDEIROS et al., 2009). A quebra da tensão superficial produz os capilares que gerarão as micro- e nanofibras.

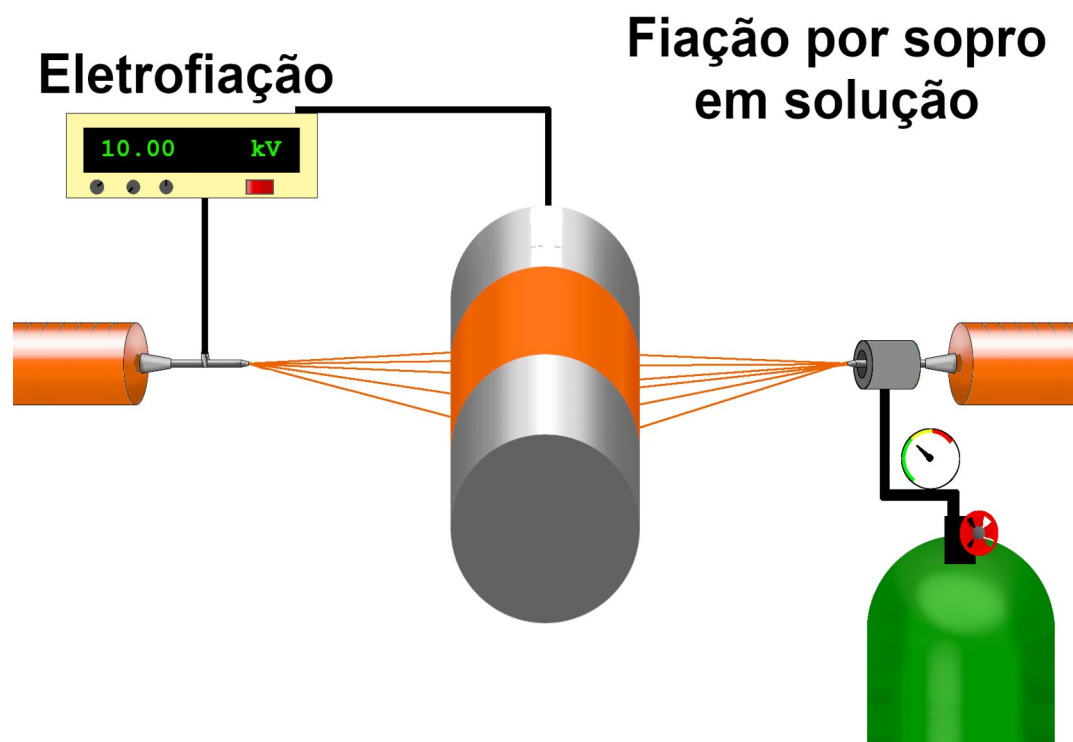


Figura 1.2 Ilustração do funcionamento básico das técnicas de eletrofiação e fiação por sopro em solução.

A SB-Spinning apresenta um menor custo operacional e uma maior segurança ao operador, pois não há necessidade de se utilizar altas tensões elétricas, e apresenta menos restrições de substâncias a serem utilizadas, uma vez que os solventes e polímeros utilizados não necessitam apresentar condutividade elétrica (CORREA et al., 2019; KENRY; LIM, 2017; MEDEIROS et al., 2009; PASCHOALIN et al., 2017; SANTOS et al., 2020), embora a volatilidade dos solventes ainda seja uma limitação. Além disso, a SB-Spinning, em comparação com a ES, apresenta maior produtividade por permitir o uso de vazões maiores de solução (MEDEIROS et al., 2009), traz a possibilidade de deposição direta, em teoria, sobre qualquer superfície, inclusive sistemas biológicos (MEDEIROS et al., 2009; PASCHOALIN et al., 2017; SANTOS et al., 2020) (Figura 1.3), e a maior simplicidade de montagem do equipamento utilizado torna o processo de aumento de escala mais fácil (DARISTOTLE et al., 2016; KOLBASOV et al., 2016).



Figura 1.3 Fotografia de uma luva coberta por fibras produzidas pelo sistema de fiação por sopro em solução.

A SB-Spinning é influenciada pelos seguintes parâmetros:

- Parâmetros ambientais: umidade do ar e temperatura ambiente no local de fiação. Estes parâmetros influenciam na secagem do material, e elevada umidade pode ocasionar o aparecimento de rugosidades ou poros em fibras que usam solventes hidrofóbicos (MEDEIROS et al., 2009). De forma geral, temperaturas mais elevadas e baixa umidade são desejáveis, mas as condições ideais (ou toleradas) dependem das soluções utilizadas, e o controle destes parâmetros depende do quão isolado o local de fiação é em relação ao ambiente ao seu redor e a fluxos de ar.
- Parâmetros de solução: viscoelasticidade da solução, volatilidade dos solventes utilizados, concentração da solução, afinidade do soluto pelo solvente. Soluções mais viscosas apresentam maior resistência ao estiramento e tendem a formar fibras mais espessas (MEDEIROS et al., 2009; WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014). Soluções pouco viscosas não sustentam a formação de capilares (DARISTOTLE et al., 2016), formando fibras “picotadas”, ou apenas são aspergidas sobre o coletor. Maior concentração de soluto significa menor quantidade de solvente a ser

evaporado, o que representa maior facilidade na deposição de fibras secas. Dificuldades na evaporação de solventes impedem a deposição de fibras secas, ocasionando a produção de fitas, ou mesmo filmes (MEDEIROS et al., 2009).

- Vazão de solução: quanto maior a vazão, maior a dificuldade em se estirar a solução e evaporar o solvente. A vazão deve ser balanceada com a pressão do ar para gerar um cone estável. Cones instáveis geram fibras com tamanhos variados e diâmetros variáveis em uma mesma fibra (fibras com “contas” ou *beads*) (MEDEIROS et al., 2009).
- Pressão do ar: responsável pelo estiramento e secagem da solução. Quando muito elevada para a vazão adotada, promove a aspensão da solução. Quando muito baixa, promove o acúmulo de solução, provocando entupimento ou lançamento de fragmentos sobre o material depositado (MEDEIROS et al., 2009).
- Protrusão do cânulo da solução: distância entre a extremidade do cânulo de ejeção de solução e o cânulo de saída de ar pressurizado. O aumento da distância reduz a força aplicada pela corrente de ar à solução enquanto a massa de ar se mantém aproximadamente a mesma. A variação da protrusão permite um melhor ajuste no equilíbrio entre vazão e pressão.
- Distância de trabalho: distância entre a extremidade do cânulo de ejeção de solução e o coletor. A distância deve permitir que os capilares de solução sequem antes de atingir o coletor (MEDEIROS et al., 2009). A variação da distância influencia a deposição das fibras sobre o coletor, pois quando em elevada velocidade as fibras podem ser defletidas ao atingir o coletor, ao invés de aderirem e se depositarem. O distanciamento adequado também pode permitir um bom alinhamento das fibras depositadas (WOJASIŃSKI; PILAREK; CIACH, 2014).
- Velocidade de rotação do coletor (quando rotativo): a velocidade do coletor pode permitir uma deposição mais alinhada das fibras.

Apesar de apresentar diversas vantagens, a técnica de SB-Spinning ainda não é tão popular quanto a ES, possivelmente por ser uma técnica muito mais recente. Foram feitos levantamentos de publicações indexadas no banco de dados *Web of Science*, comparando-se o número de publicações mencionando as duas técnicas, de 1 de janeiro de 2009, ano em que a técnica de SB-Spinning foi criada, até 1° de dezembro de 2022 (Figura 1.4). É possível observar uma enorme diferença na quantidade de publicações encontradas, mesmo quando os dois principais nomes para SB-Spinning são analisados conjuntamente.

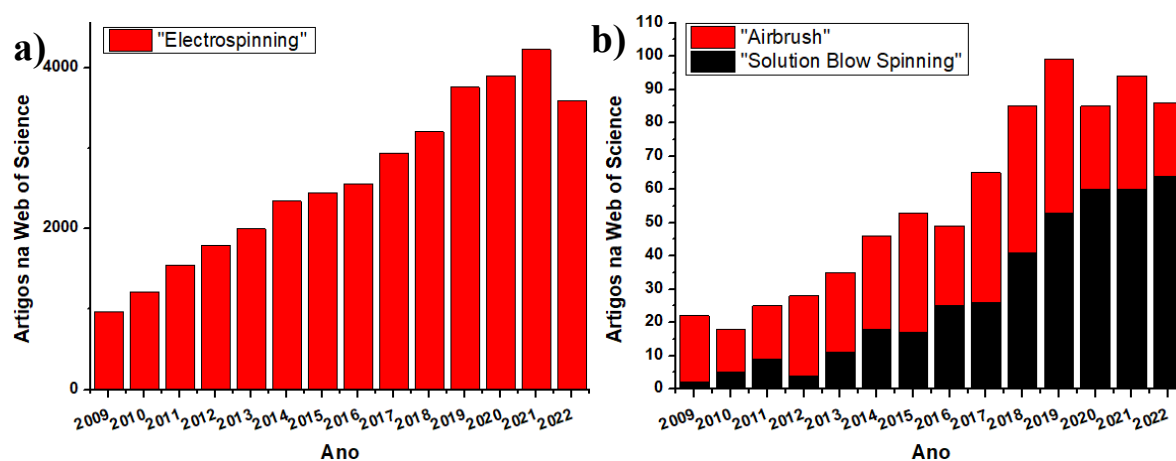


Figura 1.4 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Electrospinning” e b) “Solution Blow Spinning” ou “Airbrush”, de 2009 até 2022.

Pode-se observar também que, embora a análise e o desenvolvimento de curativos seja um tópico de interesse e já explorado na ES, a SB-Spinning ainda é pouco utilizada (Figura 1.5). E, de uma maneira geral, membranas bicamada, sob qualquer um dos nomes utilizados, ainda não são amplamente exploradas para uso como curativos (Figura 1.6). Os termos “não-tecido assimétrico” e “não-tecido bicamada” ainda são muito pouco difundidos, então para a pesquisa por resultados considerou-se apenas “membrana”, que poderia incluir “membrana fibrosa”, em vez de “não-tecido”.

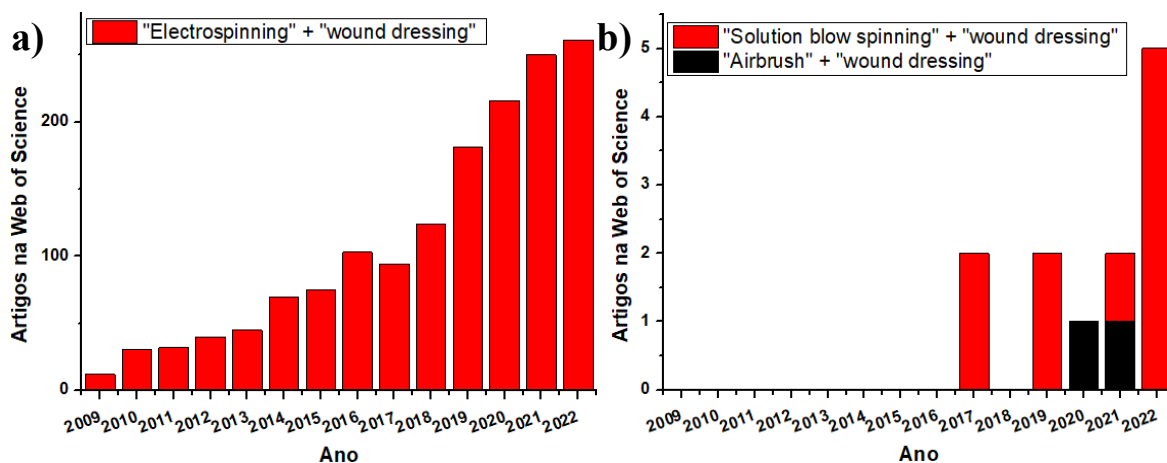


Figura 1.5 Comparação entre quantidade de artigos mencionando, simultaneamente: a) “Electrospinning” e “Wound dressing” e b) “Solution Blow Spinning” ou “Airbrush” e “Wound dressing”, de 2009 até 2022.

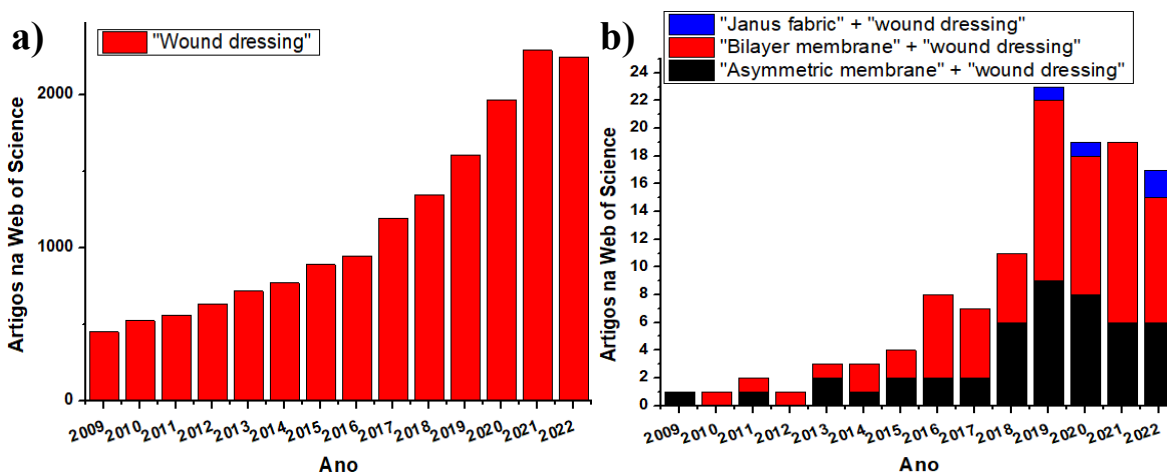


Figura 1.6 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Wound dressing” e b) “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane” ou “Janus fabric” e “Wound dressing”, de 2009 até 2022.

No Brasil, observa-se a manutenção da tendência da técnica de ES ser mais popular do que a SB-Spinning (Figura 1.7) e, embora tanto os temas “curativo” e “membranas bicamada” tenham certa popularidade, o uso de técnicas de fiação em geral ainda é pouco explorado na confecção de curativos, e quase não há pesquisas envolvendo membranas bicamada em geral e curativos (Figura 1.8).

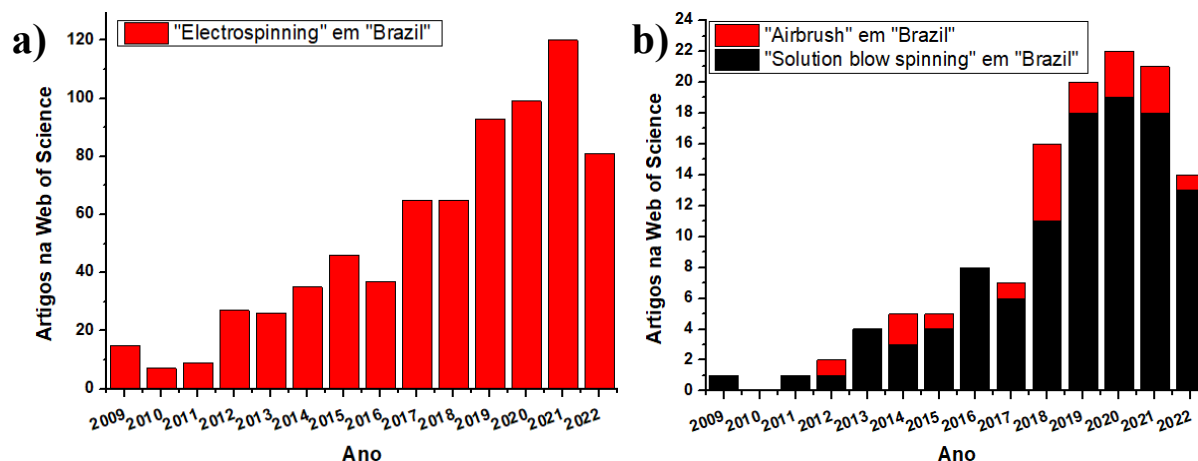


Figura 1.7 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) "Electrospinning" e b) "Airbrush" ou "Solution blow spinning", filtrando-se os resultados para pesquisas realizadas no Brasil, de 2009 até 2022.

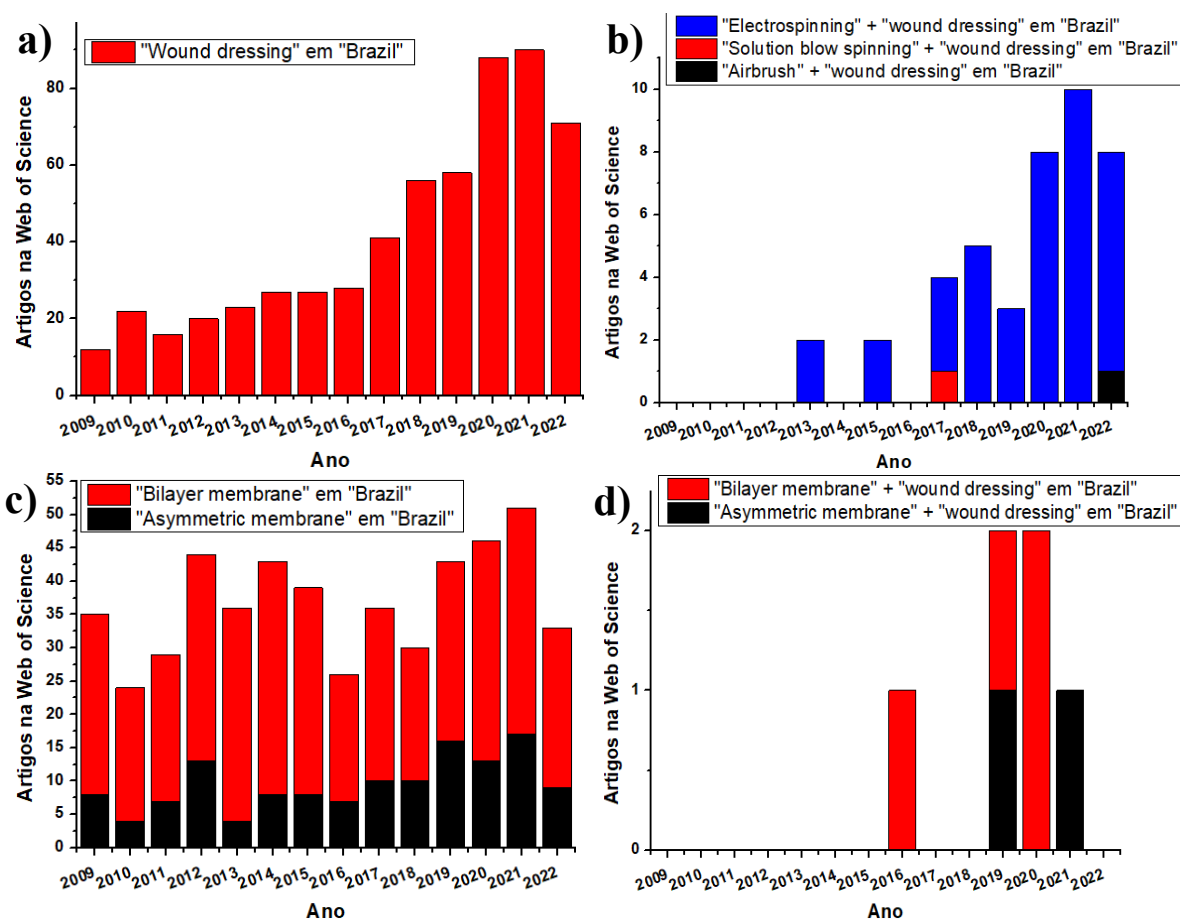


Figura 1.8 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) "Wound dressings"; b) "Wound dressings" e "Electrospinning", "Solution blow spinning" ou "Airbrush"; c) "Asymmetric membrane" ou "Bilayer membrane"; e "Asymmetric membrane" ou "Bilayer membrane" e "Wound dressing". Todos os resultados foram filtrados para "Brasil" e para o período de 2009 a 2022.

A produção de MNTBs pela técnica de ES apresenta resultados promissores (ARAGÓN et al., 2019; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). A fiação desse material pode ser realizada pela simples troca de solução a ser fiada durante o processo, depositando-se materiais com propriedades distintas (GRAÇA et al., 2021), e o mesmo equipamento que realiza a fiação pode também realizar aspersão de soluções (RODRÍGUEZ-TOBÍAS et al., 2014), o que permite a funcionalização e recobrimento de cada camada com aditivos de interesse. Essa facilidade na obtenção de uma estrutura porosa e fibrosa com camadas de propriedades distintas e relativa liberdade de escolha de componentes supera outras técnicas de obtenção de membranas bicamada (MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Como a SB-Spinning apresenta vantagens na velocidade de produção e facilidade de mudança de escala em relação à ES, ainda há muito a ser explorado no desenvolvimento de curativos bicamada por esta técnica, tanto em termos de geração de conhecimento quanto em fatores econômicos.

1.6 Polímeros de interesse

Tanto a ES quanto a SB-Spinning se baseiam no uso de soluções poliméricas, com ou sem aditivos, para produzir as micro-nanofibras. Para aplicações biomédicas, os polímeros de origem natural apresentam grande importância devido a melhor biocompatibilidade, bioatividade, biorressorção (capacidade de ser removido do local de origem por processos biológicos para ser absorvido ou eliminado) e bioabsorção (capacidade de ser propriamente metabolizado pelo organismo) em relação a polímeros puramente sintéticos, além de serem derivados de fontes renováveis e apresentarem biodegradabilidade superior (CALLISTER JR; RETHWISCH, 2012; HOMAEIGOHAR; BOCCACCINI, 2020; MISHRA et al., 2018; SIONKOWSKA, 2011). No entanto, nem todos os polímeros podem ser fiados devido às propriedades viscoelásticas inadequadas em solução, como viscosidade elevada (que dificulta o estiramento do material), ou a incapacidade de resistir ao estiramento e produzir um jato contínuo (DARISTOTLE et al., 2016; MEDEIROS et al., 2009). Alguns polímeros também podem apresentar interações intermoleculares fortes o suficiente para provocar a coalescência (adesão/fusão) das

fibras. Para ajudar a resolver estes desafios, a adição de polímeros auxiliares pode se fazer necessária.

1.6.1 Blendas poliméricas

Blendas poliméricas são misturas de polímeros, que podem ser obtidas tipicamente por mistura de soluções dos polímeros, ou pela mistura dos polímeros desejados enquanto estão derretidos (PAUL; BARLOW, 1980), visando a obtenção de um material com propriedades diferenciadas. Polímeros são considerados miscíveis quando a mistura formada é estável, enquanto polímeros imiscíveis tendem a se separar ao longo do tempo (PAUL; BARLOW, 1980). As blendas formadas podem apresentar propriedades intermediárias entre os polímeros puros, dependente da proporção presente de cada um, ou apresentar um ganho ou piora nas propriedades analisadas, caso os polímeros sejam respectivamente sinérgicos ou incompatíveis (PAUL; BARLOW, 1980). Polímeros de menor massa molecular formam soluções menos viscosas, enquanto polímeros de maior massa molecular apresentam maior dificuldade em se solubilizar e tornam a solução mais viscosa (CANEVAROLO JR, S, 2006; HANSEN, 2013). Polímeros de menor massa molecular podem atuar como plasticizantes ou plastificantes, tornando a mistura mais maleável (PAUL; BARLOW, 1980), enquanto polímeros mais rígidos ou outros aditivos podem contribuir para tornar a blenda mais resistente. Dessa forma, a escolha de polímeros auxiliares permite ajustar as propriedades originais de forma a melhor atender a finalidade desejada.

1.6.2 Borracha natural

A borracha natural (BN) é obtida do látex, seiva da seringueira (*Hevea brasiliensis*). A BN é composta principalmente de cadeias de cis-1,4-poliisopreno (Figura 1.9), encontradas em suspensão no látex na forma de partículas revestidas por proteínas negativamente carregadas e fosfolipídios, assegurando a sua estabilidade (ARCHER; SEKHAR, 1955; HERCULANO, 2009; SILVA, 2017). Enquanto o soro contém proteínas atribuídas às propriedades angiogênicas do látex, a BN é responsável pelas propriedades

mecânicas, e pode ser coagulada quando o pH da solução torna-se inferior a 5 através da adição de ácidos ou pela ação de agentes biológicos, ou devido à perda natural de umidade (FERREIRA; COUTINHO-NETTO; MULATO, 2009; HERCULANO, 2009; SILVA, 2017). Dessa forma, adicionar solução de amônia ao látex e mantê-lo em geladeira permite que seja preservado na forma líquida (FERREIRA; COUTINHO-NETTO; MULATO, 2009; HERCULANO, 2009; SILVA, 2017). A BN pode ser empregada como biomaterial por apresentar biocompatibilidade, biorressorção e bioabsorção, encontrando aplicações como plataforma para liberação controlada de fármacos e implantes para auxílio da regeneração óssea (BARROS et al., 2017; BORGES et al., 2015; HERCULANO, 2009; HERCULANO et al., 2010), além de usos já consolidados como preservativos, cateteres e luvas cirúrgicas.

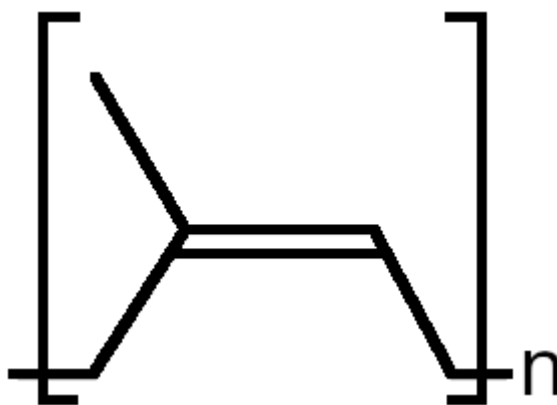


Figura 1.9 Representação da estrutura química do cis-1,4-poliisopreno.

A BN é um material bastante conhecido, embora haja relativamente poucas pesquisas dedicadas a seu uso como curativo, que são ainda mais restritas quando se trata do seu processamento em micro-nanofibras ou como membrana bicamada (Figura 1.10) (não foram encontrados resultados para as combinações “natural rubber” e “airbrush”, e “natural rubber” e “Janus fabric”). Uma busca na *Web of Science*, realizada em 1º de dezembro de 2022, resultou em apenas um único trabalho mencionando o uso de BN com SB-Spinning, pertencente a Sousa et al. (2019). O artigo refere-se a um compósito baseado em BN e 45S5 Bioglass®, um vidro bioativo com importante uso na regeneração óssea e remineralização de tecidos. O material obtido, no entanto, é formado por fitas com

largura superior a 40 μm , o que os próprios autores atribuem a possíveis problemas de secagem de solventes. Dessa forma, é possível realizar a fiação de BN pela técnica, e ainda se faz necessário aprimorar os parâmetros para a produção de fibras propriamente ditas.

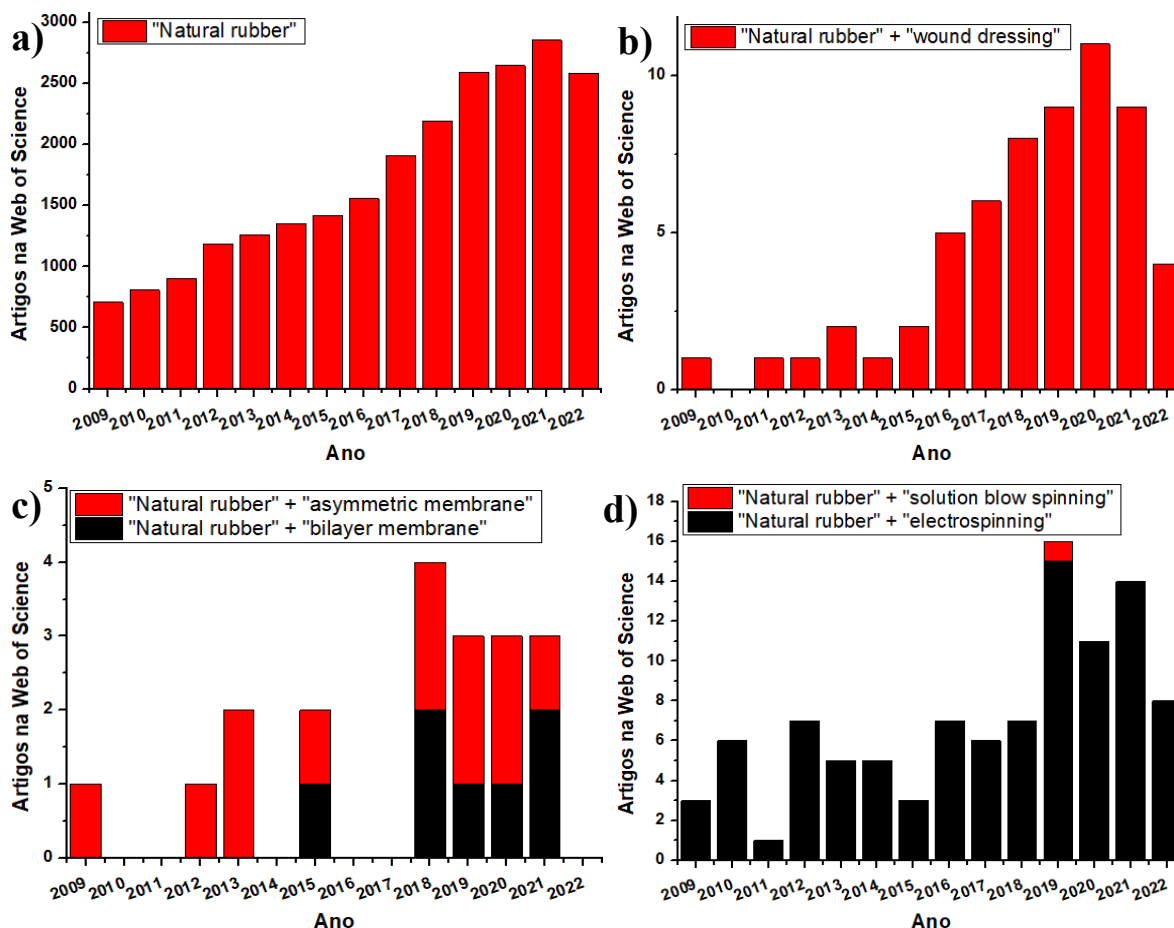


Figura 1.10 Comparação entre quantidade de artigos mencionando: a) “Natural rubber”, b) “Natural rubber” e “Wound dressing”, c) “Natural rubber” e “Asymmetric membrane” ou “Bilayer membrane”, e d) “Natural rubber” e “Electrospinning” ou “Solution blow spinning”, de 2009 até 2022.

1.6.3 Polímeros auxiliares

O poli(ácido lático) (PLA) (Figura 1.11) pode ser obtido através de reações de abertura de anel de lactídeos, dímeros de ácido lático, o qual pode ser obtido por fermentação de diversas fontes orgânicas, inclusive resíduos agroindustriais e lixo orgânico (PANG et al., 2010). O PLA é biocompatível, biodegradável e é bastante empregado em processos de fiação, seja como polímero principal ou como plasticizante

(JEM; POL; VOS, 2010; LOCILENTO et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2018), inclusive para blendas com BN (CHAGAS et al., 2021; GUERRA et al., 2021).

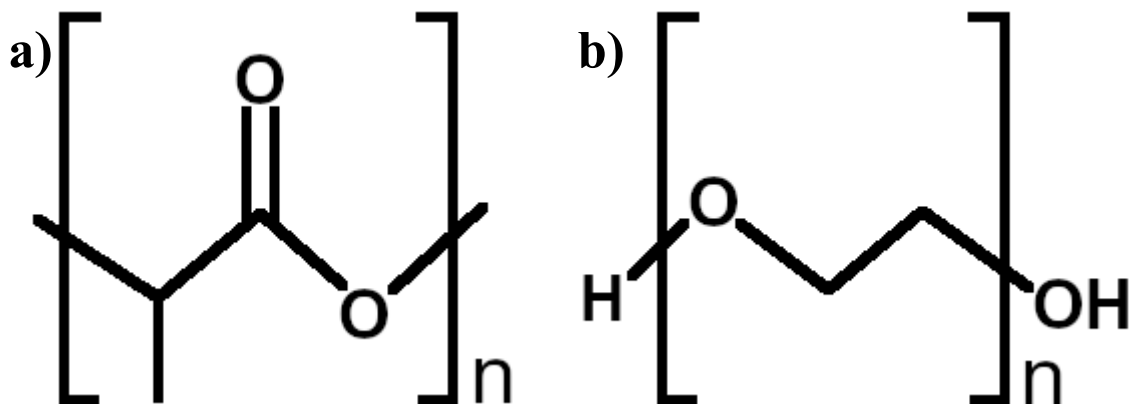


Figura 1.11 Representação da estrutura química dos polímeros a) PLA e b) PEG.

O polietilenoglicol (PEG) (Figura 1.11) é um polímero hidrofílico, solúvel em água e pouco tóxico (TONCHEVA et al., 2016). PEGs de baixa massa molecular são utilizados em processos de fiação como polímero auxiliar para reduzir a viscosidade e permitir a produção de fibras mais finas (TONCHEVA et al., 2016), além da possibilidade de redução da hidrofobicidade do material (PASCHOALIN et al., 2017). O PEG também pode ser usado como surfactante para estabilizar NPs em sínteses aquosas (ANDRE et al., 2015).

1.7 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal a produção de um não-tecido bicamada utilizando borracha natural e polímeros auxiliares, e modificação dos mesmos com materiais bactericidas, de forma a avaliar a viabilidade da aplicação do material produzido como curativo para lesões cutâneas.

Entre os objetivos específicos, destacam-se:

- A otimização da composição do material, de forma a atender as propriedades biológicas pretendidas sem comprometimento significativo de sua qualidade.
- A otimização dos parâmetros de fiação do material, de forma a se manter a reprodutibilidade do experimento.

- A determinação de possíveis interações entre os diferentes materiais empregados e também possíveis alterações no material final ao se variar as quantidades utilizadas dos componentes por meio de caracterizações físico-químicas do material completo e de cada um de seus componentes.
- A avaliação inicial da viabilidade do material obtido para uso como curativo através de caracterizações biológicas *in vitro* .

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Materiais utilizados

2.1.1 Polímeros

Para obtenção da BN, foi utilizado látex líquido cedido pela Dra. Maria Alice Martins (Embrapa Instrumentação). O látex foi coletado de um clone RRIM 600 no Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais em Votuporanga – SP e recebeu adição de solução de amônia para sua preservação, sendo mantido em geladeira. A BN foi concentrada por diluição e centrifugação do látex, a fim de se separar a BN dos componentes hidrossolúveis presentes no soro do látex. Amostras de 10 mL de látex líquido foram diluídas com água destilada até se obter o total de 45 mL, e então centrifugadas a 8000 rpm e 5 °C por 2 h (Modelo Rotina 380R; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Alemanha). A fase líquida foi descartada, e a fase suspensa recebeu mais água destilada para completar 45 mL e foi re-centrifugada nas mesmas condições por 1 h. A suspensão resultante foi acomodada em placa de Petri e seca em estufa com circulação forçada de ar (Quimis, Diadema, São Paulo) a 30 °C por 5 dias. As amostras de BN seca foram mantidas em dessecador para posterior uso.

Foram utilizados dois PLAs nos experimentos: PLA 3251D ($\overline{M}_w = 66.000$ g/mol) e PLA 4060D ($\overline{M}_w = 120.000$ g/mol), ambos comercializados pela NatureWorks (Minnetonka, EUA) na forma de péletes. O PEG utilizado ($\overline{M}_w = 400$ g/mol), na forma líquida, foi obtido da Synth (Diadema, São Paulo). Também foram testados policaprolactona (PCL) ($\overline{M}_n = 80.000$ g/mol), poli(óxido de etileno) (PEO) ($\overline{M}_w = 100.000$ g/mol, 300.000 g/mol e 900.000 g/mol) e polivinilpirrolidona (PVP) ($\overline{M}_w = 360.000$ g/mol), todos obtidos da Sigma Aldrich – Merck (St. Louis, EUA).

2.1.2 Solventes

Foram testados como solventes tolueno (Sigma Aldrich – Merck, St. Louis, EUA), clorofórmio P.A. (Synth, Diadema, São Paulo), ácido fórmico P.A. (Sigma Aldrich – Merck, St. Louis, EUA) e N,N-dimetilformamida (DMF) (Synth, Diadema, São Paulo).

2.1.3 Nanopartículas

As NPs de ZnO utilizadas foram produzidas pelo método de co-precipitação seguido de tratamento hidrotermal, conforme proposto por Andre et al. (2015). Inicialmente, nitrato de zinco ($ZnNO_3$) (Sigma Aldrich – Merck, St. Louis, EUA) e hidróxido de potássio (KOH) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., São Paulo, São Paulo) foram dissolvidos separadamente em água deionizada nas concentrações respectivas de 0,05 e 2 mol/L sob forte agitação. A solução de $ZnNO_3$ recebeu adição de PEG 400 (0,1 mol/L de solução), sendo mantida sob agitação por 30 min. A solução de hidróxido de potássio foi lentamente adicionada até se atingir pH 14, e a mistura final foi então submetida ao tratamento hidrotermal. Para o tratamento, manteve-se a pressão constante de aproximadamente 3 bar, com taxa de aquecimento de 10 °C/min até se atingir 150 °C, mantidos por 1 h. O sólido branco resultante foi lavado com água deionizada até se atingir pH neutro e seco em estufa. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) (modelo XRD-6000; Shimadzu, Kyoto, Japão) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) com emissão de campo (MEV-FEG modelo JSM 6510; Jeol, Peabody, EUA).

As NPs de Ag utilizadas foram produzidas seguindo-se uma adaptação da metodologia utilizada por Souza Neto (2016) (GABRIEL, 2021). Em um balão de fundo redondo com capacidade para 250 mL acoplado a um condensador, para evitar-se a perda de volume de solução, foram adicionados 100 mL de água deionizada, aquecida sob agitação constante até a temperatura de 90 °C. Foram adicionados 1 mL de solução aquosa de $AgNO_3$ a 0,1 mol/L, e em seguida 1 mL de solução de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) a 0,3 mol/L. A solução foi mantida sob temperatura constante de 90 °C por pelo menos 12 minutos, até o aparecimento da coloração amarela, indicadora da

formação de partículas de Ag. Após este intervalo, foi adicionado 1 mL de solução de amônia a 1,4 mol/L para interrupção do crescimento das NPs. A suspensão aquosa de NPs de Ag foi mantida em frasco coberto com papel alumínio para abrigo da luz e mantida em geladeira para uso posterior. A concentração total de Ag na suspensão foi estimada em 104,73 $\mu\text{g/mL}$, com base no volume total de suspensão preparado e na quantidade de AgNO_3 utilizada.

As NPs de Ag foram caracterizadas quanto ao potencial eletrocinético (ou potencial zeta) e volume hidrodinâmico por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (software Zetasizer 7.11, modelo Nano ZS ZEN3600; Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), realizando-se 5 leituras sequenciais da amostra para cada caracterização.

2.2 Ensaios para produção da manta

2.2.1 Ensaios de solubilidade e compatibilidade

A BN teve sua solubilidade testada em tolueno, clorofórmio, e combinação de clorofórmio e ácido fórmico na proporção respectiva 98:2 v/v entre estes solventes, sendo esta última combinação o solvente escolhido devido à velocidade de solubilização desse polímero. A compatibilidade da BN com cada polímero auxiliar foi testada, fixando-se a concentração de BN e verificando-se o maior teor possível de polímero auxiliar, incrementando sua concentração em etapas de 1 % m/v (em relação ao volume de solvente utilizado). Em todos os testes, definiu-se 1 % m/v como 10 mg de soluto por mL de solvente. Como critério adotado neste trabalho para definir se a mistura de polímeros era compatível, foi estipulado que os polímeros deveriam ser capazes de se solubilizar no mesmo solvente simultaneamente e, após suspender-se a agitação, não deveria ocorrer a separação visual de fases na solução durante o período mínimo de 3 h. Este período foi observado empiricamente durante esta pesquisa como o intervalo mínimo requerido para a condução dos ensaios de fiação. Dessa forma, garantir-se-ia a estabilidade da solução durante o processo de fiação. Testou-se também a solubilidade dos PLAs em combinação

de clorofórmio e DMF na proporção respectiva 4:1 v/v, seguindo-se testes anteriores do grupo de pesquisa.

2.2.2 Preparo das soluções para fiação

Apenas PLA 3251D e PEG apresentaram compatibilidade com a BN e, portanto, foram os únicos polímeros auxiliares utilizados para fiação. Para as soluções de blendas de borracha, somente com adição de PLA (BN-P) ou com PLA e PEG (BN-P-P), a BN foi solubilizada na mistura de clorofórmio e ácido fórmico e foi mantida em agitação por 14 h à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Os polímeros auxiliares foram então adicionados à solução, que foi mantida sob agitação por 1 h e posteriormente usada nos ensaios de fiação. A adição “tardia” dos polímeros auxiliares foi uma forma de prevenir a sua degradação pelo ácido fórmico presente (JUNG; REE; KIM, 2006).

Para as soluções de PLA em clorofórmio-DMF, o PLA foi dissolvido na mistura de solventes e foi mantido sob agitação por 15 h à temperatura ambiente. Para os testes de incorporação de NPs de ZnO à solução de PLA, o PLA foi dissolvido somente em clorofórmio por 15 h, enquanto o volume correspondente de DMF foi utilizado para preparar a suspensão das NPs de ZnO durante a última hora de agitação da solução de PLA. Foram testadas adições de 1 %, 2,5 % e 5 % m/m (massa de NPs de ZnO por massa de PLA na solução). Para isso, as NPs foram adicionadas ao DMF e mantidas sob agitação vigorosa por 30 min, e então a suspensão foi sonicada em ultrassom de ponteira Branson (Emerson Electric Co., St. Louis, EUA) por 5 min a 10 % de amplitude, com banho de gelo. A suspensão resultante foi lentamente adicionada à solução de PLA, mantida sob agitação por 30 min.

A suspensão aquosa de NPs de Ag não recebeu tratamento adicional desde a sua obtenção, sendo aspergida da forma como foi produzida.

2.2.3 Definição de parâmetros da fiação

Foram testadas vazões de 7 a 20 mL/h, controladas por uma bomba de infusão programável modelo NE-300 (New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, EUA), utilizando-

se seringas de vidro de 20 mL (Artiglass, Due Carrare, Itália). O controle da pressão do ar foi realizado por um manômetro com válvula acoplada. Um esquema simplificado do equipamento que permite o acoplamento da seringa ao cânulo de saída de ar é mostrado na Figura 2.1. Foram testadas pressões de 0 a 4 bar, e o alinhamento dos cânulos foi ajustado manualmente. As distâncias de trabalho testadas foram de 12 a 35 cm, e as protrusões de 2 mm a 2 cm, ambas medidas manualmente. A rotação do coletor de hastes, acoplado a um motor elétrico para atmosferas explosivas (modelo W22 Plus, Weg, Jaraguá do Sul, Santa Catarina), foi fixada em 180 rpm. Foi observado que, durante os testes, a temperatura ambiente variou de 24 a 30 °C, e a umidade relativa de 28 a 50 %, ambos mensurados por um higrômetro localizado no interior da capela utilizada, sem aparente influência na definição de parâmetros. Como o equipamento de fiação estava montado dentro de uma capela, um ambiente aberto e com fluxo de ar, a temperatura no ambiente de fiação era a mesma do laboratório. A umidade no interior da capela, no entanto, pôde ser controlada com o auxílio de uma chapa de aquecimento, utilizando-se um recipiente com esferas de sílica para os casos de umidade mais elevada. Para eventual umidade presente na tubulação de ar, há uma armadilha de água à qual o sistema de fiação estava acoplado.

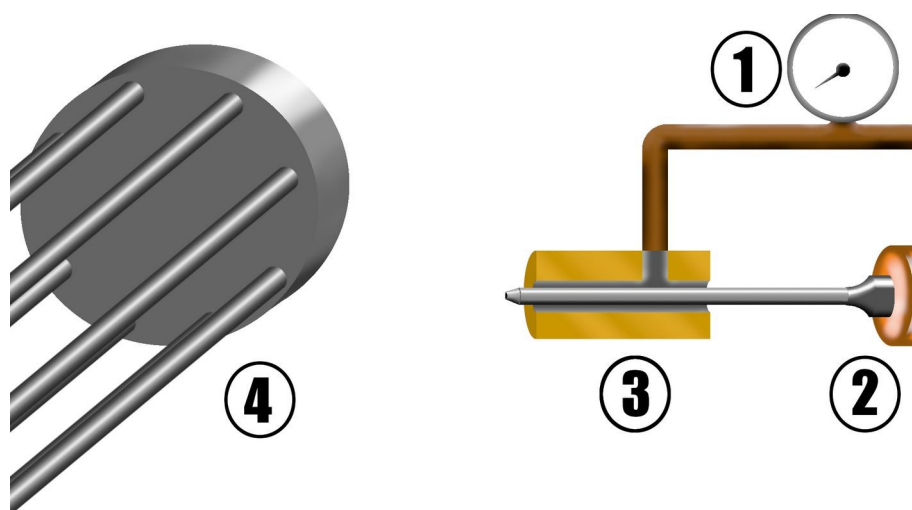


Figura 2.1 Esquema do equipamento para fiação por sopro em solução: 1) manômetro que permite visualização e controle da pressão de ar; 2) seringa contendo a solução polimérica; 3) equipamento que une o cânulo de saída de ar e a seringa que ejeta a solução; e 4) coletor rotativo.

Um resumo do protocolo de definição dos parâmetros está descrito no fluxograma apresentado na Figura 2.2, considerando apenas os parâmetros envolvidos diretamente no arranjo do equipamento (vazão de solução, pressão do ar, protrusão e distância de trabalho). Parâmetros ambientais também influenciam nos resultados, mas não são tão facilmente controlados. O fluxograma foi criado com base na facilidade de variação de cada parâmetro, de acordo com o que foi empiricamente observado na condução dos testes deste trabalho.

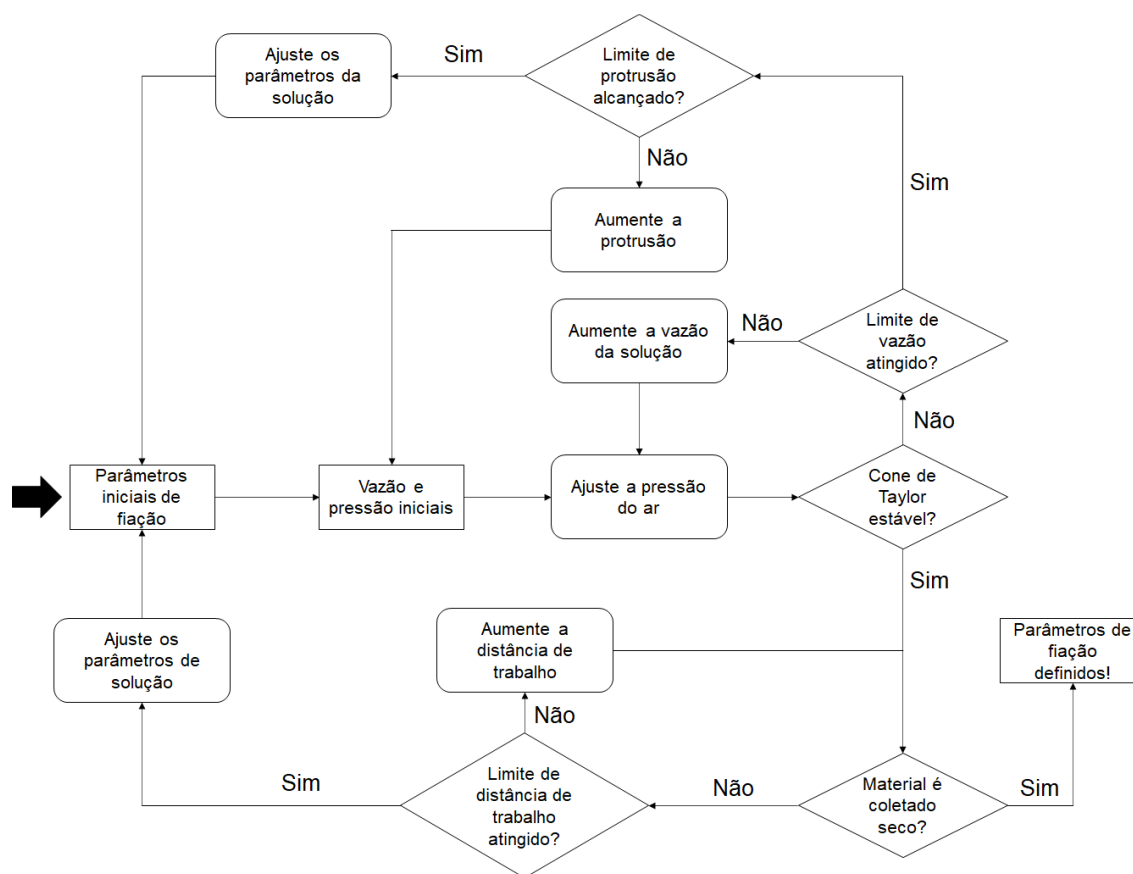


Figura 2.2 Fluxograma proposto para guiar a variação de parâmetros durante os testes de fiação por sopro em solução.

Os parâmetros definidos como satisfatórios foram aqueles que permitiram a produção de um cone de solução estável e a fiação constante das soluções poliméricas com o mínimo de interferência possível para limpeza e desobstrução do cânulo de solução. Para a suspensão de NPs de Ag, foram escolhidos os parâmetros que permitiram

uma aspersão homogênea, recobrando completamente as amostras de mantas de fibras utilizadas, e sem acúmulo de umidade no material. Os procedimentos de aspersão de Ag foram conduzidos com recobrimento da seringa utilizada com papel alumínio e cobertura da janela da capela, como garantia extra de proteção da solução com uma menor exposição à luz. O tempo de deposição ou aspersão de cada solução também foi controlado. A ordem de deposição das camadas do material, conforme ilustrado na Figura 2.3, foi a seguinte:

- 1) Camada de PLA, puro ou com adição de ZnO; esta camada foi denominada como “camada superior”.
- 2) Camada de BN-P ou BN-P-P sobre a camada de PLA; esta camada foi denominada como “camada inferior”.
- 3) Deposição de NPs de Ag sobre a camada de PLA.

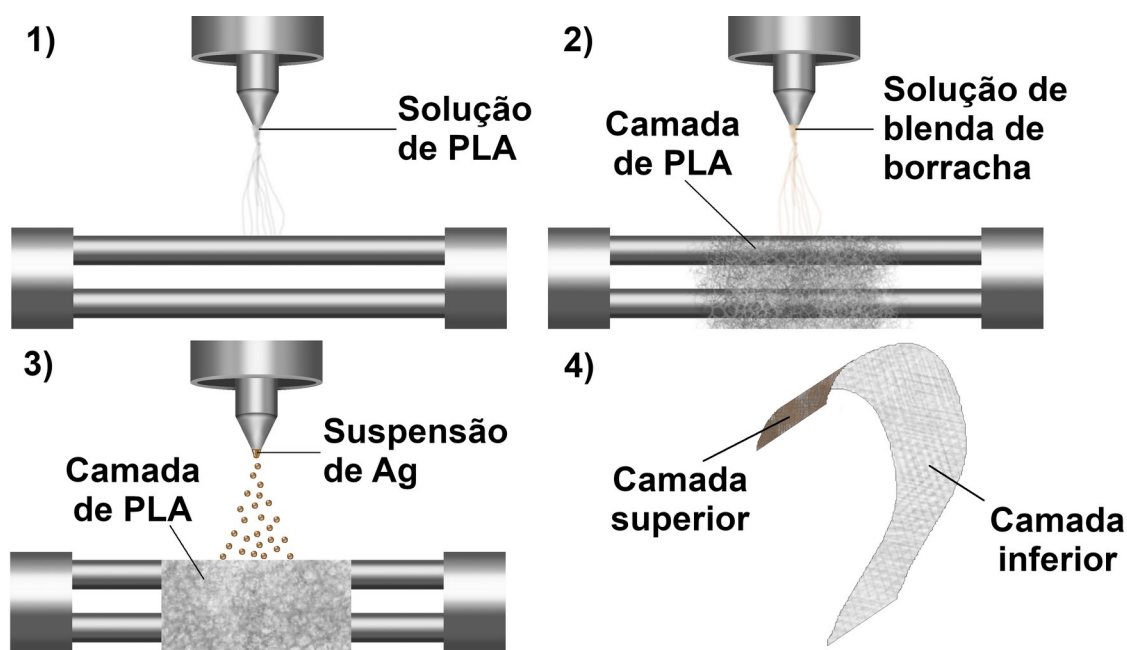


Figura 2.3 Processo de produção do não-tecido pela técnica de fiação por sopro em solução: 1) deposição de fibras de PLA, 2) deposição de fibras de blenda de borracha sobre as fibras de PLA, e 3) aspersão de Ag sobre a camada de PLA. 4) Representação das duas camadas do material produzido.

As diferentes camadas de fibras foram nomeadas de acordo com o uso pretendido (Figura 2.4), e não pela ordem de deposição. A “camada inferior” se destinaria ao contato

direto com a região lesionada, enquanto a “camada superior” protegeria a lesão de microrganismos do ambiente.

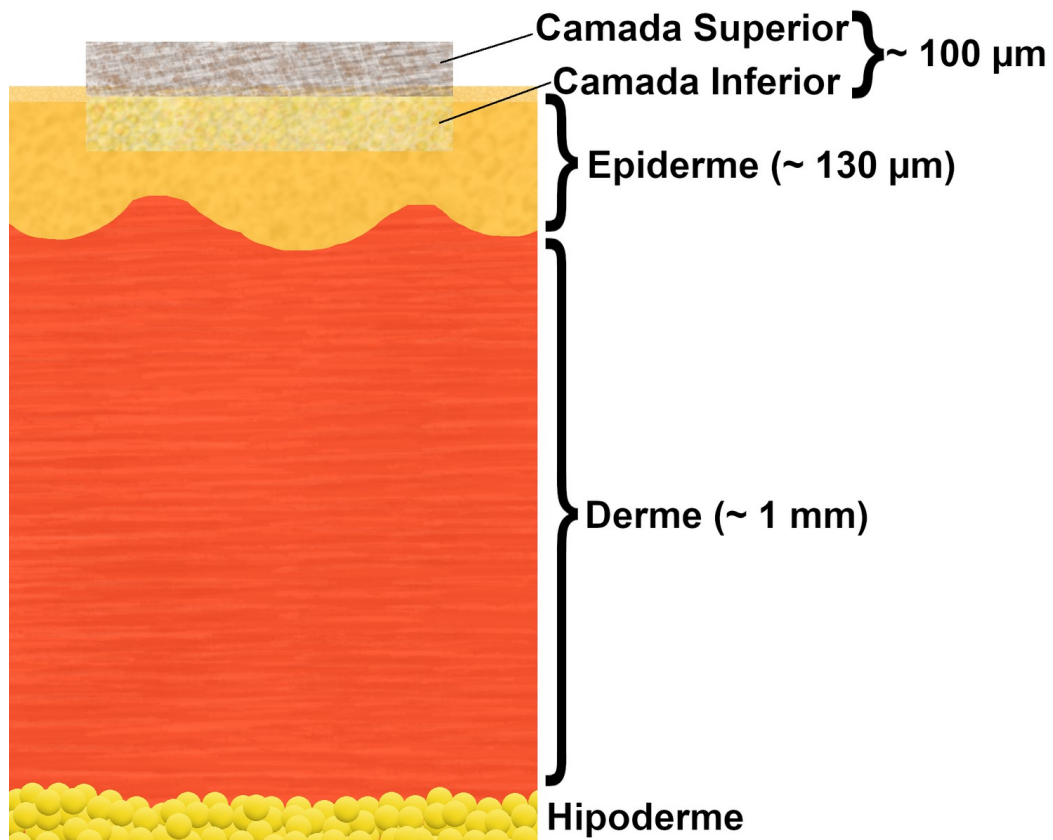


Figura 2.4 Representação simples da estrutura da pele para ilustrar a aplicação pretendida do material produzido: a camada composta pela blenda de borracha fica “para baixo”, em contato direto com a ferida, enquanto a camada formada por PLA, com ou sem NPs, fica “para cima”, protegendo a camada inferior da exposição direta ao ambiente.



Figura 2.5 Fotografia da MNTB obtida.

A Tabela 2.1 contém as estimativas feitas para a concentração de cada componente em cada camada, com base nas concentrações utilizadas em cada solução e no tempo de fiação ou aspersão.

Tabela 2.1 Composição teórica das mantas produzidas.

Aditivo(s)	Camada Superior			Camada Inferior		
	PLA 4060D (%m)	ZnO (%m)	Ag (%m)	BN (%m)	PLA 3251D (%m)	PEG 400 (%m)
Nenhum	100	-	-	66,67	33,33	-
ZnO 1%	99,01	0,99	-	66,67	33,33	-
ZnO 2,5%	97,56	2,44	-	66,67	33,33	-
ZnO 5%	95,24	4,76	-	66,67	33,33	-
PEG	100	-	-	33,33	16,67	50
ZnO 1% + PEG	99,01	0,99	-	33,33	16,67	50
ZnO 2,5% + PEG	97,56	2,44	-	33,33	16,67	50
ZnO 5% + PEG	95,24	4,76	-	33,33	16,67	50
ZnO 1% + PEG + Ag	98,00	0,98	1,03	33,33	16,67	50
ZnO 2,5% + PEG + Ag	96,57	2,41	1,01	33,33	16,67	50
ZnO 5% + PEG + Ag	94,30	4,71	0,99	33,33	16,67	50

2.3 Caracterização dos materiais produzidos

2.3.1 Análise por microscopia

Durante os testes de fiação, amostras do material foram coletadas em lâminas de vidro e analisadas por Microscopia Ótica (MO) por transmissão de luz (Modelo Solaris T; BEL Engineering, Monza, Itália), lente objetiva 10x, para uma rápida avaliação da morfologia das fibras e ajuste dos parâmetros testados. A MO permite a visualização de microfibras produzidas pela SB-Spinning e a presença de fibras com contas ou mesmo de filme no material fiado. Para uma análise mais detalhada das fibras, o material foi analisado por MEV (modelo JSM 6510; Jeol, Peabody, EUA). Para este fim, amostras do material foram fixadas em porta-amostras utilizando-se fita de carbono dupla face e recobertas com ouro. Foram utilizadas as ampliações 500x para análise de microfibras e 2000x para nanofibras. Por meio de análise das imagens obtidas (software ImageJ 1.52a,

National Institutes of Health, Bethesda, EUA), o diâmetro médio das fibras foi determinado (n=100). O material também foi analisado por MEV com espectroscopia de dispersão de energia de raios X (MEV-EDS) (modelo JSM 6510; Jeol, Peabody, EUA) para análise semi-quantitativa da presença de NPs no material.

2.3.2 Análise do Ângulo de Contato

Os ensaios de Ângulo de Contato (AC) (software OneAttension versão 4.0.2, modelo Theta Lite; KSV Instruments – Biolin Scientific, Suécia) foram realizados utilizando-se água deionizada, com gotas de 5 μ L. Para avaliação da variação do AC, o equipamento foi configurado para fotografar a superfície do material a 68 FPS durante 3 s e logo em seguida a 2 FPS por 7 s. Uma gota do líquido teste é depositada na superfície do material, e o ângulo médio formado entre a gota e a superfície do material é analisado ao longo do tempo (Figura 2.6). Este ângulo pode ser afetado pela porosidade ou rugosidade do material (GU et al., 2016; TAMAI; ARATANI, 1972), bem como pelas características químicas da sua superfície (ARIMA; IWATA, 2007). Quanto maior o valor do ângulo, pior a interação do líquido com o material (ARIMA; IWATA, 2007); como o líquido testado foi água, quanto maior o ângulo, mais hidrofóbica a superfície do material. Os testes foram conduzidos durante 1 minuto, e o valor médio do AC foi avaliado no intervalo de 1 s logo após a deposição da gota sobre o material para comparação entre as amostras, uma vez que amostras porosas, como os não-tecidos, ou muito hidrofílicas rapidamente absorvem o líquido de teste usado, afetando consideravelmente o valor médio. Como uma análise complementar, foi realizada a análise do tempo de absorção do líquido de teste pela superfície das amostras testadas. Para isso, foi necessário produzir regressões lineares dos pontos obtidos durante a análise de cada amostra, pois o equipamento apresenta certa limitação em registrar o momento exato em que o líquido é totalmente adsorvido pela superfície (AC = 0°). É importante ressaltar que esta é apenas uma análise preliminar, pois outros ensaios apresentariam resultados mais confiáveis.

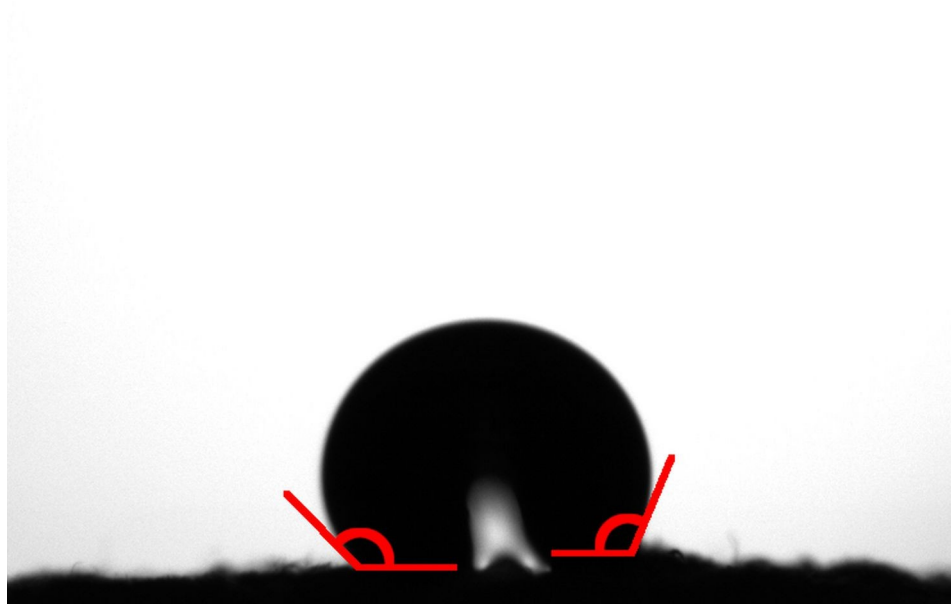


Figura 2.6 Exemplo de imagem obtida durante o ensaio de ângulo de contato. Em destaque, os ângulos medidos para se determinar o ângulo de contato médio.

2.3.3 Análise por ensaio mecânico de tração

Os ensaios mecânicos de tração foram conduzidos em uma máquina de Análise Dinâmico-Mecânica (DMA) (modelo Q800, TA Instruments, New Castle, EUA), variando-se a força aplicada à taxa de 1 N/min, de 0,001 a 18 N, sem variação da temperatura (testes conduzidos à temperatura ambiente, entre 25 e 30 °C). Foram utilizados corpos de prova com as dimensões 6,4 x 20,0 mm, medindo-se a espessura média de cada corpo de prova com um micrômetro. Os resultados do experimento também foram analisados pelo software do equipamento.

2.3.4 Análise por Espectroscopia na região do Infravermelho

As amostras do material produzido e os componentes isolados foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) (Modelo Vertex 70; Bruker, Billerica, EUA), no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , para análise de possíveis interações químicas entre os componentes. Cada ligação química apresenta diferentes tipos de vibrações e frequências características para cada vibração, que absorvem a luz infravermelha (IV) incidente se a

frequência for correspondente (HAACK, 2010). Ambas as faces das mantas produzidas foram analisadas. As varreduras foram configuradas em 64 leituras por amostra com resolução de 2 cm^{-1} , usando-se como branco a atmosfera local.

2.3.5 Análises de propriedades antimicrobianas

Foram utilizados como microrganismos-modelo as bactérias *Escherichia coli* (INCQS 33 ATCC 25922), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (INCQS 84 ATCC 13311) e *Staphylococcus aureus* (INCQS 15 ATCC 25923), por serem bactérias normalmente associadas a infecções hospitalares e para se avaliar possíveis diferenças de ação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Utilizou-se o meio de cultivo Mueller-Hinton (meio MH) em todos os ensaios, (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná) e ágar bacteriológico (Vetec-Merck, Darmstadt, Alemanha) para o preparo de meio de cultivo sólido. Para ambos, seguiu-se as concentrações recomendadas pelos respectivos fabricantes. Todas as manipulações de material estéril e de bactérias foram realizadas dentro de capela de fluxo laminar, utilizando-se a chama de um bico de Bunsen para manutenção da esterilidade do ambiente durante os ensaios.

2.3.5.1 Ensaio de atividade antibacteriana

2.3.5.1.1 Ensaio de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana do material foi analisada por meio do teste de difusão em ágar (ou “halo de inibição”), utilizando-se corpos de prova circulares de 1 cm de diâmetro. O teste é similar ao caracterizado pela ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009) como método de análise de citotoxicidade por contato indireto, e analisa-se a dimensão da zona de inibição do crescimento bacteriano ocasionada pela presença do material (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Na ausência desse halo ao redor do corpo de prova, analisa-se se houve a inibição por contato direto com a amostra cuidadosamente removendo-se o corpo de prova do ágar,

de forma a não remover possíveis colônias de bactérias presentes sob a amostra (CHAGAS et al., 2021; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ et al., 2012).

Para o preparo do pré-inóculo, tubos tipo Falcon contendo 10 mL de meio MH foram autoclavados por 15 min a 121 °C e, após esfriarem, receberam uma amostra da cultura de referência da bactéria testada. Em cada ensaio, o pré-inóculo de cada bactéria foi preparado em duplicata como medida de segurança caso algum pré-inóculo apresentasse problemas. Os pré-inóculos foram mantidos em estufa (modelo 503; Fanem, Guarulhos, São Paulo) a 36 °C para incubação durante um período de 15 a 18 h, quando foram então analisados por espectroscopia de ultravioleta-luz visível (UV-Vis) (modelo UV-1600; Shimadzu, Kyoto, Japão) para produção de inóculos padronizados.

Para isso, utilizou-se água deionizada como branco, e como padrão de turbidez para unidades formadoras de colônia (UFC) o Padrão McFarland 0,5, obtido misturando-se 99,5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Synth, Diadema, São Paulo) a 1 % v/v e 0,5 mL de solução aquosa de cloreto de bário (BaCl₂) (Lio Serum Chemicals, Ribeirão Preto, São Paulo) a 1% m/v (MCFARLAND, 1907). As leituras foram feitas a 625 nm, e o padrão corresponde à concentração de 1x10⁸ UFC/mL.

Comparando-se as leituras das amostras à do padrão, determinou-se a concentração de bactérias no pré-inóculo selecionado (apenas um de cada duplicata foi utilizado), e o inóculo foi padronizado para a concentração de 1x10⁶ UFC/mL, adicionando-se o volume necessário do pré-inóculo analisado a um tubo tipo Falcon contendo 10 mL de meio MH autoclavado, cujo líquido foi homogeneizado logo em seguida.

A Figura 2.7 ilustra o ensaio de halo de inibição. 100 µL do inóculo padronizado foram depositados sobre uma placa de Petri contendo meio MH sólido e espalhados pela superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski. Logo em seguida, três corpos de prova da amostra a ser testada foram cuidadosamente colocados sobre o ágar inoculado, mantendo-se distância entre os corpos de prova a fim de se evitar uma possível sobreposição de halos. As placas de Petri preparadas foram então incubadas em estufa a 36 °C por 24 h e posteriormente analisadas quanto à presença e tamanho do halo de inibição produzido pelas amostras. Adicionalmente, no caso de ausência de halo de

inibição, foi verificado se a região do ágar diretamente em contato com o material apresentava ou não sinais de crescimento bacteriano, visando a determinação de inibição por contato direto (CHAGAS et al., 2021; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ et al., 2012).

Cada placa de Petri preparada desta forma representa um teste em triplicata de uma cepa bacteriana para uma amostra; como as mantas produzidas apresentam duas camadas, cada camada foi testada para o contato direto com o ágar.

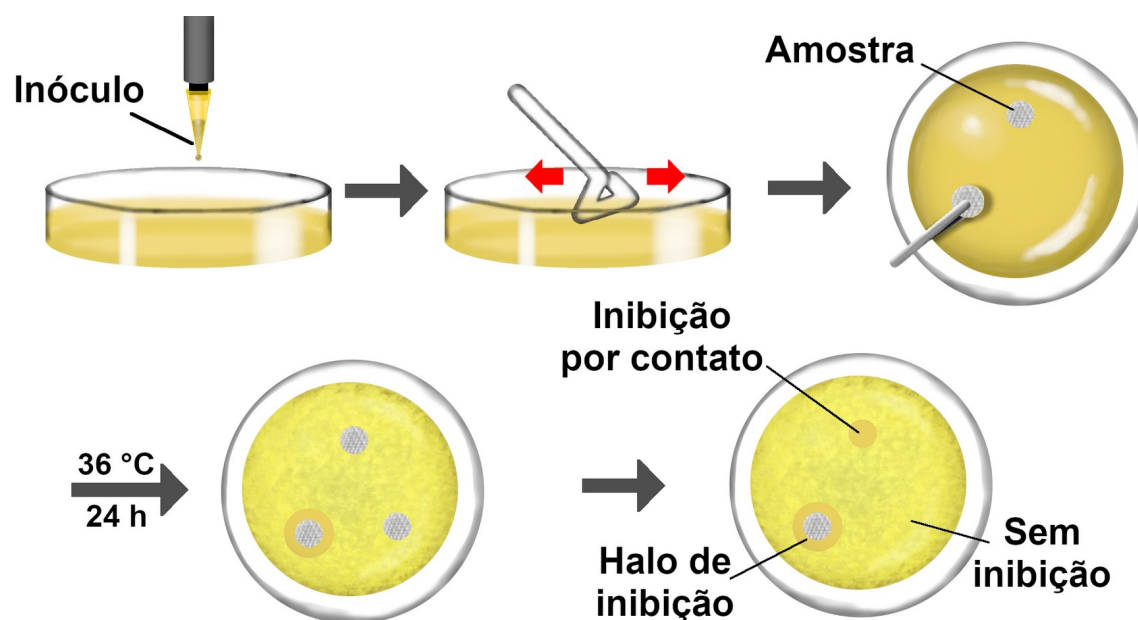


Figura 2.7 Esquema do ensaio de halo de inibição para cada amostra testada.

2.3.5.1.2 Concentração Inibitória Mínima

A atividade antimicrobiana da suspensão de Ag foi analisada quanto à sua concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para o teste CIM, o preparo do inóculo foi realizado de maneira similar ao do ensaio de halo de inibição, e meio MH líquido foi utilizado como meio de cultivo. Os ensaios foram conduzidos em placas de microdiluição descartáveis de 96 poços com fundo em “U” (Cral Artigos para Laboratório Ltda., Araraquara, São Paulo), usando-se uma placa por cepa bacteriana testada.

Como corante, foi utilizado cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (Sigma Aldrich – Merck, St. Louis, EUA) solubilizado em água destilada a 1 mg/mL. Apenas poços contendo células ativas ocasionam a redução do sal de tetrazólio em formazan (STOCKERT et al., 2018), produzindo cor avermelhada. Uma vez que este teste não diferencia células estáticas (vivas, mas com baixa atividade metabólica) de células efetivamente mortas, é necessário complementá-lo com o CBM (Figura 2.8).

Cada linha é identificada por uma letra, de A a H, enquanto as colunas são identificadas por números, de 1 a 12. As placas foram preparadas seguindo-se este procedimento:

- A linha A representa o teste em triplicata da esterilidade do meio. Somente 100 μ L de meio de cultivo são adicionados nos três primeiros poços da linha. Com a adição de corante, não deve haver mudança de cor, caso contrário há sinal de contaminação do meio utilizado.
- A linha B representa a triplicata do teste de viabilidade da cepa usada. 100 μ L de meio MH são adicionados aos 3 primeiros poços, e então 10 μ L de inóculo são cuidadosamente adicionados a cada poço, evitando-se aplicação muito próxima ou em contato direto com as paredes do poço, visando evitar o favorecimento de formação de filme bacteriano pela adesão das bactérias à parede do poço. Ausência de mudança de cor após a adição do corante indica que o inóculo utilizado não apresenta células viáveis.
- A linha C representa o controle positivo. Todos os poços recebem 100 μ L de meio, e no primeiro poço são adicionados 100 μ L de antibiótico; no caso deste trabalho, sulfato de estreptomicina (Sigma Aldrich – Merck, St. Louis, EUA) em solução aquosa a 20 mg/mL. O primeiro poço é homogeneizado com o auxílio de um pipetador automático, e 100 μ L são transferidos para o poço à direita. O processo se repete até o último poço, fazendo-se uma diluição seriada, e os 100 μ L retirados do último poço são descartados. Dessa forma, todos os poços contêm 100 μ L e metade da concentração de antibiótico do poço anterior. Após esse processo, cada

poço recebe 10 μL de inóculo. Espera-se que apenas os últimos poços indiquem atividade celular, garantindo-se que as cepas utilizadas não são resistentes.

- A linha D representa o teste de esterilidade da amostra: todos os poços recebem meio de cultivo e é feita a diluição seriada da amostra, de maneira similar ao antibiótico, sem posterior adição de inóculo. A alteração de cor nos últimos poços indicaria que a amostra está contaminada, mas que apenas em concentrações baixas o contaminante é capaz de crescer. Mudança de cor nos primeiros poços, diminuindo junto com a concentração da amostra, indicam que a amostra está contaminada e não consegue inibir o crescimento bacteriano, sendo a carga de bactérias proporcional ao volume de amostra presente no poço.
- As linhas E, F e G representam a triplicata do teste CIM propriamente dito: em cada fileira é feita a diluição seriada da amostra e cada poço recebe 10 μL de inóculo. Assim como na linha do controle positivo, espera-se que haja poços sem alteração de cor, indicando que o material possui alguma atividade antibacteriana. Caso contrário, o material é ineficiente contra as bactérias testadas, pelo menos nas concentrações testadas.
- Caso a amostra utilize solvente diferente de água, ou combinação de água com outro solvente, seria necessário dedicar uma fileira ao teste da atividade antibacteriana do solvente puro. Caso o solvente de fato apresente sinais de inibição bacteriana, é preciso considerá-la para a determinação da CIM da amostra.

Depois de preparadas, as placas foram incubadas a 36 °C por 24 h. Então, para determinação da atividade inibitória de maneira qualitativa, utilizou-se o corante em excesso. 50 μL de CTT foram adicionados a cada poço usado, e a placa foi deixada em repouso para que houvesse a mudança de cor indicativa de atividade celular.

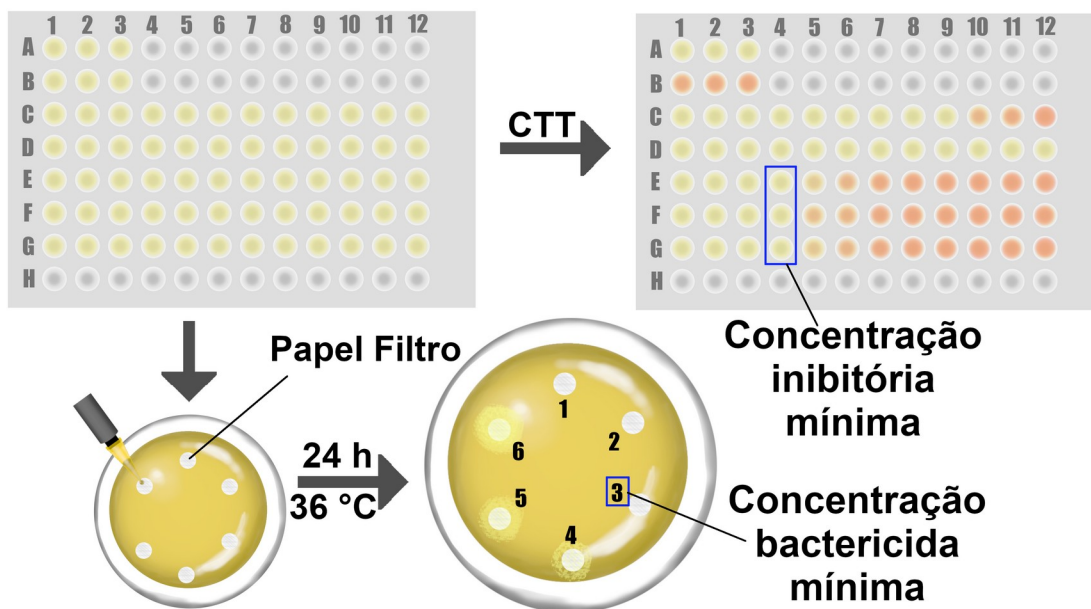


Figura 2.8 Esquema dos ensaios de concentrações inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas sendo usados de maneira complementar. Em destaque, os poços a que são atribuídas as referidas concentrações.

2.3.5.1.3 Concentração Bactericida Mínima

O teste CBM de cada bactéria foi realizado em duplicata. Discos de papel filtro foram esterilizados por imersão em etanol 70% v/v e posterior secagem com auxílio de bico de Bunsen, e então depositados sobre placas de Petri contendo meio MH sólido, cada placa recebendo 6 discos. Das placas do ensaio CIM, foram utilizadas somente as linhas correspondentes ao teste (E a G): uma das linhas recebeu adição do corante para uma pré-determinação da atividade antimicrobiana da amostra, e as outras duas linhas, antes de receberem o corante, foram usadas para a CBM, pois a atividade citotóxica do corante (STOCKERT et al., 2018) poderia impactar no crescimento das colônias.

Uma vez que o “ponto de inflexão” entre apresentar ou não atividade bactericida é o foco do ensaio, e cada placa de Petri contém amostras de até 6 poços, e 6 poços representam metade de uma linha, usar uma das linhas para determinação prévia de qual concentração deixa de apresentar atividade inibitória facilita a condução do ensaio CBM. Caso seja constatado que o “ponto de inflexão” (a última amostra a apresentar atividade bactericida e a primeira a não possuir o efeito) seria detectado usando-se uma única placa

de Petri, a segunda placa apenas confirmaria a ausência de atividade observada no teste CIM e seria portanto redundante.

Amostras de 10 µL de cada poço das linhas utilizadas, iniciando-se sempre pelo poço 1, foram coletadas logo antes da adição do corante e aplicadas sobre discos de papel filtro, sendo posteriormente incubadas a 36 °C por 24 h. Após este intervalo, as placas foram analisadas quanto ao possível crescimento de microrganismos provenientes de cada amostra, e os resultados foram comparados aos da CIM.

É esperado que amostras dos poços que apresentaram coloração proveniente da redução do CTT consigam produzir colônias de bactérias, e que as colônias provenientes de uma mesma placa de CIM apresentem aspecto similar; do contrário, há indícios de contaminação. Amostras de poços sem alteração de cor e que resultaram no aparecimento de colônias indicam concentração inibitória, mas não bactericida, e poços sem redução de corante que não produzem colônias após o período de incubação apresentam de fato atividade bactericida.

Os discos de papel filtro foram utilizados para auxiliar na retenção das amostras líquidas, que de outra forma poderiam livremente escorrer pela placa durante o manuseio, comprometendo os resultados. O papel esterilizado por si só não interfere, de maneira positiva ou negativa, no crescimento bacteriano, e a secagem completa antes da deposição em ágar garante que resíduos de etanol sejam totalmente removidos.

2.3.5.2 Ensaio de Penetração Microbiana

O material produzido também foi testado quanto à capacidade de bloquear a passagem de microrganismos do ambiente ou, pelo menos, da passagem de microrganismos não-virais e viáveis. O ensaio baseou-se na metodologia utilizada por (CHAGAS et al., 2021), com modificações (Figura 2.9). Tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MH esterilizado foram tampados com amostras dos materiais produzidos, com e sem adição de Ag, usando-se a mesma orientação pretendida para a aplicação (camada inferior voltada para baixo, em contato direto com o tubo). Amostras de dimensões 2 cm x 2 cm foram utilizadas, e foram fixadas nos tubos com o auxílio de Parafilm®, aplicado

somente na lateral de forma a não influenciar nos resultados. Como controle negativo (completa obstrução de microrganismos), foi utilizado um pedaço de Parafilm® de tamanho similar, esterilizado pela exposição à luz UV por 15 min, e então aplicado de forma a cobrir totalmente a entrada do tubo. Como controle positivo (nenhum impedimento à passagem de microrganismos), foi utilizado um tubo de ensaio destampado.

Os tubos foram então posicionados sobre uma bancada do laboratório, expostos à atmosfera ambiente, durante 10 dias. Após esse período, os tubos de ensaio foram homogeneizados com auxílio de agitador vórtex. Em seguida, em ambiente estéril, 10 µL do líquido de cada tubo foram aplicados sobre discos de papel filtro depositados sobre placas de Petri contendo meio MH sólido, em duplicata. As placas foram então incubadas a 36 °C por 24 h, e analisou-se o possível aparecimento de colônias de microrganismos.

Em vez de se incubar as amostras coletadas dos tubos em meio de sal manitol (CHAGAS et al., 2021), foi utilizado meio MH, o mesmo usado nos tubos. Dessa forma, qualquer microrganismo, e não apenas linhagens específicas, que pudesse ter se instalado nos tubos seria capaz de crescer durante a incubação da placa de Petri. Com isso, aumentou-se o espectro de microrganismos passíveis de serem detectados.

Também foi utilizado um volume menor de amostra de cada tubo em comparação com o ensaio realizado por Chagas et al. (2021) porque o teste é realizado de forma qualitativa, sendo possível analisar o resultado mesmo com um volume menor, e uma gota de menor tamanho é mais eficientemente retida pelo papel filtro, dificultando-se o escorrimento do líquido ao longo da placa durante o manuseio, o que comprometeria a análise dos resultados.

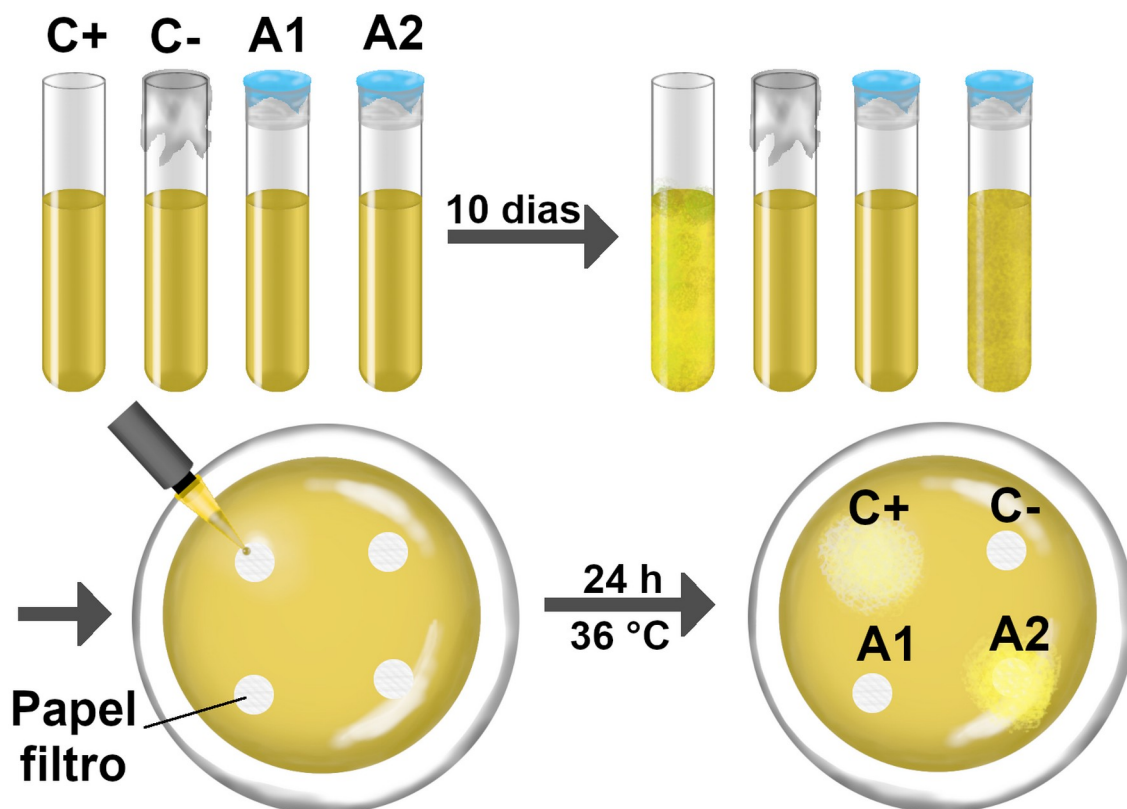


Figura 2.9 Representação do ensaio de penetração microbiana.

2.3.6 Análise de Citotoxicidade

Amostras do material foram avaliadas quanto à sua possível atividade citotóxica. Os testes foram conduzidos em parceria com o grupo da Dra. Natalia Inada do Instituto de Física da USP de São Carlos (IFSC), utilizando-se o método de exposição a extrato do material (ISO 10993-5:2009; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009), e foram utilizados fibroblastos HDFn para o ensaio.

Uma cultura de fibroblastos, mantida em estufa a 37 °C com concentração de CO₂ a 5%, cultivada em frasco descartável, foi cuidadosamente descolada das paredes do frasco com a adição de solução de tripsina. Após incubação por 2 min, a suspensão foi transferida para outra garrafa, que recebeu Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio foi então homogeneizado e submetido à centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e mais meio foi adicionado para ressuspender o pélete no fundo do tubo.

As células foram contadas de forma a se padronizar a concentração para 5×10^4 células viáveis/mL. Placas de microdiluição de 96 poços foram utilizadas, com cada linha representando replicatas de um mesmo teste: células incubadas no meio controle, e células a receber o extrato da amostra a ser analisada. O extrato foi preparado colocando-se uma amostra de 1 cm x 1 cm do material em um poço de uma placa de 6 poços no qual foi adicionado o meio de cultivo. Cada amostra foi testada em triplicata.

As células e as amostras foram incubadas por 24 h a 37 °C com concentração de CO₂ a 5%. Após este período, os poços destinados a receberem os extratos das amostras tiveram o meio de cultivo cuidadosamente removido, e então o volume correspondente do respectivo extrato foi adicionado. Após 24 h, os poços receberam brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como corante para marcar as células viáveis, e as placas foram então analisadas em um leitor de placas para contagem das células. Segundo a ISO 10993-5:2009, a ação citotóxica é considerada “leve” se não mais do que 20% das células apresentam algum tipo de alteração morfológica e/ou fisiológica, com ocasionais células lisadas, e caso o material apresente redução de viabilidade celular em até 30%, ele pode ser considerado não-citotóxico (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

2.3.7 Análise estatística

Todos os dados foram analisados no software OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation, Northhampton, EUA) para tratamento estatístico e produção de gráficos. O nível de significância estatística adotado foi de $\alpha = 5\%$ para todos os experimentos. A análise comparativa entre os dados foi feita usando-se o teste ANOVA seguido do teste Tukey (ABDI; WILLIAMS, 2010).

Capítulo 3 – Resultados e Discussões

3.1 Caracterização das nanopartículas

As NPs de Ag produzidas foram caracterizadas quanto a seu tamanho hidrodinâmico e ao potencial zeta. A baixa concentração da suspensão foi apontada como possível fonte de erro de leitura, e a suspensão foi considerada como “polidispersa”, o que seria devido à tendência das NPs produzidas de se aglomerar. No entanto, é possível observar o predomínio de partículas pequenas, com volume hidrodinâmico médio representado por um pico de máximo em 19,4 nm com largura de 4,38 nm, na análise de contagem de partículas (Figura 3.1). É importante ressaltar que o volume hidrodinâmico corresponde à NP em si combinada com estabilizantes e outras moléculas adsorvidas à sua superfície (HERAVI, 2020), e portanto representa um volume maior do que o tamanho real da NP. A determinação do potencial zeta pelo equipamento também foi afetada pelos fatores mencionados, com valor médio estimado em $-21,0 \pm 18,4$ mV.

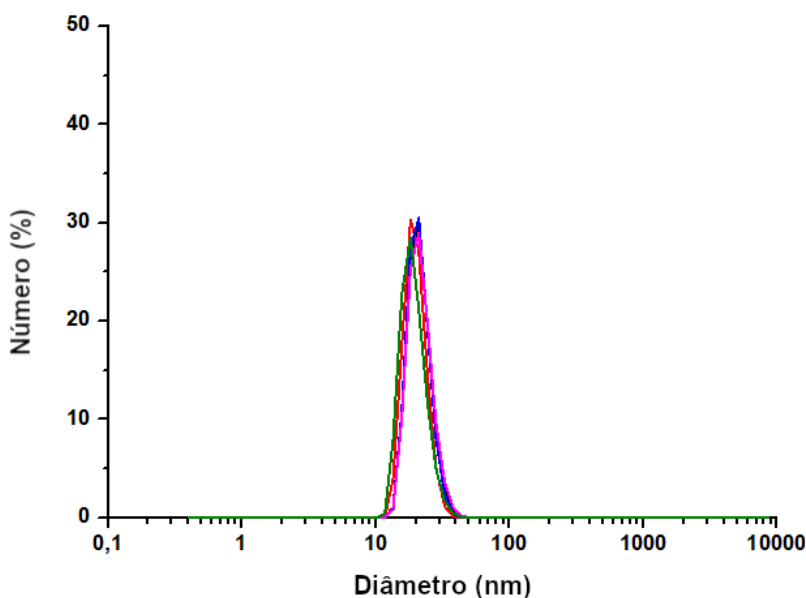


Figura 3.1 Análise por DLS da suspensão aquosa de NPs de Ag. Análise do tamanho (diâmetro) hidrodinâmico médio em termos do número de partículas. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

As NPs de ZnO foram caracterizadas por MEV e DRX, conforme apresentado na Figura 3.2. As NPs obtidas apresentam morfologia predominantemente planar, com largura média de 139 ± 96 nm (Figura 3.2 a)) O difratograma corresponde ao padrão apresentado no cartão JCPDS nº 36-1451, indicando um arranjo cristalino hexagonal do tipo wurtzita, enquanto os picos bem-definidos e ausência de picos secundários revelam a ausência de outras fases e contaminantes (Figura 3.2 b)).

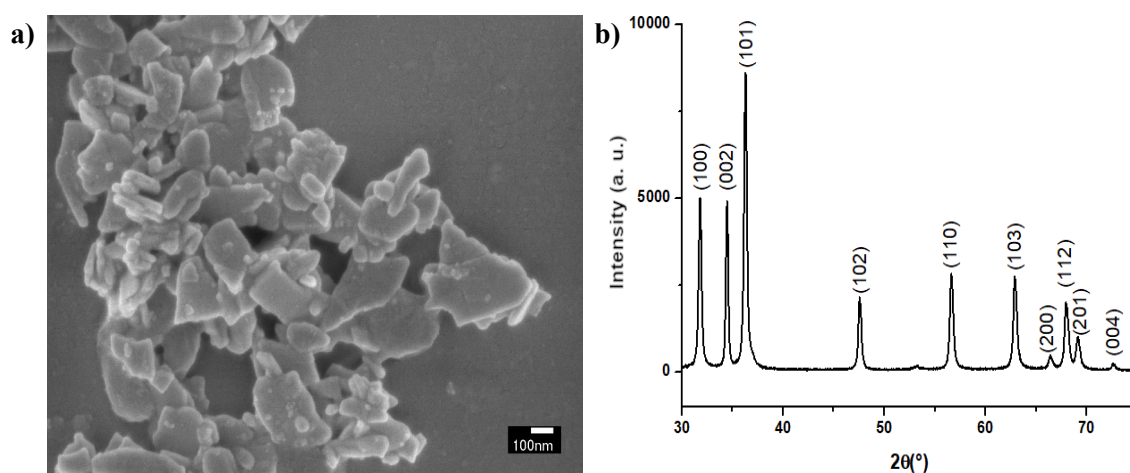


Figura 3.2 Análise das NPs de ZnO obtidas. a) Imagem de MEV-FEG e b) difratograma de DRX. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

3.2 Otimização dos parâmetros experimentais de fiação

A BN precisou ser separada dos demais componentes do látex devido à formação de gel insolúvel decorrente da presença de substâncias hidrossolúveis (SILVA, 2017; TARACHIWIN; SAKDAPIPANICH; TANAKA, 2003). A BN, para completa solubilização, demandava um período de 7 dias sob agitação e aquecimento (80 °C) em tolueno, de 2 a 3 dias sem aquecimento com clorofórmio puro, e até 5 h usando-se a mistura clorofórmio-ácido fórmico na proporção respectiva entre os solventes de 98:2 v/v. Foi possível dissolver até 5 % m/v de BN, mas a solução apresentava viscosidade muito alta para ser processada, então o verdadeiro limite foi estabelecido em 4 % m/v, similar ao utilizado por Sousa et al. (2019). Além disso, a fiação de borracha pura resulta na coalescência das fibras (imagem de MEV na Figura 3.3) devido à sua elevada coesão, o que também dificultou sua remoção do coletor, tornando necessário o uso de polímeros auxiliares.

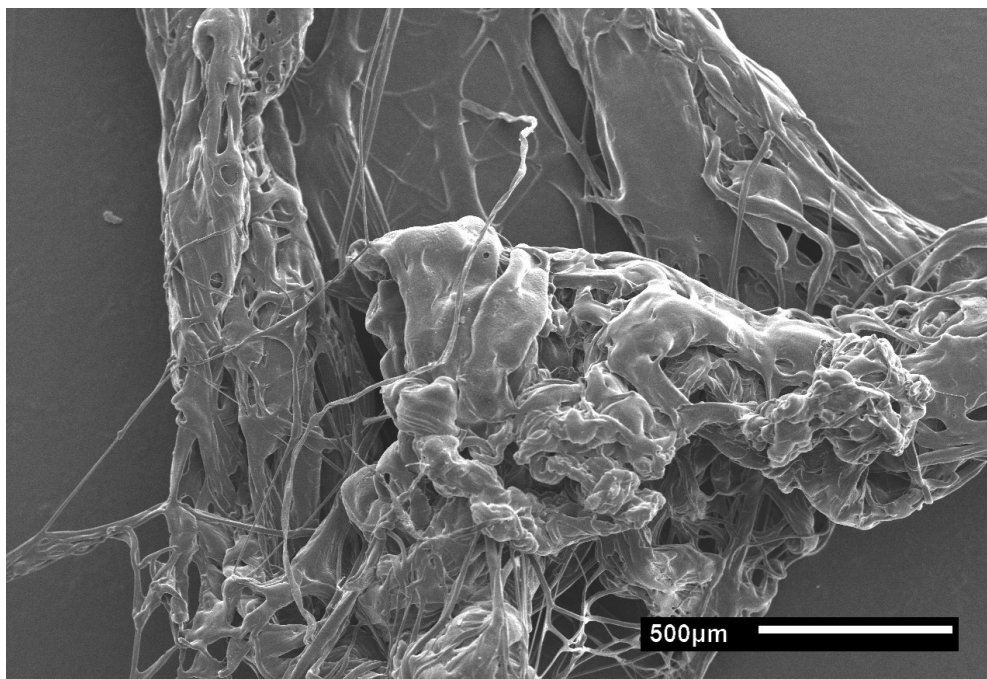


Figura 3.3 Imagem gerada por MEV das fibras obtidas por SB-Spinning de BN pura preparada em solução de clorofórmio-ácido fórmico 98:2 v/v.

Sousa et al. (2019) atribuíram a formação das fitas à dificuldade de se evaporar completamente o solvente contido nas fibras. Adicionalmente, é possível que os componentes não-borracha do látex tenham ocasionado um aumento da viscosidade e dificultado o processamento do material.

Após os testes de solubilidade e compatibilidade entre BN e os polímeros auxiliares, foi possível observar que apenas o PLA 3251D, de menor massa molar, e o PEG 400 apresentavam certa compatibilidade com a BN. Ou seja, mesmo que apenas em concentrações pequenas, era possível misturá-los com BN e produzir uma solução que obedecesse ao critério de estabilidade proposto. A mistura foi otimizada em 2% m/v de BN e 1% m/v de PLA, e os materiais que utilizaram PEG receberam adição de 3% m/v do polímero à solução. As condições de fiação foram definidas em: vazão de solução de 15 mL/h, aproximadamente a mesma utilizada por Sousa et al. (2019); pressão do ar de 2 bar; 2 cm de protrusão do cânulo interno; e 35 cm de distância de trabalho. Estes parâmetros resultaram em uma fiação contínua sem aparente influência das condições ambientais encontradas. Apesar da possibilidade de obtenção de fibras individuais para as blendas

BN-P (imagens de MEV na Figura 3.4), o material obtido ainda apresentava alta adesividade, dificultando a sua recuperação para os ensaios posteriores. Como forma de contornar este problema, o material passou a ser produzido na forma de manta bicamada (GRAÇA et al., 2021), fiando-se primeiramente uma camada de PLA sobre a qual a camada contendo BN é depositada, conforme mostrado na Figura 2.3. De acordo com a aplicação pretendida, a camada de PLA foi denominada “camada superior”, enquanto a blenda de BN representa a “camada inferior”.

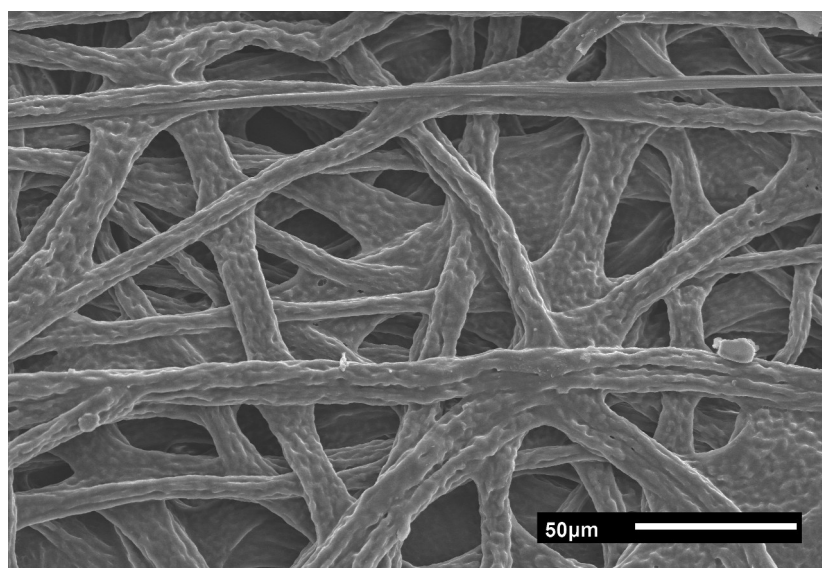


Figura 3.4 Imagem gerada por MEV para a blenda BN-PLA 2:1.

Para a camada superior, o PLA 4060D apresentou melhor fiação e deposição, sendo então escolhido como padrão para os testes de fiação. A concentração de PLA foi fixada em 12 % m/v. Os parâmetros de fiação, sem e com adição de NPs de ZnO, foram otimizados em experimentos preliminares como: vazão de solução de 7,5 mL/h; pressão do ar de 2 bar; 2 mm de protrusão do cânulo interno; e 20 cm de distância de trabalho. Para a manta bicamada, o tempo de fiação da camada superior foi fixado em 10 min, e a fiação da camada inferior em 30 min. A aspersão de Ag teve seus parâmetros definidos em: vazão de suspensão de 15 mL/h; pressão do ar em 3 bar; 2 mm de protrusão do cânulo interno; 30 cm de distância de trabalho; e tempo de aspersão de 1 h.

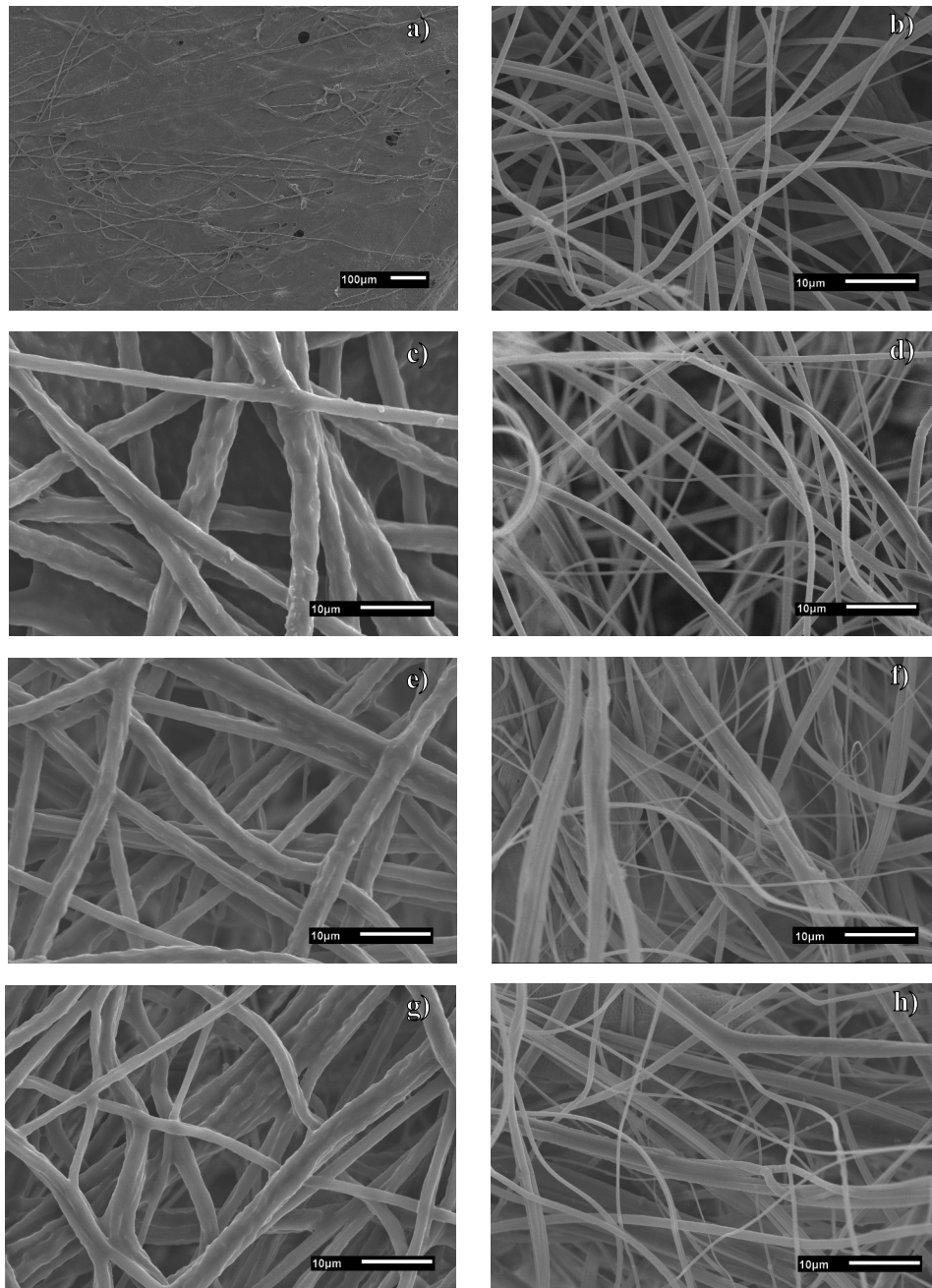


Figura 3.5 Imagens obtidas por MEV de cada manta bicamada: camada inferior, sem adição de PEG (a, c, e, g), e superior (b, d, f, h), respectivamente, para as condições: a) e b) sem NPs na camada superior; c) e d) com NPs de ZnO a 1% m/m; e) e f) com NPs de ZnO a 2,5% m/m; g) e h) com NPs de ZnO a 5% m/m.

Foi observado que, na ausência de NPs de ZnO, a camada contendo BN tendia a formar um filme contínuo, enquanto que à medida que o teor de ZnO aumentava, o diâmetro médio das fibras de ambas as camadas diminuía (Figura 3.5), conforme exposto

na Tabela 3.1. A adição de NPs de ZnO, portanto, além do apelo terapêutico, também se fez necessária como um componente estrutural, facilitando a fabricação apropriada de uma manta fibrosa bicamada. A aspersão de Ag foi realizada após as mantas terem secado por cerca de uma semana e, por se constituir de uma suspensão aquosa, incapaz de dissolver a camada superior durante o processo de aspersão, não poderia ser responsável por alterações significativas no diâmetro das fibras.

Tabela 3.1 Diâmetros médios das fibras produzidas para mantas sem PEG.

	Diâmetro médio da camada inferior (μm)	Diâmetro médio da camada superior (μm)
Sem NPs	(não forma fibras)	$1,06 \pm 0,46^{a*}$
ZnO 1 %	$3,77 \pm 1,39^a$	$1,01 \pm 0,56^{ab}$
ZnO 2,5 %	$3,25 \pm 1,21^b$	$0,86 \pm 0,57^{bc}$
ZnO 5 %	$2,54 \pm 0,91^c$	$0,74 \pm 0,45^c$

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).

O material, no entanto, apresentou considerável hidrofobicidade em ambas as camadas, o que dificultaria a adesão celular (ARIMA; IWATA, 2007; KHANG et al., 2000), pretendida para a camada inferior. De modo a corrigir isso, a compatibilidade da BN foi testada para polímeros mais hidrofílicos. O único polímero que apresentou bons resultados foi o PEG 400. O limite de adição de PEG encontrado correspondeu a 5 % m/v, mas o material fiado apresentava umidade residual. Restringindo-se a adição de PEG a 3 % m/v, foi possível obter uma manta seca, mantendo-se os mesmos parâmetros de fiação dos testes anteriores. Por ser líquido, o PEG sozinho não seria capaz de oferecer as propriedades apresentadas pelo PLA, então ao invés de ser utilizado como um substituto para o PLA, ele foi usado como um aditivo. Embora não tenha alterado os parâmetros de fiação, por ser um polímero hidrofílico e líquido, a presença do PEG no material interferiu na morfologia das fibras, mostradas na Figura 3.6 e Tabela 3.2.

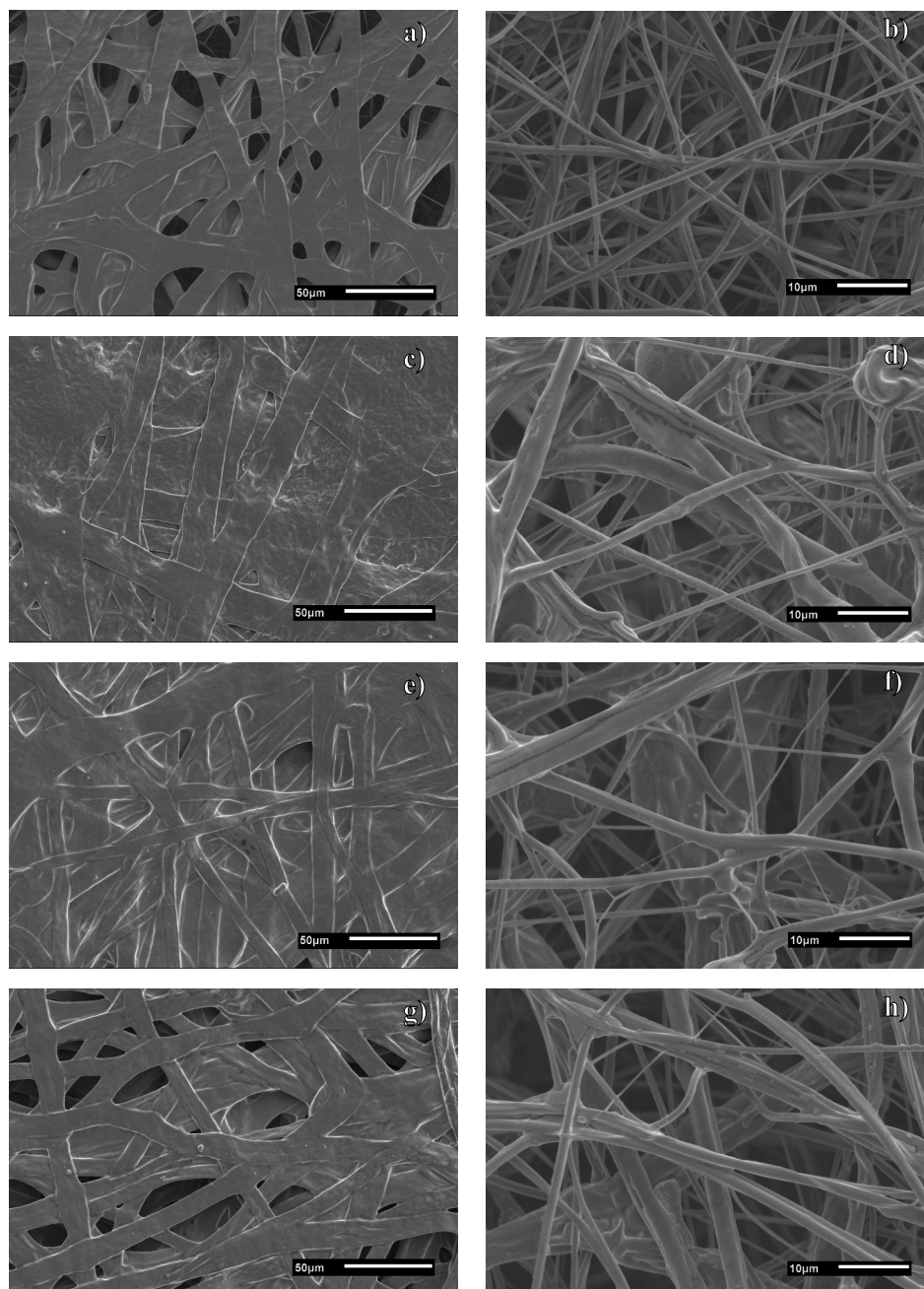


Figura 3.6 Imagens obtidas por MEV das mantas bicamada: camada inferior, com adição de PEG (a, c, e, g), e superior com adição de Ag (b, d, f, h), respectivamente, para as condições: a) e b) sem ZnO na camada superior; c) e d) com NPs de ZnO a 1% m/m; e) e f) com NPs de ZnO a 2,5% m/m; g) e h) com NPs de ZnO a 5% m/m. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

A Tabela 3.2 apresenta os diâmetros de fibras (ou fitas) médios para as amostras contendo PEG. As fibras da camada inferior se coalesceram em fitas, em algumas amostras formando filmes (Figura 3.6), enquanto as fibras da camada superior

apresentaram diâmetros maiores e com maior distribuição de tamanho, o que poderia ser explicado pela presença do PEG que, dificultando a evaporação do solvente, ocasionaria a fusão de fibras enquanto a camada inferior é depositada. É possível observar em algumas imagens (Figura 3.6) a presença de um material que parece unir as fibras coalescidas, o qual poderia ser o PEG.

Tabela 3.2 Diâmetros médios das fibras produzidas para mantas com PEG e Ag.

	Diâmetro médio da camada inferior (μm)	Diâmetro médio da camada superior (μm)
Sem ZnO	11,52 \pm 2,45 ^{a*}	1,00 \pm 0,46 ^{a*}
ZnO 1%	13,40 \pm 6,19 ^b	1,42 \pm 0,88 ^b
ZnO 2,5 %	10,28 \pm 4,24 ^a	1,46 \pm 0,90 ^b
ZnO 5 %	11,27 \pm 2,70 ^a	1,20 \pm 1,06 ^{ab}

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$). Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

A Figura 3.7 mostra uma imagem de MEV obtida da seção transversal de um dos materiais produzidos, evidenciando as diferentes morfologias de cada camada: o aspecto similar a um filme da camada inferior, formada por fitas de BN-P-P, e as fibras compostas por PLA com adição de NPs de ZnO.

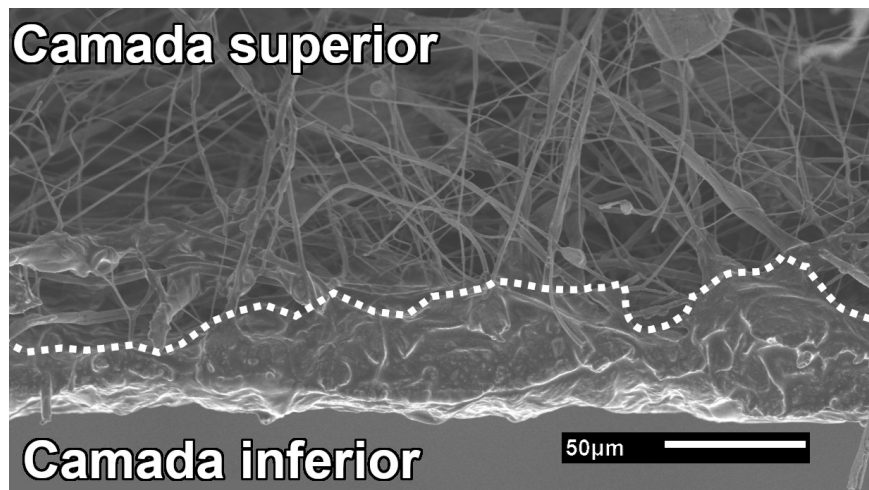


Figura 3.7 Imagem obtida por MEV da seção transversal de uma das amostras do material contendo PEG e ZnO a 5% m/m. Traduzido com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Com base nas imagens obtidas, comprova-se que foi produzida uma MNTB, utilizando-se BN como um de seus componentes. Considerando-se que a BN foi concentrada por um simples processo de centrifugação e que pôde ser utilizada sem modificações químicas, que as blendas foram preparadas com uma simples mistura dos polímeros utilizados (BN, PLA e PEG na respectiva proporção em massa 2:1:3) no solvente escolhido (clorofórmio e ácido fórmico), e que ambas as NPs utilizadas foram produzidas por técnicas simples e baratas, e também incorporadas ao material de forma simples, o ajuste da quantidade de cada componente utilizado se dá de forma prática e pouco custosa. Isso significa que testes futuros para melhor ajuste das propriedades do material, mesmo que envolvam a substituição de algum componente, não demandam grandes esforços para se adaptar a metodologia. A facilidade de se produzir e mesmo alterar a composição desta MNTB a tornaria atrativa para produção em escala industrial, o que teria impacto decisivo na sua viabilidade econômica.

3.3 Ângulo de contato e correção da hidrofobicidade

Nas mantas sem PEG, foi observado comportamento hidrofóbico em ambas as camadas inferior e superior, com uma diferença estatística significativa, porém não

significante, relacionada à presença de NPs de ZnO no material (Figura 3.8). Essas sutis alterações poderiam estar relacionadas às mudanças na porosidade do material devido às alterações no diâmetro médio das fibras pois, como é mostrado na Figura 3.5, a adição de ZnO não causa alterações perceptíveis na morfologia das fibras da camada superior.

Dessa forma, o ZnO estaria disperso ao longo do volume da fibra, não impactando diretamente na hidrofobicidade do material. O ZnO é um ativador de cura da BN, o que significa que a reação de vulcanização é acelerada na sua presença (SAHOO et al., 2007; SAHOO; BHOWMICK, 2007). Como o ZnO estaria retido nas fibras da camada superior, haveria pouco contato entre as NPs e a BN da camada inferior, o que permitiria desconsiderar a possibilidade de vulcanização da BN como um interferente na análise, já que haveria pouca disponibilidade de ZnO e apenas enxofre residual na BN.

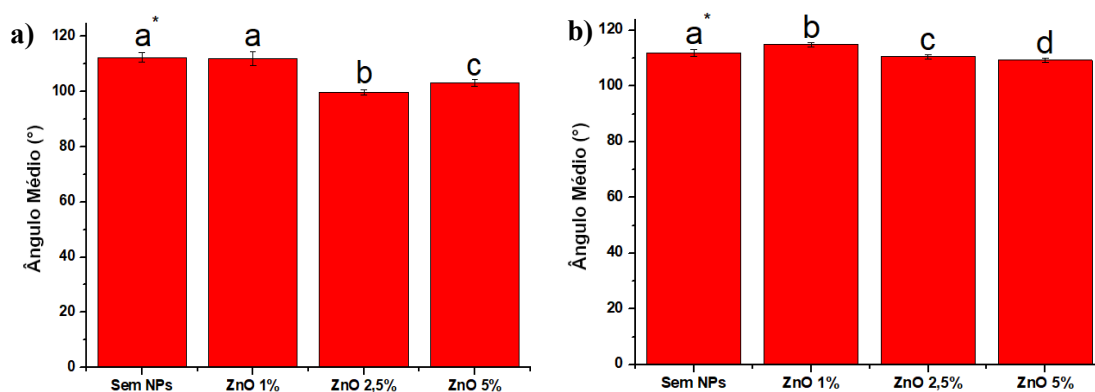


Figura 3.8 Ângulo de contato para as amostras sem PEG: a) camada inferior e b) camada superior. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p < 0.05$).

Uma vez que células apresentam melhor adesão a superfícies que possuem hidrofobicidade moderada, isto é, entre 45 e 90 ° de AC com água (ARIMA; IWATA, 2007; KHANG et al., 2000), a adição de PEG à camada inferior foi testada e mantida para testes subsequentes. Como esperado, o PEG tornou a camada à qual foi adicionado mais hidrofílica, sem alterar de maneira significativa a camada superior, que se manteve hidrofóbica (Figura 3.9).

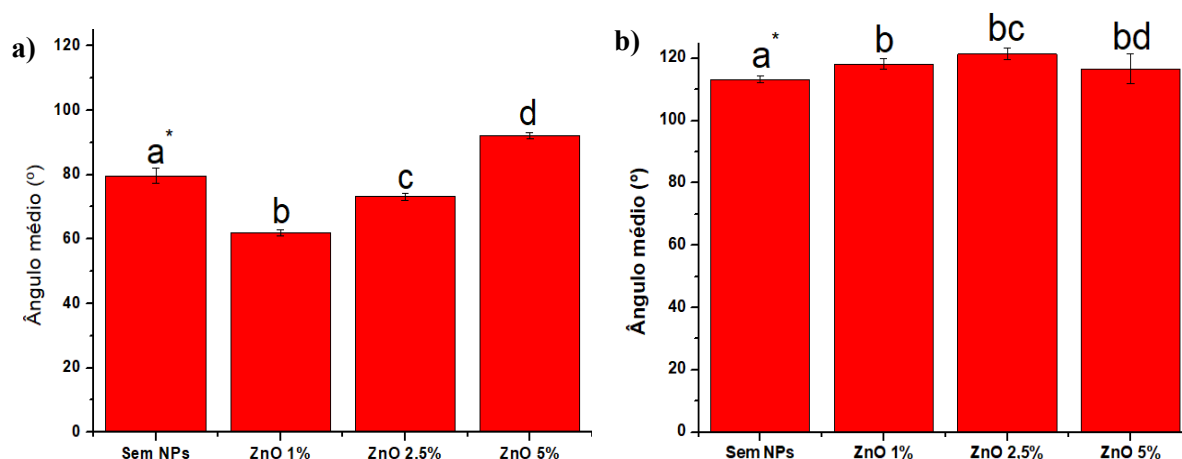


Figura 3.9 Ângulo de contato para as mantas com adição de PEG para todas as concentrações de ZnO testadas. Resultados obtidos pela análise a) da camada inferior e b) da camada superior de cada material. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).

A aspersão de Ag influenciou a hidrofobicidade da camada superior (Figura 3.10). A presença de NPs metálicas depositadas sobre as fibras conferiria um caráter polar à camada superior que, aliado à estrutura porosa da camada, explicaria o comportamento hidrofílico que resulta na rápida absorção do líquido de teste. Esta rápida absorção limitou o tempo de análise do ângulo em 1 s, pois manter um intervalo maior para todas as amostras faria com que as amostras mais hidrofílicas apresentassem valores de AC bem menores e com variação de valores elevada. A camada inferior, mesmo apresentando caráter moderadamente hidrofílico graças à presença de PEG, não mostrou a mesma velocidade de absorção de gotas de água, o que poderia ser explicado pela estrutura mais compacta e menos porosa desta camada, conforme mostrado nas Figuras 3.6 e 3.7. O grande desvio padrão apresentado nas amostras da camada superior (Figura 3.10 b)) evidencia a rápida absorção do líquido de teste.

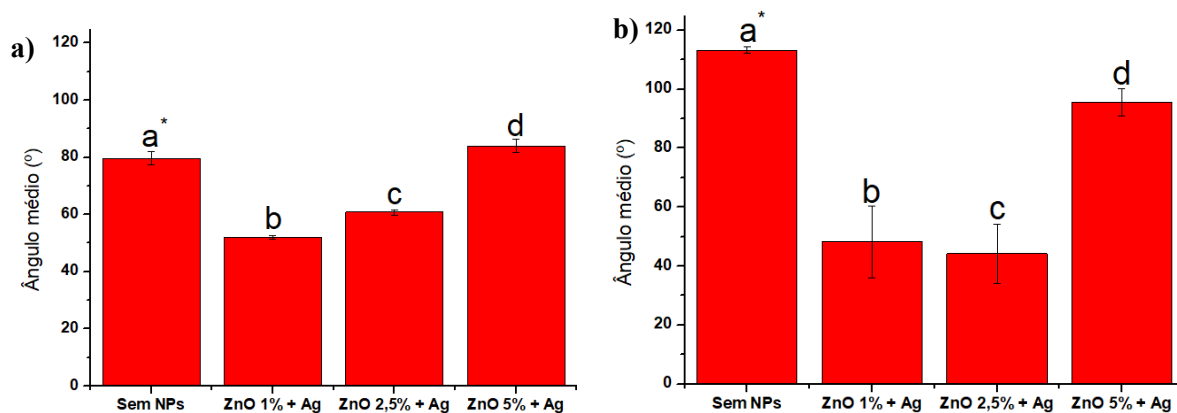


Figura 3.10 Ângulo de contato das amostras com PEG e Ag para todas as concentrações de ZnO testadas, em comparação ao branco. Resultados obtidos pela análise a) da camada inferior e b) da camada superior de cada material. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).

É possível, também, que o processo de aspersão tenha contribuído para um aumento na hidrofiliicidade da camada superior devido à força centrífuga: a camada superior, voltada para o lado externo para receber a aspersão de NPs de Ag, poderia receber uma quantidade significativa de PEG, o que seria facilitado pela umidade fornecida. As fibras, já secas, não seriam capazes de coalescer como foi observado durante o processo de fiação, pois a presença de solvente residual contribuiria grandemente para este fenômeno. No entanto, devido à baixa massa molecular do PEG utilizado, e considerando-se o seu uso em quantidade que poderia ser avaliada como excessiva (Tabela 2.1), há possibilidade de que a difusão deste polímero tenha ocorrido entre as camadas do material, mesmo que discretamente.

Na Tabela 3.3 são mostradas as estimativas de tempo de absorção do líquido de teste pela superfície da camada testada. Os resultados obtidos confirmaram as tendências observadas pelo ensaio de AC: amostras com comportamento hidrofóbico apresentaram tempo de absorção teórico muito longo, próximo ou superior a 1 h (3600 s), enquanto amostras mais hidrofílicas precisaram de poucos minutos, ou até menos de um minuto, para absorver o líquido de teste. O grande desvio padrão observado pode ser atribuído não somente a eventuais erros de modelagem da abordagem utilizada, mas também a variações entre as amostras. As MNTBs, justamente por serem compostas de fibras aleatoriamente depositadas, apresentam baixa uniformidade e, por isso, testes

diretamente relacionados à sua morfologia apresentam variações consideráveis mesmo entre corpos de prova retirados de uma mesma amostra.

Tabela 3.3 Tempo de absorção do líquido de teste pelo material.

	Camada Inferior Tempo de absorção (s)	Camada Superior Tempo de absorção (s)
Sem aditivos	10025,70 ± 4377,25	8371,23 ± 490,72
ZnO 1%	10548,23 ± 4060,90	12701,19 ± 1184,06
ZnO 2,5%	4878,10 ± 416,11	8091,45 ± 1522,07
ZnO 5%	5653,06 ± 589,49	8710,99 ± 2541,72
PEG	1910,45 ± 476,24	4913,17 ± 1483,83
PEG + ZnO 1%	169,36 ± 108,78	8655,70 ± 2139,69
PEG + ZnO 2,5%	232,04 ± 113,81	7707,39 ± 2542,38
PEG + ZnO 5%	2601,08 ± 840,51	7520,56 ± 1032,79
PEG + ZnO 1% + Ag	35,20 ± 9,00	4,52 ± 2,79
PEG + ZnO 2,5% + Ag	40,68 ± 15,19	14,39 ± 9,82
PEG + ZnO 5% + Ag	163,59 ± 89,48	80,03 ± 64,29

3.4 Análise por espectroscopia no infravermelho

A análise por FTIR-ATR das amostras produzidas (Figura 3.11) mostrou que os principais picos e bandas dos polímeros utilizados (Tabela 3.4) (MANOHAR et al., 2017; NUN-ANAN et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2016; PAIVA et al., 2015) foram preservados após a fabricação do material. Estes resultados permitem formular a hipótese de que os componentes não interagem covalentemente entre si.

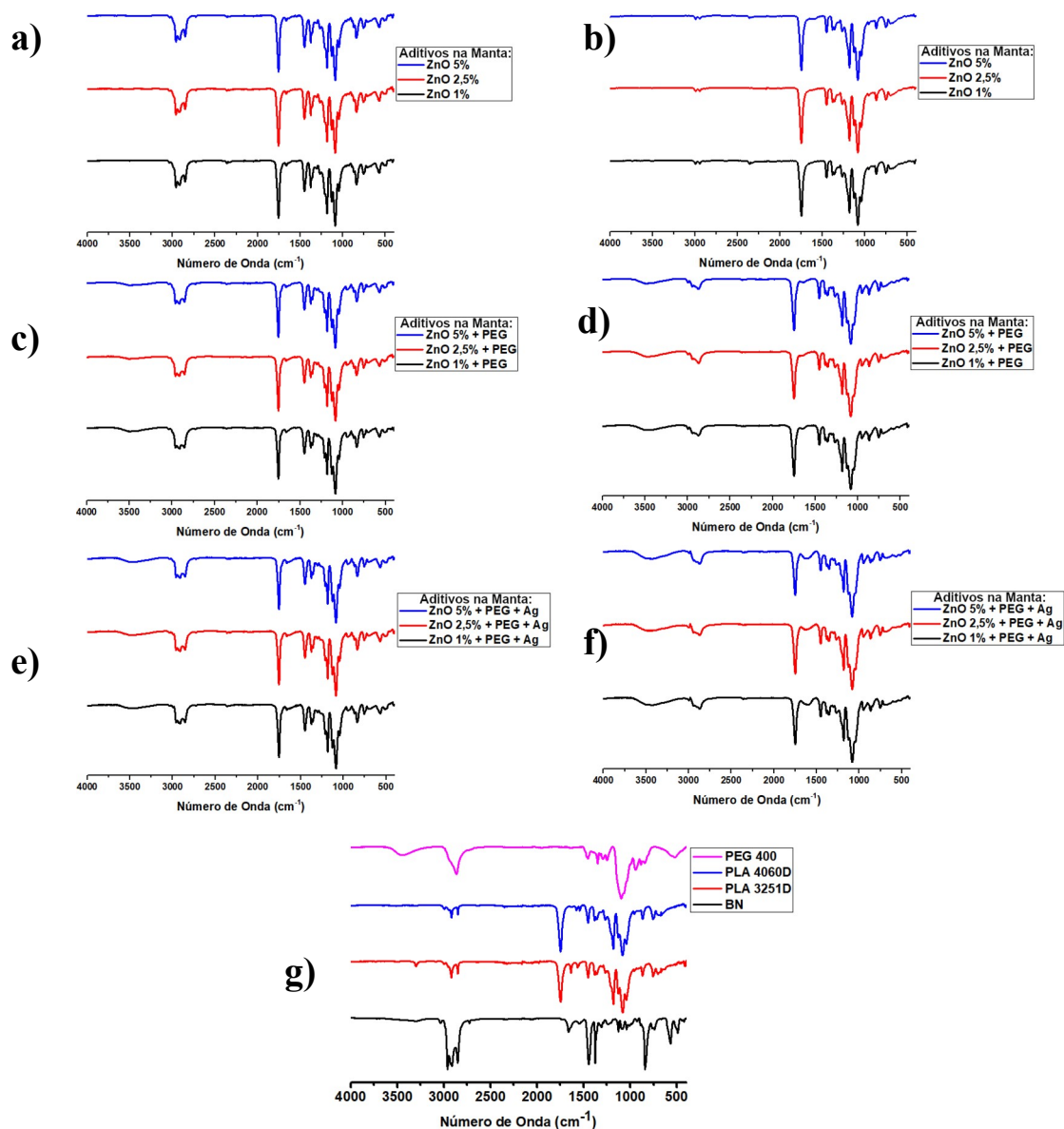


Figura 3.11 Análise por espectroscopia no infravermelho para as mantas produzidas. Respectivamente, camada inferior e superior para as MNTBs contendo como aditivos: somente ZnO (a e b); ZnO e PEG (c e d); ZnO, PEG e Ag (e e f). g) corresponde aos polímeros isolados, para comparação dos perfis obtidos. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Tabela 3.4 Picos característicos da espectroscopia no infravermelho e atribuições.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3445 (PEG)	O-H associado
3035 (BN)	C-H de alceno – deformação axial
2962-2853 (BN, PLA, PEG)	C-H em alifáticos (C primário, secundário e terciário) – deformação axial
1743 (PLA)	C=O de éster – deformação axial
1660 (BN)	C=C – deformação axial
1444 (BN)	CH ₂ – deformação angular
1380-1376 (BN, PLA)	CH ₃ – deformação angular
1180-1080 (PLA)	C-O de éster – deformação axial e angular
1087 (PEG)	C-O de éter

Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Conforme mostrado na Figura 3.11, os perfis de ligações químicas de cada componente apenas se sobrepõem quando se compara as mantas produzidas com os componentes isolados, o que indica que não houve reação química entre os componentes durante o processo de fiação. É possível também observar picos característicos do PEG na camada superior, o que confirmaria a hipótese de que um pouco de PEG penetra na camada superior durante o processo de fiação, contribuindo para a coalescência de algumas fibras. Esses sinais de PEG na camada superior aparecem nas amostras com e sem aspersão de Ag, mas somente as amostras contendo Ag apresentaram perda de hidrofobicidade. Isto poderia indicar que a quantidade de PEG presente por si só não seria suficiente para reduzir a hidrofobicidade da camada superior, sendo apenas um “resíduo”, ou que o PEG não estaria livre na superfície das fibras, ficando preferencialmente retido no *bulk* das fibras devido à afinidade com o PLA (uma vez que seu uso como plasticizante

ou componente de blenda para PLA é recorrente) (CHIENG et al., 2013; NEPOMUCENO et al., 2018; TAJARI; SADMIA; HOSSEINI, 2022), e possivelmente com as NPs de ZnO presentes, pois metais de transição interagem com as cadeias de PEG, o que permite o seu uso como estabilizante para síntese de NPs (ANDRE et al., 2015; ZHOU et al., 2006).

3.5 Análise da distribuição das nanopartículas

A análise por MEV-EDS (Figuras 3.12 a 3.16) confirmou a presença de ZnO e Ag nas mantas produzidas. A face superior apresenta boa distribuição dos sinais de ZnO, indicando uma boa incorporação das NPs nas fibras, enquanto os sinais de Ag aparentam “desenhar” a superfície das fibras analisadas, sugerindo uma localização mais superficial, conforme seria esperado. Foram analisadas as camadas superiores das mantas contendo ambas as NPs e, para fins de comparação, a camada superior da manta contendo somente ZnO na concentração mais alta e a camada inferior contendo a maior concentração de ZnO e simultaneamente Ag.

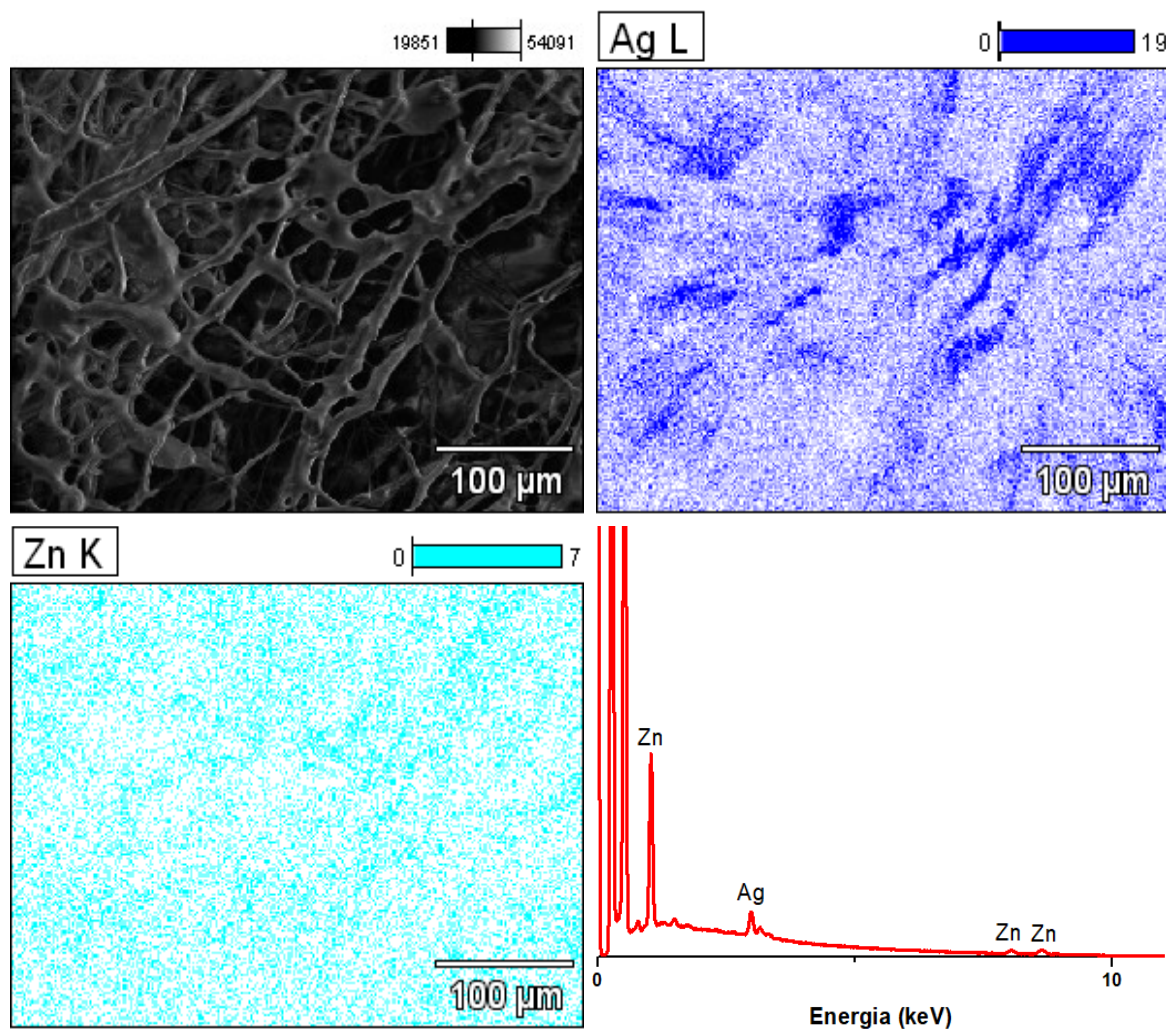


Figura 3.12 Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 1% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

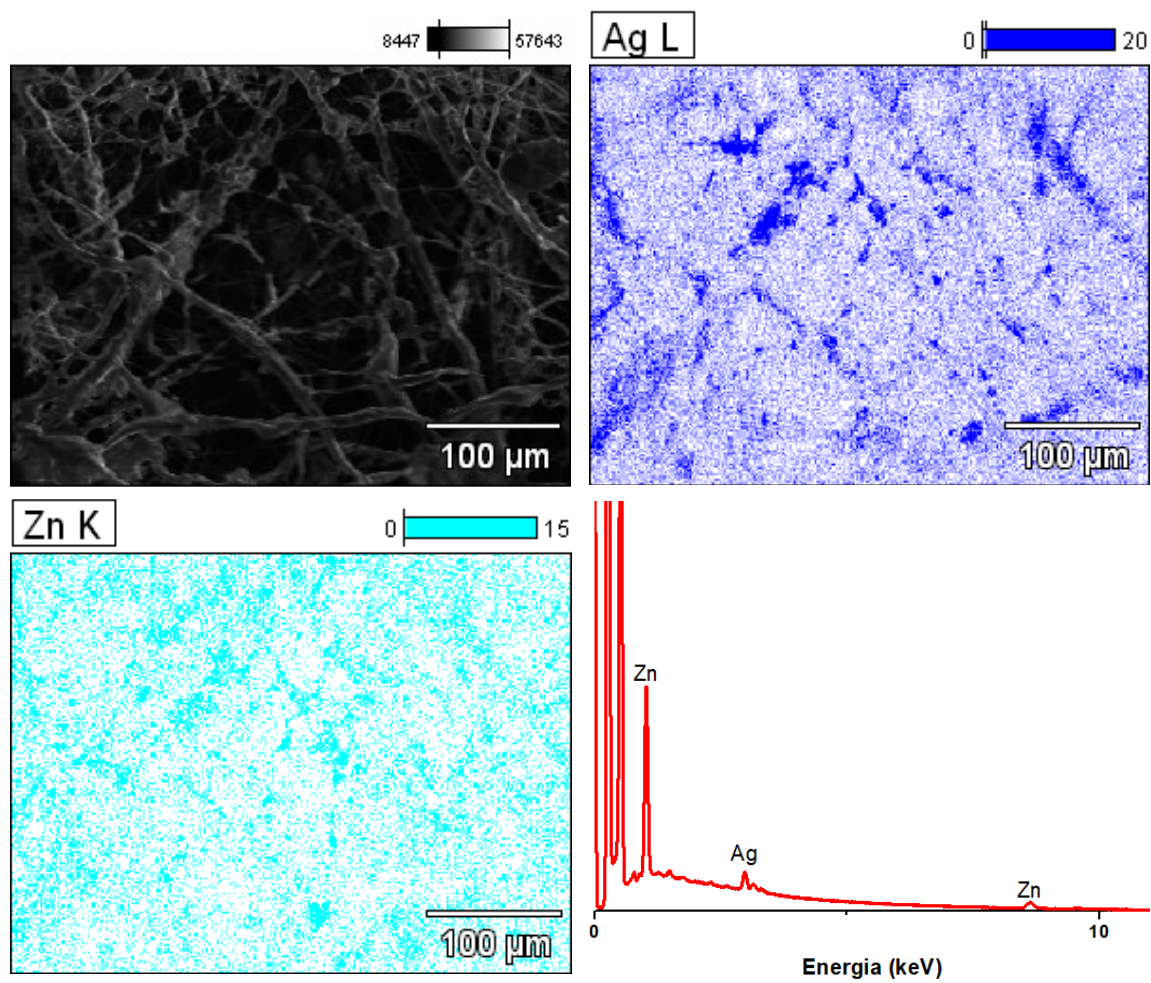


Figura 3.13 Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 2,5% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

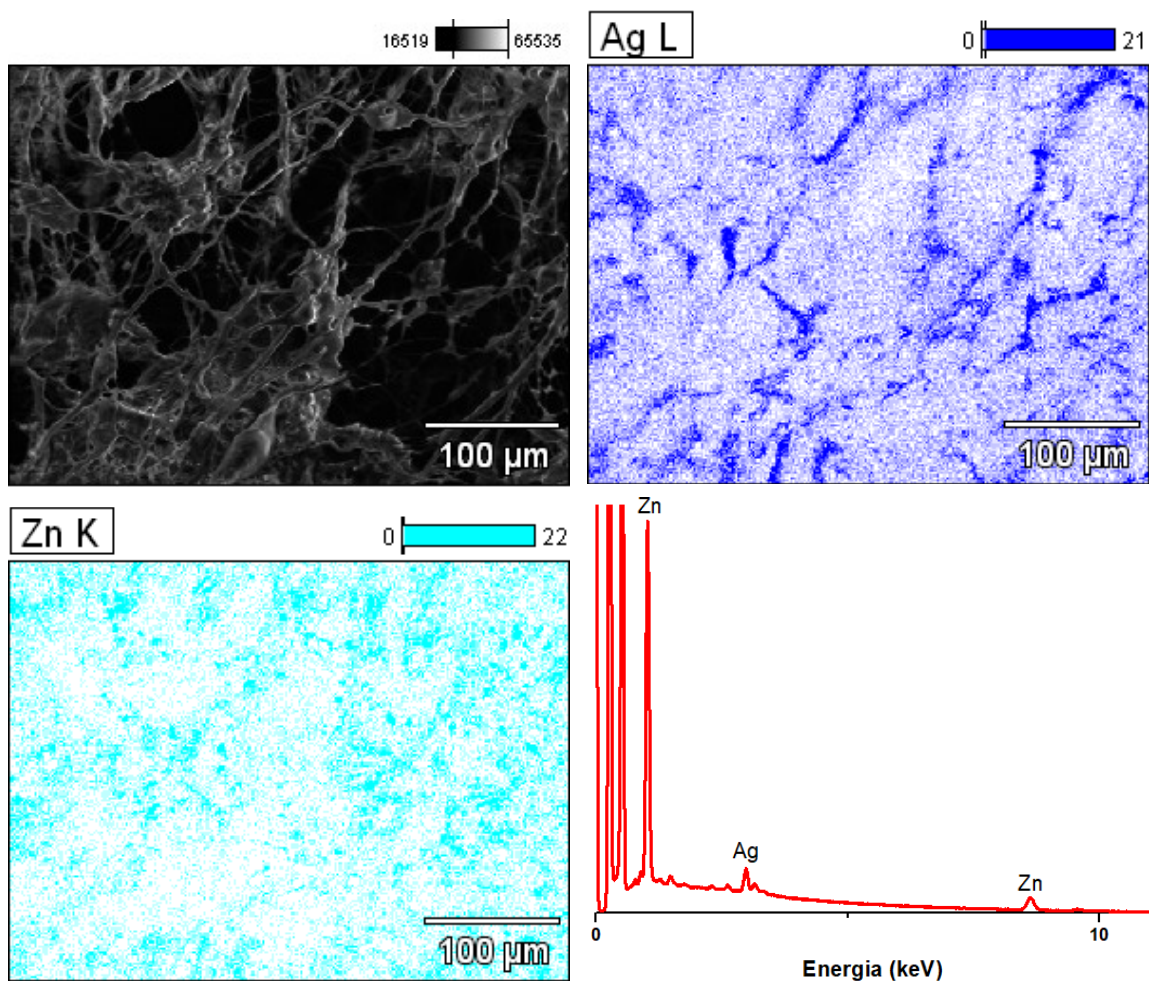


Figura 3.14 Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 5% e Ag. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

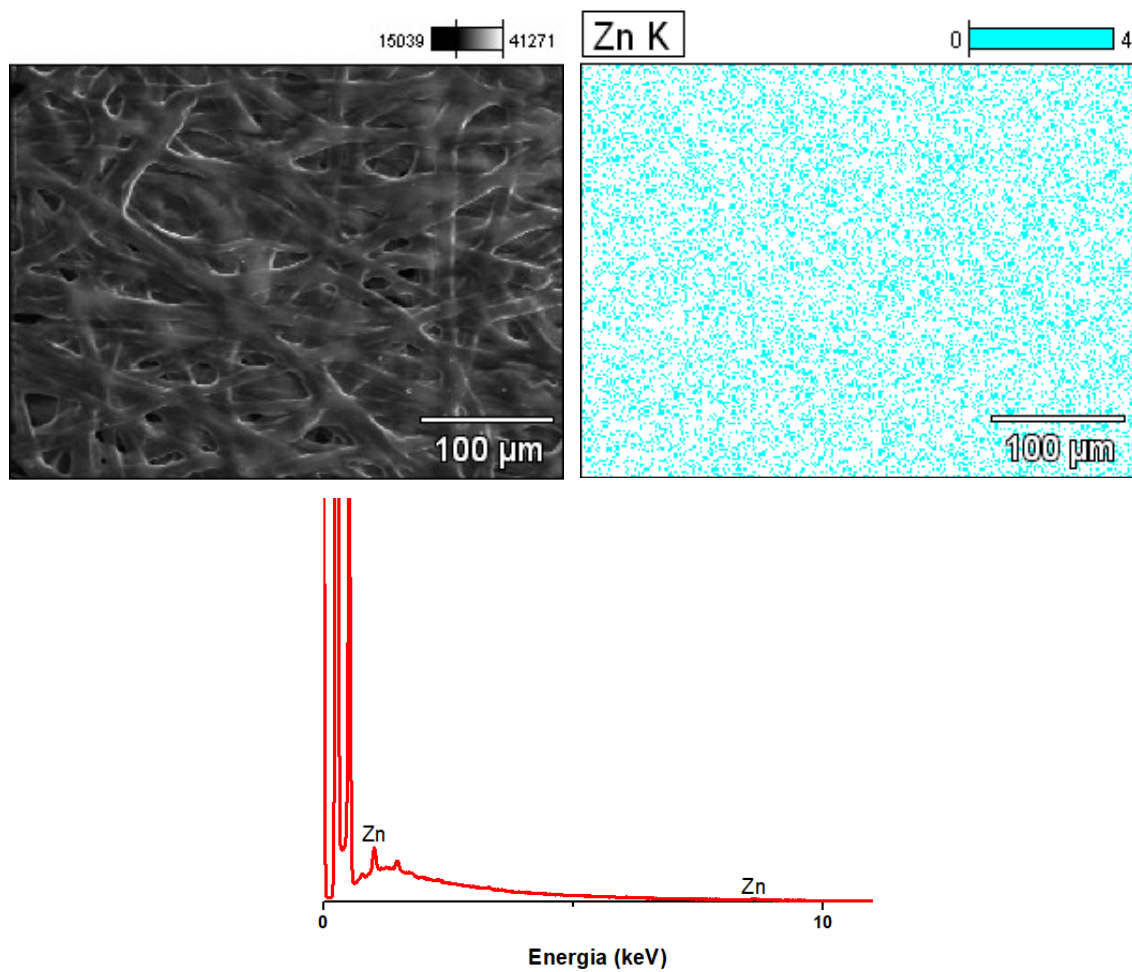


Figura 3.15 Distribuição das nanopartículas na face inferior da manta contendo ZnO a 5% e Ag.

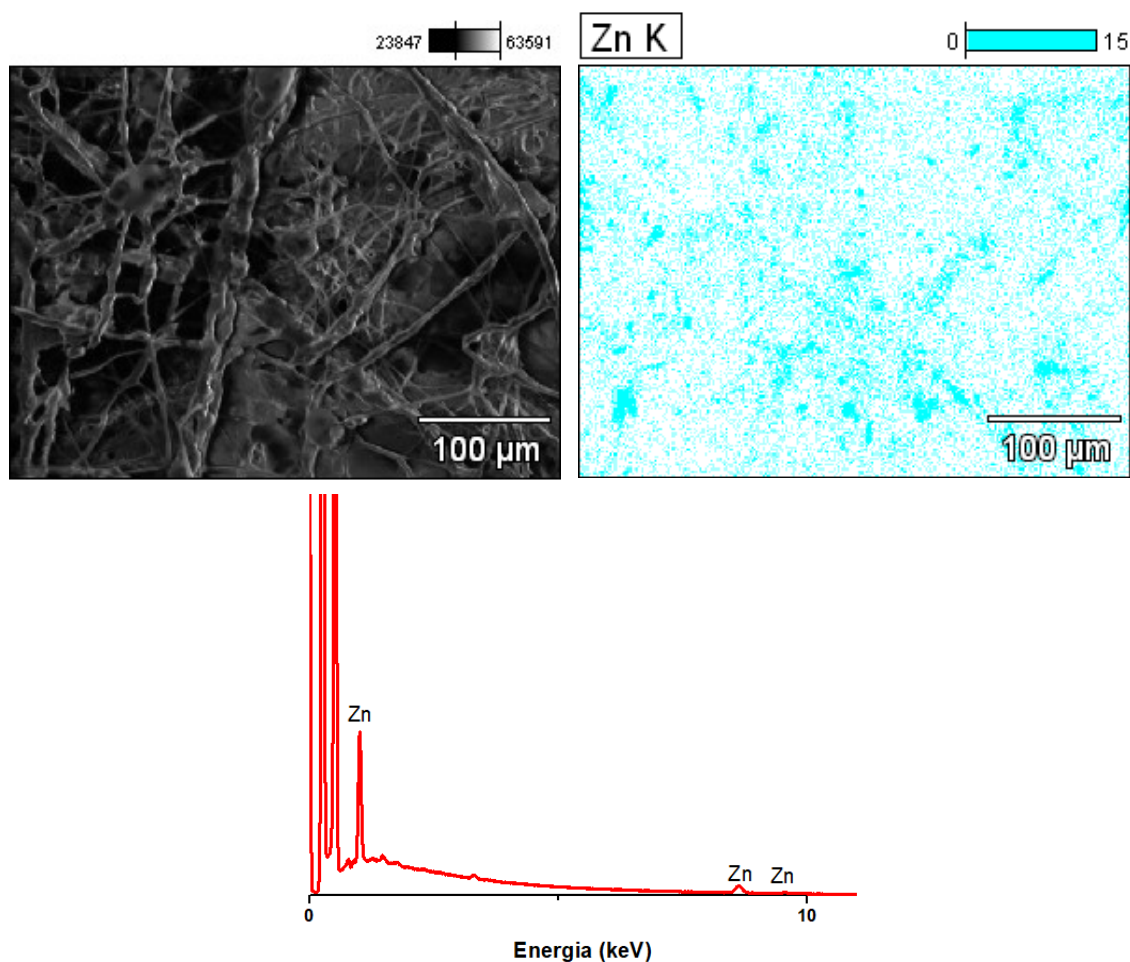


Figura 3.16 Distribuição das nanopartículas na face superior da manta contendo ZnO a 5%. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Não foi possível identificar Ag na face inferior da manta e, como esperado, a amostra sem Ag também esteve isenta de sinais de Ag. É possível observar que o primeiro pico de ZnO é bastante intenso nas amostras contendo Ag, o que representaria uma sobreposição dos sinais. No entanto, os sinais de Zn mais próximos a 10 keV confirmam que o elemento de fato está presente.

3.6 Ensaio mecânico de tração

Apenas os não-tecidos bicamada completos foram testados, pois as mantas de BN pura e de BN-P apresentaram difícil manuseio e não foi possível testá-las individualmente. Enquanto a adição de NPs de ZnO é atribuída a um aumento na rigidez do PLA (MARRA et

al., 2016; MURARIU et al., 2011; TAJARI; SADMIA; HOSSEINI, 2022), o PEG é considerado um plasticizante, tornando o material mais maleável (CHIENG et al., 2013; TAJARI; SADMIA; HOSSEINI, 2022). É possível observar que um teor crescente de ZnO aumenta o Módulo de Young (Tabela 3.5). No entanto, o uso de ZnO reduziu a tensão de ruptura e a alongação máxima (diferença entre comprimentos final e inicial) (respectivamente, em 56,70% e 93,67%), retornando a valores mais próximos aos originais à medida que o teor de ZnO aumentou (Tabela 3.4).

Tabela 3.5 Ensaio mecânico das mantas produzidas.

	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Alongação (%)
Sem NPs	4,11 ± 0,30 ^{ac*}	0,97 ± 0,07 ^a	323,39 ± 22,12 ^a
ZnO 1%	4,72 ± 0,66 ^{ab}	0,42 ± 0,02 ^b	20,47 ± 4,17 ^b
ZnO 2,5%	5,32 ± 0,80 ^{ab}	0,64 ± 0,10 ^c	196,28 ± 33,64 ^c
ZnO 5%	5,78 ± 0,65 ^b	0,82 ± 0,04 ^d	244,88 ± 20,76 ^d
ZnO 1% + Ag	3,25 ± 0,43 ^c	0,51 ± 0,02 ^e	28,56 ± 7,06 ^b
ZnO 2,5% + Ag	2,89 ± 0,48 ^c	0,79 ± 0,03 ^d	216,45 ± 19,27 ^{cd}
ZnO 5% + Ag	9,12 ± 1,51 ^d	1,01 ± 0,08 ^a	328,17 ± 22,02 ^a

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$).

Como as NPs de ZnO se mostraram importantes estruturalmente para o material, e também possuem apelo terapêutico (KAUSHIK et al., 2019; LANSDOWN et al., 2007), seu uso foi mantido em testes seguintes, avaliando-se outros possíveis efeitos decorrentes da variação de sua concentração. Uma vez que não-tecidos apresentam pouca uniformidade, mesmo entre amostras de um mesmo material, as diferenças de valor entre amostras com e sem Ag podem ser devidas a essa variabilidade inerente ao material.

O processo de aspersão não ocasionou uma compactação significativa do material, que decorreria da submissão da MNTB ao jato de ar pressurizado durante o processo de aspersão, o que poderia ter influenciado nos cálculos. A exposição contínua a um jato de ar pressurizado durante a aspersão das NPs de Ag poderia ter força o suficiente para

comprimir as fibras do material, o que não foi observado ao se realizar as medidas de espessura dos corpos de prova a serem utilizados nos ensaios mecânicos. Uma vez que a seção transversal, resultante da espessura e da largura do corpo de prova, é utilizada para o cálculo de tensão exercida, o nível de compactação da amostra poderia influenciar nos dados obtidos.

Hasan et al. (2022) observaram que a presença de NPs de Ag em tecidos de algodão pré-tratados com quitosana poderia ocasionar um aumento drástico na tensão de ruptura, com pouco efeito na alongação, o que foi atribuído a possíveis ligações cruzadas mediadas pelas NPs, a um possível preenchimento da estrutura polimérica pela Ag, ou simplesmente pelas interações promovidas pela Ag diminuam o deslizamento das fibras durante o ensaio mecânico. No caso deste projeto, como já mencionado anteriormente, a aspersão de Ag parece contribuir para a difusão do PEG através do material, o que poderia explicar pelo menos em parte as variações observadas. O PEG, sendo capaz de atuar como um plasticizante, reduziria a resistência mecânica do material (em termos de tensão de ruptura e alongação) ao facilitar a separação das cadeias poliméricas que compõem as fibras. A presença de ZnO em pequenas quantidades poderia contribuir para a difusão do PEG pelas fibras de PLA, resultando na piora de parâmetros mecânicos. Enquanto o reforço mecânico providenciado pelas NPs de ZnO causaria um aumento na rigidez inicial, a presença de PEG entre as cadeias de PLA facilitaria o deslizamento e a separação destas, reduzindo a resistência do material e facilitando sua ruptura. O aumento do teor de ZnO compensaria a presença de PEG, revertendo o efeito plasticizante.

De acordo com uma revisão realizada por Joodaki e Panzer (2018), o comportamento mecânico da pele apresenta grandes variações, relacionadas à taxa de variação da tensão utilizada nos ensaios, ao local de origem da amostra de pele, e também da orientação utilizada. A tensão de ruptura pode variar de 1 a 32 MPa, enquanto a alongação varia de 17% a 207% (JOODAKI; PANZER, 2018). Embora os valores de tensão de ruptura do material sejam inferiores aos reportados, a alongação é correspondente ou, no caso das amostras com maior carga de ZnO, superior aos valores de referência.

Outros pesquisadores focam no módulo de Young, relatado como sendo, idealmente, entre 4,6 e 20 MPa (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019; MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Estes pesquisadores se basearam em dados obtidos de experimentos conduzidos *in vivo* (MANSCHOT; BRAKKEE, 1986), para os quais parâmetros envolvendo ruptura da pele representariam pontos extremos e indesejáveis em termos práticos para curativos. As amostras contendo NPs de ZnO sem adição de Ag, e as amostras contendo o maior teor de ZnO com adição de Ag apresentam módulos de Young compatíveis com essa faixa de valores apontada pela literatura.

Por outro lado, Daristotle et al. (2020) observaram que curativos com rigidez inferior ao tecido que o recebe apresentam melhor adesão e conformação à região lesionada, especialmente se o curativo for elástico o suficiente para sustentar a deformação. Esses diferentes fatores indicam que diversos fatores influenciam na tomada de decisão quanto a qual comportamento mecânico é desejável para um curativo e, portanto, uma análise mais cuidadosa da aplicação *in vivo* se faria necessária. Estudos mais detalhados poderiam melhor determinar os locais de aplicação mais apropriados para a MNTB desenvolvida.

3.7 Análises biológicas

A suspensão de NPs de Ag teve sua concentração de Ag total estimada em 104,73 µg/mL, de acordo com o método de preparo. Devido ao protocolo do ensaio CIM, o primeiro poço do teste contém metade da concentração original, 52,36 µg/mL. A Figura 3.17 mostra os resultados de CIM e CBM para as bactérias testadas. As bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* apresentaram CIM de, respectivamente, 0,82 µg/mL, 1,64 µg/mL e 6,54 µg/mL. Os valores de CBM encontrados corresponderam aos da CIM, indicando efeito de fato bactericida, em vez de somente bacteriostático, para a CIM encontrada.

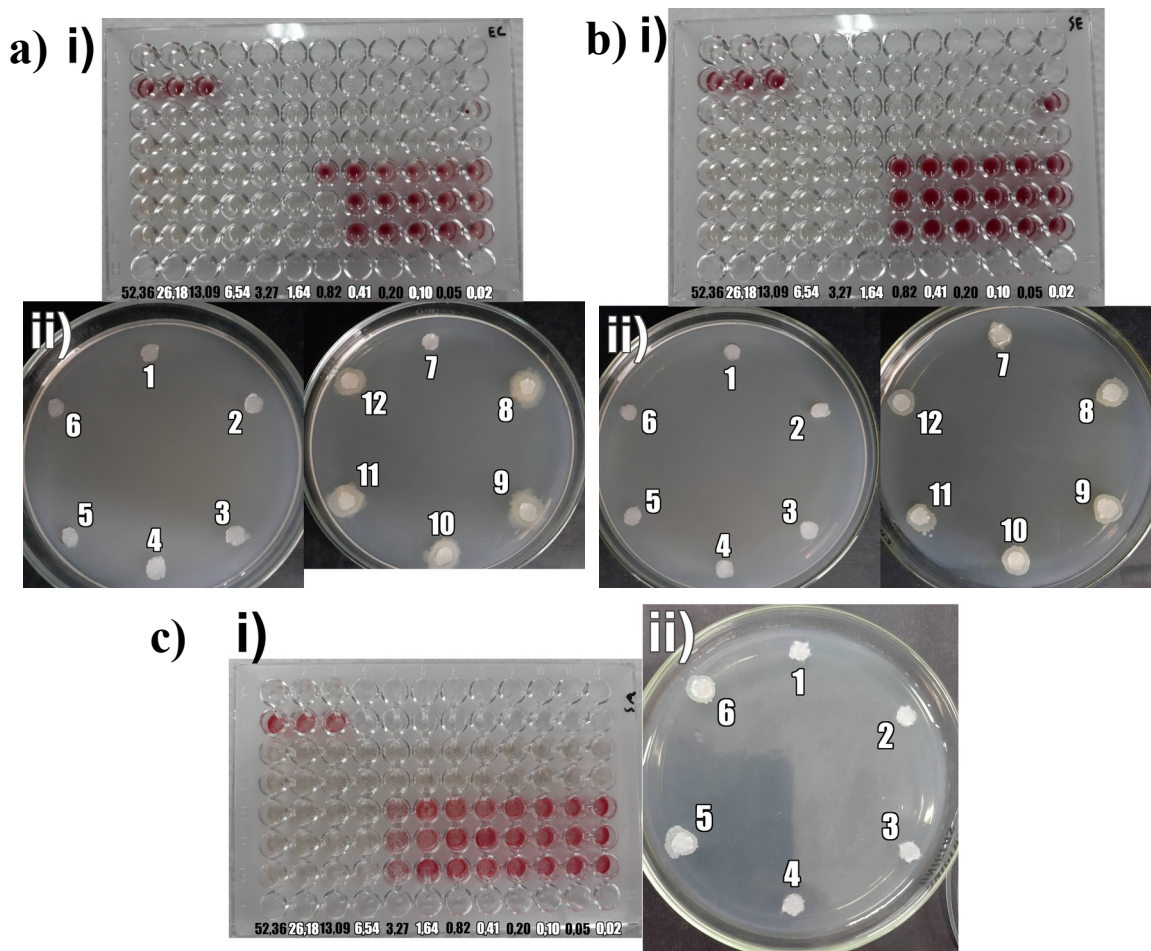


Figura 3.17 Ensaio i) CIM e ii) CBM para as bactérias: a) *Escherichia coli*, b) *Salmonella enterica* e c) *Staphylococcus aureus*. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Foi possível observar uma diferença considerável na eficácia antibacteriana das NPs de Ag quanto ao tipo de bactéria. As NPs se mostraram mais efetivas contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*) do que contra Gram-positivas (*S. aureus*). Abbaszadegan et al. (2015) observaram que a carga superficial de NPs de Ag afeta o seu desempenho antimicrobiano, sendo que NPs com superfície positivamente carregada apresentam maior atividade antimicrobiana, seguidas por NPs neutras, e por fim as NPs com carga negativa, que apresentaram o pior desempenho. Para este mesmo estudo, curiosamente, *S. aureus* foi o único microrganismo testado para o qual foi possível determinar uma CIM, sugerindo uma maior suscetibilidade às NPs de Ag de carga superficial negativa. Uma vez que Abbaszadegan et al. (2015) reforçam que o método de

síntese também pode influenciar no efeito antimicrobiano, é possível que o revestimento por grupos citrato tenha influenciado na performance. A menor eficácia de NPs com carga negativa, de uma forma geral, poderia ser explicada pela estrutura da parede celular das bactérias, ilustrada na Figura 3.18.

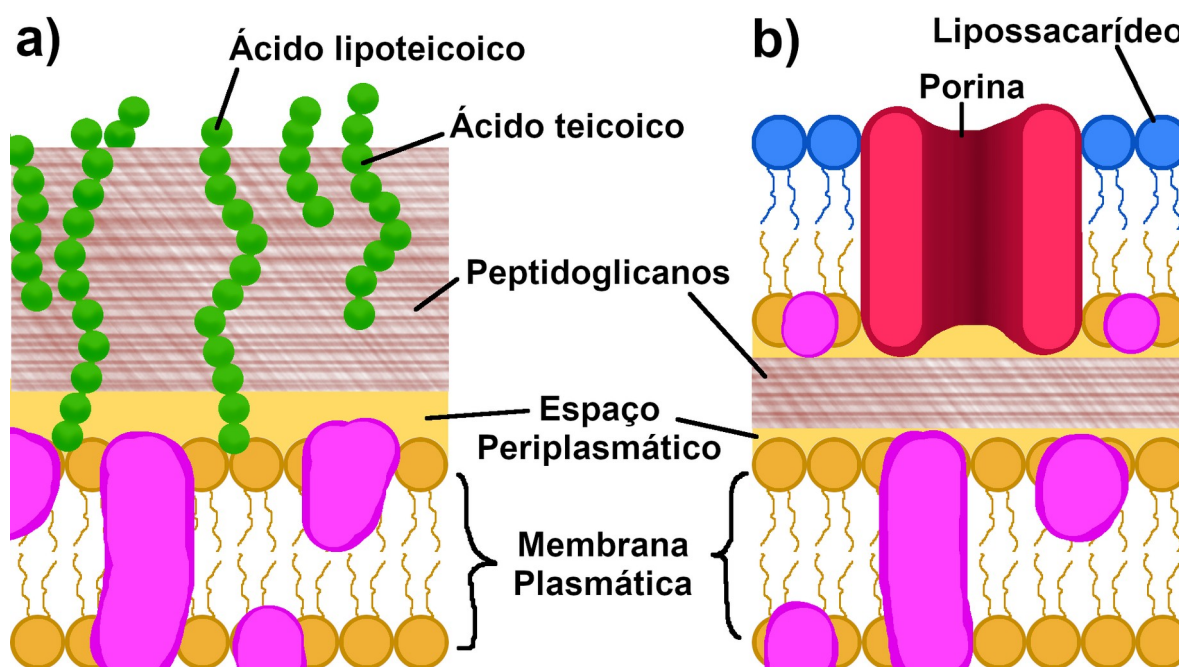


Figura 3.18 Representação da parede celular de bactérias a) Gram-positivas e b) Gram-negativas.

Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular é formada por uma espessa camada de peptidoglicanos que envolve a membrana celular, e nas bactérias Gram-negativas, os peptidoglicanos formam uma fina camada que é envolvida por uma segunda membrana lipídica, a qual apresenta lipossacarídeos na sua face externa. Os peptidoglicanos formam uma densa estrutura reticulada, com caráter eletronegativo (Schumann, 2011). O fato de *S. aureus* ter apresentado maior resistência às NPs de Ag utilizadas sugeriria que esta camada de peptidoglicanos seria responsável por este efeito. O revestimento das NPs de Ag, de caráter eletronegativo, dificultaria a difusão destas através da camada de peptidoglicanos, requerendo concentrações mais elevadas para atingir níveis intracelulares efetivamente tóxicos à bactéria. Diversos fatores podem interferir na eficiência da atividade antimicrobiana das NPs de Ag, da carga superficial à morfologia e

síntese utilizada (ABBASZADEGAN et al., 2015), e as concentrações com atividade inibitória apresentadas pela literatura variam consideravelmente (ABBASZADEGAN et al., 2015; AMEEN et al., 2021; KONG; JANG, 2008; SOUZA NETO, 2016), refletindo a influência multifatorial.

As amostras de não-tecido sem adição de Ag não apresentaram atividade antibacteriana para o ensaio de difusão em ágar, pois não foi observado halo de inibição, e foi detectado crescimento de bactérias mesmo na região em contato direto com a amostra. Dessa forma, foi necessário adicionar Ag ao material para conferir atividade antibacteriana. Para todas as bactérias testadas, independentemente de qual camada do material ficou em contato direto com o ágar e da quantidade de ZnO presente, todas as amostras contendo Ag apresentaram inibição por contato direto, conforme Figuras 3.19 a 3.21. A inibição por contato propiciada mesmo pela camada que não recebeu adição direta de Ag sugere que um ganho de umidade do material, proveniente do ágar, seria capaz de promover a difusão das NPs de Ag. As NPs de Ag, no entanto, não estariam sendo liberadas de maneira rápida ou intensa, uma vez que não foi detectado nenhum halo de inibição significativo ou reprodutível, o que seria um interessante indício de segurança de uso do material, uma vez que grandes concentrações de NPs não apenas são antimicrobianas, como também podem ser citotóxicas a depender da dose liberada (AMEEN et al., 2021; BECARO et al., 2021; BURDUŞEL et al., 2018; DARISTOTLE et al., 2020; HASAN et al., 2022).

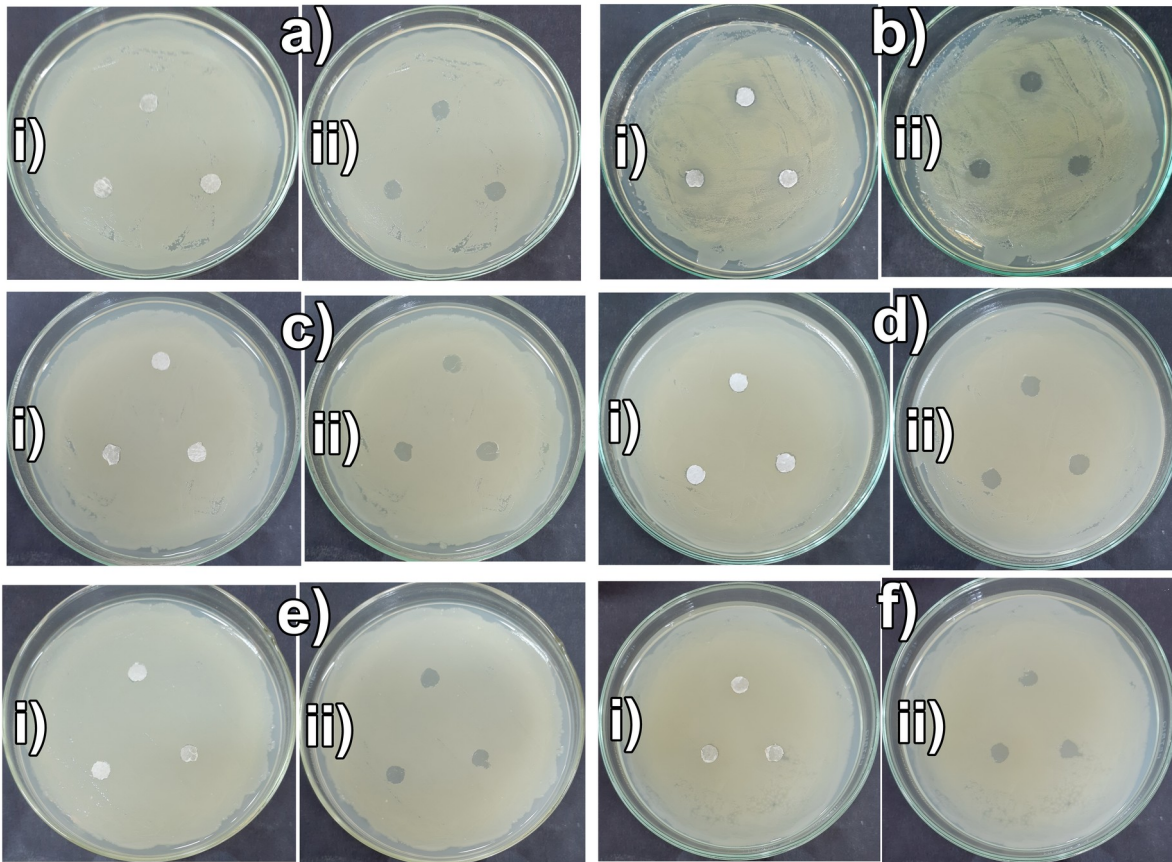


Figura 3.19 Ensaio de difusão em ágar para *E. coli*, testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

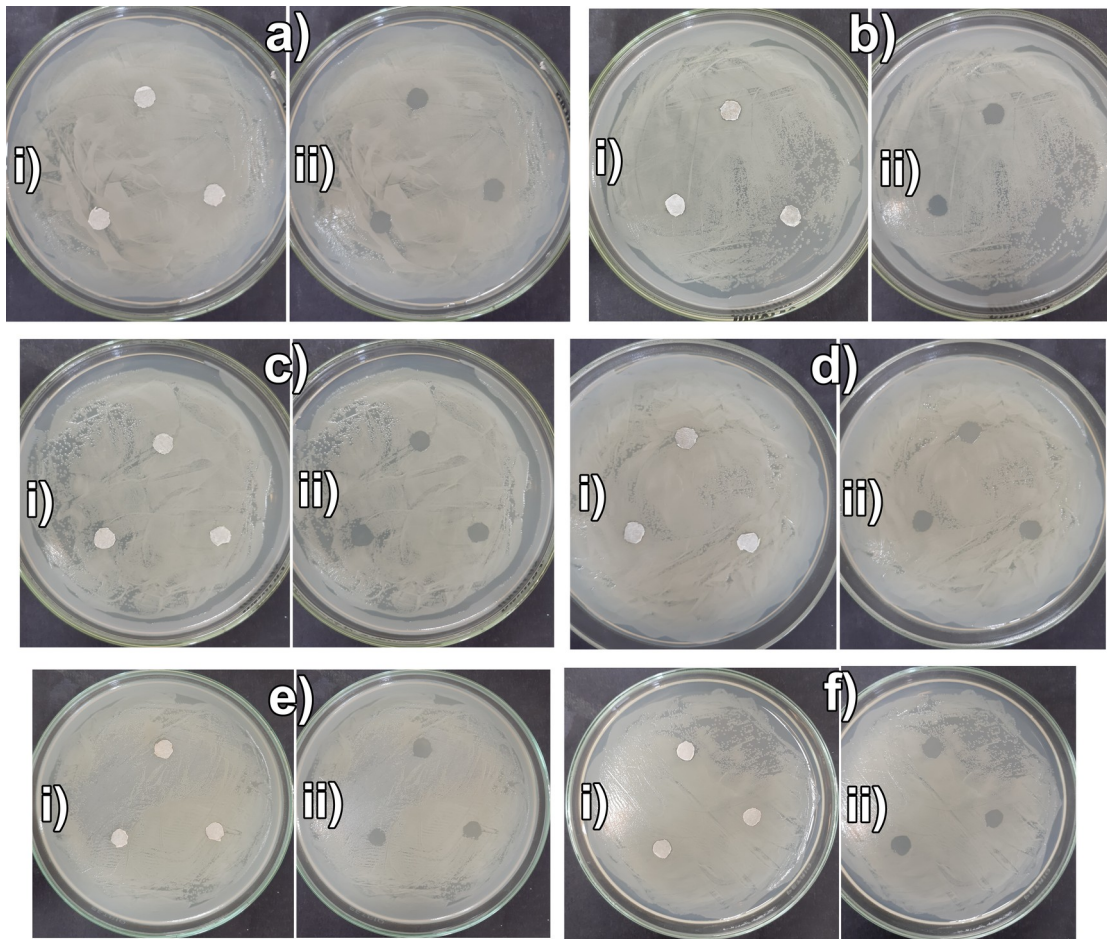


Figura 3.20 Ensaio de difusão em ágar para *S. enterica*, testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

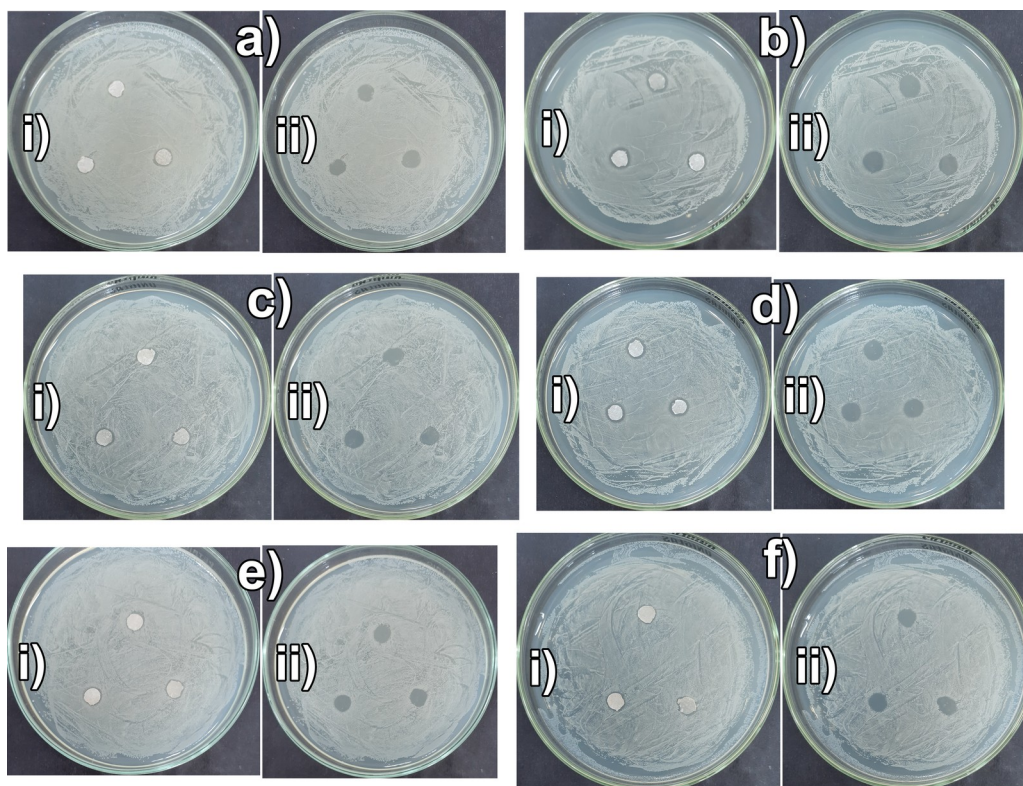


Figura 3.21 Ensaio de difusão em ágar para *S. aureus*, testando-se respectivamente a face inferior e a superior para as amostras contendo Ag e: 1% ZnO (a, b); 2,5% ZnO (c, d); e 5% ZnO (e, f). As imagens i) representam as placas contendo os discos das amostras, enquanto as imagens ii) correspondem à mesma placa após a remoção das amostras, para conferência da inibição por contato. Usado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Todas as amostras de não-tecido, contendo ou não Ag, foram capazes de atuar como barreira à passagem de microrganismos, conforme ilustrado na Figura 3.22, fisicamente impedindo a passagem de microrganismos do ambiente mesmo sem apresentar atividade antimicrobiana. Considerando-se o processo de adição de Ag, seria possível ajustar a concentração presente no material para um ganho de atividade antimicrobiana no tratamento de feridas infeccionadas sem comprometimento do processo de cicatrização, ou usar o material apenas como barreira mecânica caso a presença de Ag seja por algum motivo indesejável.

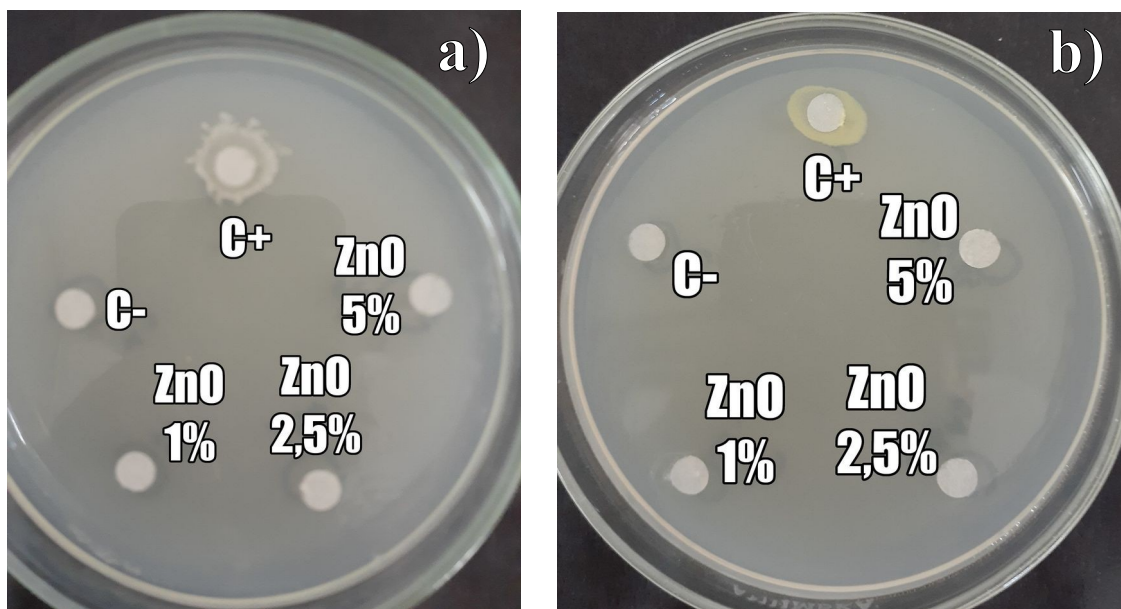


Figura 3.22 Ensaio de penetração microbiana para as amostras a) sem adição de Ag e b) com adição de Ag, para as diferentes concentrações de ZnO testadas. Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Uma vez que o material atua como barreira mecânica à passagem de microrganismos e pode facilmente receber aditivos bactericidas, a camada superior apresentar condições que poderiam ser propícias à adesão de microrganismos do ambiente não representaria um problema ao controle de infecção de lesões recobertas com este material. Desta forma, o AC observado para a camada superior não necessariamente compromete a eficácia do material como curativo. A capacidade de inibir crescimento bacteriano por contato direto, mesmo para a camada inferior, poderia representar um auxílio no combate a infecções já instaladas. Como a adição de NPs de Ag se dá por aspersão, uma mudança tempo de deposição, ou mesmo a substituição por outro agente antimicrobiano poderiam ser facilmente implementados, de forma a se tentar obter um curativo antimicrobiano que não comprometa o processo de cicatrização.

Os ensaios de citotoxicidade realizados (Figura 3.23) revelaram que a manta bicamada, com ou sem adição de ZnO, não apresentou citotoxicidade para fibroblastos HDFn (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009), indicando o potencial do material desenvolvido como curativo de pele. No entanto, a presença de Ag ocasiona um efeito citotóxico significativo no material. Enquanto o material contendo

somente Ag, ou Ag e a menor quantidade de ZnO, apresenta desvio padrão considerável e próximo a 70% de viabilidade, mas ainda considerado seguro, o maior teor de ZnO potencializa o efeito citotóxico da Ag.

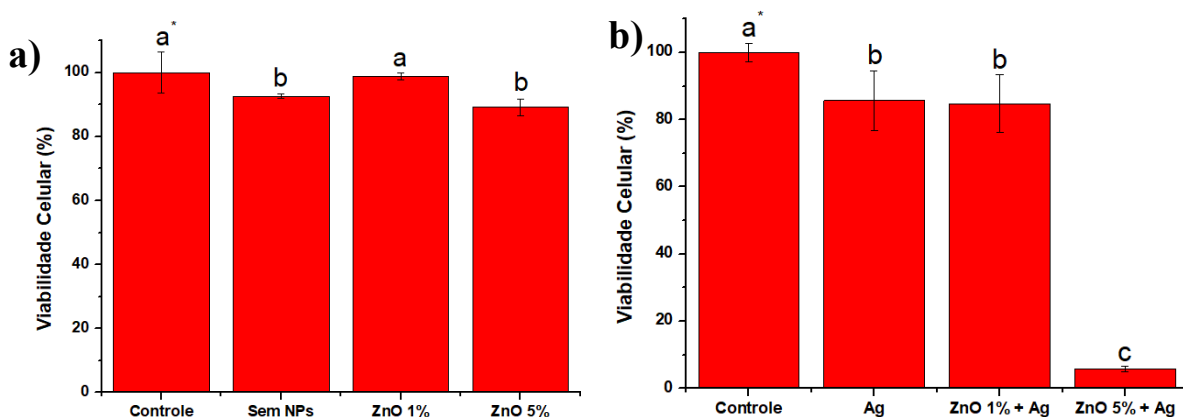


Figura 3.23 Ensaio de citotoxicidade para amostras: a) sem NPs ou contendo somente ZnO, nas concentrações mínima e máxima testadas, e b) contendo somente Ag ou Ag e ZnO para as concentrações mínima e máxima de ZnO testadas. *Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$). Adaptado com permissão de Costa et al. (2023). Direitos autorais pertencentes à Elsevier, 2023.

Estes resultados sugerem que o efeito citotóxico é dependente da quantidade de NPs presentes no material. O tamanho reduzido das NPs de Ag, embora interessante devido ao efeito bactericida, se mostra também potencialmente citotóxico. Para a aplicação como curativo, seria melhor utilizar a MNTB contendo ZnO a 1% e Ag, reduzir o tempo de aspersão da suspensão de Ag para fornecer menos NPs ao material, ou tentar combinar ou substituir as NPs de Ag por outro agente antimicrobiano. Como as NPs de Ag foram adicionadas por um simples processo de aspersão, a sua combinação ou substituição não seria dificultada pelo processo em si.

Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras

A borracha natural não pôde ser fiada isoladamente por apresentar elevada coesão, o que fez as fibras produzidas coalescerem e dificultou a recuperação do material gerado. Para se resolver este problema, utilizou-se uma blenda de borracha e PLA, fiada sobre uma camada de fibras de PLA. A camada superior, representada pelas fibras de PLA, recebeu adição de ZnO em diferentes concentrações devido ao apelo terapêutico, e recebeu aspersão de nanopartículas de Ag para conferir atividade antimicrobiana. A blenda de borracha e PLA pôde receber adição de PEG para correção da hidrofobicidade. Os ensaios realizados mostraram que adicionar ZnO simultaneamente com PEG ao material inicialmente ocasiona perda de resistência mecânica, mas o uso de ZnO em concentrações crescentes reforça estruturalmente o material, revertendo o efeito plasticizante do PEG. A manta bicamada por si só atua como barreira mecânica à passagem de microrganismos, e com a adição de Ag torna-se capaz de inibir a atividade celular bacteriana por contato direto. Os componentes do material não parecem reagir entre si. As nanopartículas de ZnO presentes se mostraram também seguras para uso, pois não foi observado efeito citotóxico na linhagem celular testada. As nanopartículas de Ag, no entanto, apresentaram algum potencial citotóxico, portanto utilizar uma menor quantidade de nanopartículas, ou combiná-las ou ainda substituí-las por outro agente antimicrobiano, poderia ser uma estratégia interessante.

Com base nestes resultados, o não-tecido bicamada desenvolvido se mostra um promissor candidato para ser aplicado em curativo para lesões cutâneas, e o processo de produção do material, composto por etapas simples e relativamente baratas, que sequer envolvem modificações químicas dos polímeros utilizados para se tornarem compatíveis, devem facilitar não somente a modificação de seus aditivos para melhor ajuste das propriedades observadas, como também tornar a produção em escala industrial atrativa e economicamente viável. Dessa forma, este projeto mostrou a possibilidade de se produzir não-tecido bicamada contendo borracha natural, sem modificações químicas, de fácil modificação e com grande potencial econômico e de uso médico. Futuramente, deseja-se que este material seja testado *in vivo*, definitivamente comprovando sua eficácia como

curativo, e possivelmente que outros aditivos de interesse possam ser testados para atender diferentes demandas trazidas por diferentes tipos de lesões, ou mesmo outras finalidades terapêuticas.

Referências

- ABBASZADEGAN, A.; GHAHRAMANI, Y.; GHOLAMI, A.; HEMMATEENEJAD, B.; DOROSTKAR, S.; NABAVIZADEH, M.; SHARGHI, H. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**, v. 16, n. 1, p. 53-53, 2015.
- ALVARENGA, A. D.; CORREA, D. S. Composite nanofibers membranes produced by solution blow spinning modified with CO₂-activated sugarcane bagasse fly ash for efficient removal of water pollutants. **Journal of Cleaner Production**, v. 285, p. 125376, 2021.
- AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAN, B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. **European Polymer Journal**, v. 117, n. May, p. 304–336, 2019.
- AMEEN, F.; ALSAMHARY, K.; ALABDULLATIF, J. A.; ALNADHARI, S. A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, n. 112027, 2021.
- ANDRE, R. S. PAVINATTO, A.; MERCANTE, L. A.; PARIS, E. C.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Improving the electrochemical properties of polyamide 6/polyaniline electrospun nanofibers by surface modification with ZnO nanoparticles. **RSC Advances**, v. 5, n. 90, p. 73875–73881, 2015.
- ANDRE, R. S.; MERCANTE, L. A.; FACURE, M. H. M.; PAVINATTO, A.; CORREA, D. S. Electrospun composite nanofibers as sensors for food analysis. In: DONG, Y.; BAJI, A.; RAMAKRISHNA, S. B. T.-E. P. AND C. (Eds.). **Electrospun Polymers and Composites**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 261–286.
- ARAGÓN, J.; COSTA, C.; COELHO, I.; MENDOZA, G.; AGUIAR-RICARDO, A.; IRUSTA, S. ELECTROSPUN ASYMMETRIC MEMBRANES FOR WOUND DRESSING APPLICATIONS. **MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C**, V. 103, N. October 2018, p. 109822, 2019.
- ARCHER, B. B. L.; SEKHAR, B. C. The proteins of Hevea brasiliensis latex. 1. Protein constituents of fresh latex serum. **Biochemical Journal**, v. 61, n. 3, p. 503–508, 1955.
- ARIMA, Y.; IWATA, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3074–3082, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE NÃO-TECIDOS E TECIDOS TÉCNICOS. **O Que São os Não-tecidos**. Disponível em: <[https://www.abint.org.br/naotecidos/o-que-sao#:~:text=O QUE SÃO OS NÃOTECIDOS,\(coesão\) e combinações destes](https://www.abint.org.br/naotecidos/o-que-sao#:~:text=O QUE SÃO OS NÃOTECIDOS,(coesão) e combinações destes)>. Acesso em: 17 jan. 2023.
- BALLESTEROS, C. A. S.; CORREA, D. S.; ZUCOLOTTI, V. Polycaprolactone nanofiber mats decorated with photoresponsive nanogels and silver nanoparticles: Slow release for antibacterial control. **Materials Science and Engineering C**, v. 107, p. 110334, 2020.
- BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; GEMEINDER, J. L. P.; MENDONÇA, R. J.; CILLI, E. M.; HERCULANO, R. D. NATURAL RUBBER LATEX: DEVELOPMENT AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF A FUTURE TRANSDERMAL PATCH FOR ENURESIS TREATMENT. **INTERNational Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 17, p. 871–876, 2017.

BECARO, A. A.; OLIVEIRA, L. P.; CASTRO, V. L. S.; SIQUEIRA, M. C.; BRANDÃO, H. M.; CORREA, D. S.; FERREIRA, M. D. Effects of silver nanoparticles prenatal exposure on rat offspring development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, n. November, 2021.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BORDA, L. J.; MACQUHAE, F. E.; KIRSNER, R. S. Wound Dressings: A Comprehensive Review. **Current Dermatology Reports**, v. 5, n. 4, p. 287–297, 2016.

BORGES, F. A.; ALMEIDA FILHO, E.; MIRANDA, M. C. R.; SANTOS, M. L.; HERCULANO, R. D.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 17, p. 1256–1268, 2015.

BURDUŞEL, A. C.; GHERASIM, O.; GRUMEZESCU, A. M.; MOGOANTĂ, L.; FICAI, A.; ANDRONESCU, E. Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 1–25, 2018.

CALLISTER JR, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 861 p.

CANEVAROLO JR, S, V. **Ciência dos Polímeros**. 2^a ed. São Paulo: Artliber, 2006. 282 p.

CANO-VICENT, A.; TUÑÓN-MOLINA, A.; MARTÍ, M.; MURAMOTO, Y.; NODA, T.; TAKAYAMA, K.; SERRANO-AROCA, A. Antiviral face mask functionalized with solidified hand soap: Low-cost infection prevention clothing against enveloped viruses such as SARS-CoV-2. **ACS omega**, v. 6, n. 36, p. 23495-23503, 2021.

CAO, G. **Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications**. 1^a ed. London: Imperial College Press, 2004. 448 p.

CHAGAS, P. A. M.; SCHNEIDER, R.; MARTINS, D.; OTUKA, A. J. G.; MENDONÇA, C. R.; CORRÊA, D. S. Bilayered electrospun membranes composed of poly(lactic-acid)/natural rubber: A strategy against curcumin photodegradation for wound dressing application. **Reactive and Functional Polymers**, v. 104889, 2021.

CHIENG, B. W.; IBRAHIM, N. A.; YUNUS, W. M. Z. W.; HUSSEIN, M. Z. Plasticized poly (lactic acid) with low molecular weight poly (ethylene glycol): Mechanical, thermal, and morphology properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 6, p. 4576-4580, 2013.

CORREA, D. S.; MERCANTE, L. A.; SCHNEIDER, R.; FACURE, M. H. M.; LOCILENTO, D. A. Composite nanofibers for removing water pollutants: Fabrication techniques. **Handbook of Ecomaterials**, v. 1, p. 441–468, 2019.

COSTA, V. P. V.; SANTOS, D. M.; ANDRE, R. S.; LOPES, R. G.; INADA, N. M.; CORREA, D. S. Bilayer nonwovens using natural rubber, poly (lactic acid) and bactericidal nanoparticles for wound dressings. **Materials Today Communications**, p. 107260, 2023.

DARISTOTLE, J. L.; BEHRENS, A. M.; SANDLER, A. D.; KOFINAS, P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 51, p. 34951–34963, 2016.

DARISTOTLE, J. L.; LAU, L. W.; ERDI, M.; HUNTER, J.; DJOUM, A.; SRINIVASAN, P.; WU, X.; BASU, M.; AYYUB, O. B.; SANDLER, A. D.; KOFINAS, P. Sprayable and biodegradable, intrinsically adhesive wound dressing with antimicrobial properties. **Bioengineering and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, 2020.

DINCER, C.; BRUCH, R.; COSTA-RAMA, E.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; MERKOÇI, A.; MANZ, A.; URBAN, G. A.; GÜDER, F. Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. **Advanced Materials**, v. 1806739, p. 28, 2019.

FALAH, S.; KENARKOOHI, A. Transmission routes for SARS-CoV-2 infection: review of evidence. **New Microbes and New Infections**, v. 38, p. 100778, 2020.

FERREIRA, M.; COUTINHO-NETTO, R. J. M. E J.; MULATO, M. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of Hevea brasiliensis. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564–569, 2009.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Biomaterials Market Size, Growth | Global Industry Analysis, 2027**. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/biomaterials-market-102770>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

GABRIEL, A. G. **Nãotecidos de poli (ácido láctico) modificados com whiskers de beta-quitina e nanopartículas de prata visando aplicações como curativos de pele: uma comparação entre os métodos de eletrofição e fição por sopro em solução**. 2021. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021. doi:10.11606/D.75.2021.tde-24012022-125656.

GMINSIGHTS. **Antimicrobial Textiles Market Size and Share | Statistics - 2027**. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/antimicrobial-textiles-market>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M.; KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77–92, 2016.

GRAÇA, M. F. P.; MELO-DIOGO, D.; CORREIA, I. J.; MOREIRA, A. F. Electrospun asymmetric membranes as promising wound dressings: A review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 183, p. 1–25, 2021.

GU, H.; WANG, C.; GONG, S.; MEI, Y.; LI, H.; MA, W. Investigation on contact angle measurement methods and wettability transition of porous surfaces. **Surface & Coatings Technology**, v. 292, p. 72-77, 2016.

GUERRA, N. B.; CASSEL, J. B.; MUNIZ, N. O.; HENCKES, N. A. C.; OLIVEIRA, F. S.; CIRNE-LIMA, E. O.; SANTOS, L. A. L. Dense and Fibrous Membranes of Poly(lactic-co-glycolic acid)/Epoxidized Poly(isoprene): Chemical and Biological Evaluation. **Fibers and Polymers**, v. 22, n. 8, p. 2079–2089, 2021.

HAACK, M. D. S. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 50 p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HANSEN, C. M. **Hansen Solubility Parameters: a User's Handbook**. 2. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2013. 546 p.

HARIFI, T.; MONTAZER, M. Application of nanotechnology in sports clothing and flooring for enhanced sport activities, performance, efficiency and comfort: a review. **Journal of Industrial Textiles**, v. 46, n. 5, p. 1147–1169, 2017.

HASAN, K. M. F.; WANG, H.; MAHMUD, S.; ISLAM, A.; HABIB, M. A.; GENYANG, C. Enhancing mechanical and antibacterial performances of organic cotton materials with greenly synthesized colored silver nanoparticles. **International Journal of Clothing Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 549–565, 2022.

HERAVI, M. E. M. Effects of Hydrodynamic Diameter of Nanoparticles on Antibacterial Activity and Durability of Ag-treated Cotton Fabrics. **Fibers and Polymers**, v. 21, n. 6, p. 1173-1179, 2020.

HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de Membranas de Látex Natural para Aplicações Médicas**. 151 p. Universidade de São Paulo, 2009.

HERCULANO, R. D.; GUIMARAES, S. A. C.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA, O. N.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. D. Metronidazole Release Using Natural Rubber Latex as Matrix. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 13, n. 1, p. 57–61, 2010.

HOMAEIGO HAR, S.; BOCCACCINI, A. R. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. **Acta Biomaterialia**, v. 107, n. 2020, p. 25–49, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity**. Suíça: International Organization for Standardization, 2009. 40 p.

JEM, K. J.; POL, J. F. VAN DER; VOS, S. DE. Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. In: Chen, G. Q. (ed.) **Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications**. Berlin: Springer Verlag, v. 14, p. 323–346, 2010.

JOODAKI, H.; PANZER, M. B. Skin mechanical properties and modeling: A review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 232, n. 4, p. 323-343, 2018.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**. v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

JUNG, J. H.; REE, M.; KIM, H. Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters. **Catalysis Today**, v. 115, n. 1–4, p. 283–287, 2006.

KARAGOZ, S.; KIREMITLER, N. B.; SARP, G.; PEKDEMIR, S.; SALEM, S.; GOKSU, A. G.; ONSER, M. S.; SOZDUTMAZ, I.; SAHMETLIOGLU, E.; OZKARA, E. S.; CEYLAN, A.; YILMAZ, E. Antibacterial, antiviral, and self-cleaning mats with sensing capabilities based on electrospun nanofibers decorated with ZnO nanorods and Ag nanoparticles for protective clothing applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 4, p. 5678-5690, 2021

KARPPINEN, S. M.; HELJASVAARA, R.; GULLBERG, D.; TASANEN, K.; PIHLAJANIEMI, T. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. **F1000Research**, v. 8, p. 787, 2019.

KAUSHIK, M.; NIRANJAN, R.; THANGAM, R.; MADHAN, B.; PANDIYARASAN, V.; RAMACHANDRAN, C.; OH, D. H.; VENKATASUBBU, G. D. Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 479, n. February, p. 1169–1177, 2019.

KENRY; LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. **Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 1–17, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2017.

KHANG, G.; RHEE, J. M.; LEE, J. H.; LEE, I.; LEE, H. B. Interaction of Different Types of Cells on Poly(L-lactide-co-glycolide) Surface with Wettability Chemogradient. **Korea Polymer Journal**, v. 8, n. 6, p. 276–284, 2000.

KOLBASOV, A.; SINHA-RAY, S.; JOIJODE, A.; HASSAN, M. A.; BROWN, D.; MAZE, B.; POURDEYHIMI, B.; YARIN, A. L. Industrial-Scale Solution Blowing of Soy Protein Nanofibers. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 1, p. 323–333, 2016.

KONG, H.; JANG, J.. Antibacterial properties of novel poly (methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, n. 5, p. 2051–2056, 2008.

KRÓL, A.; POMASTOWSKI, P.; RAFIŃSKA, K.; RAILEAN-PLUGARU, V.; BUSZEWSKI, B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 37–52, 2017.

LANSDOWN, A. B. G.; MIRASTSCHISKI, U.; STUBBS, N.; SCANLON, E.; ÅGREN, M. S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 1, p. 2–16, 2007.

LOCILENTO, D. A.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; LUNA, G. L. F.; BRASSOLATTI, P.; ANIBAL, F. F.; CORREA, D. S. Biocompatible and Biodegradable Electrospun Nanofibrous Membranes Loaded with Grape Seed Extract for Wound Dressing Application. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 1–11, 2019.

MANOHAR, N.; JAYARAMUDU, J.; SUCHISMITA, S.; RAJKUMAR, K.; BABULREDDY, A.; SADIKU, E. R.; PRITI, R.; MAURYA, D. J. A unique application of the second order derivative of FTIR–ATR spectra for compositional analyses of natural rubber and polychloroprene rubber and their blends. **Polymer Testing**, v. 62, p. 447–453, 2017.

MANSCHOT, J. F. M.; BRAKKEE, A. J. M. The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin in vivo—I. The measurement. **Journal of biomechanics**, v. 19, n. 7, p. 511–515, 1986.

MCFARLAND, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **Journal of the American Medical Association**, v. 49, n. 14, p. 1176–1178, 1907.

MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, n. 4, p. 2322–2330, 2009.

MENEZES, M. **Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>>. Acesso em: 2 abr. 2023.

MERCANTE, L. A.; FACURE, M. H. M.; LOCILENTO, D. A.; SANFELICE, R. C.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Solution blow spun PMMA nanofibers wrapped with reduced graphene oxide as an efficient dye adsorbent. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 17, p. 9087–9094, 2017a.

MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 2017b.

MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospun Ceramic Nanofibers and Hybrid-Nanofiber Composites for Gas Sensing. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 7, p. 4026–4042, 2019.

MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MACEDO, J. B.; PAVINATTO, A.; CORREA, D. S. Nanofibras Eletrofiadas e suas Aplicações: Avanços na Última Década. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.

MIGLIORINI, F. L.; TEODORO, K. B. R.; SANTOS, D. M.; FONSECA, F. J.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Electrospun nanofibers versus drop casting films for designing an electronic tongue: comparison of performance for monitoring geosmin and 2-methylisoborneol in water samples. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 9, p. 2075–2082, 2020.

MIGUEL, S. P.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 460–475, 2019.

MISHRA, R. K.; HA, S. K.; VERMA, K.; TIWARI, S. K. Recent progress in selected bio-nanomaterials and their engineering applications: An overview. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, n. 3, p. 263–288, 2018.

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.

MURARIU, M.; DOUMBIA, A.; BONNAUD, L.; DECHIEF, A. L.; PAINT, Y.; FERREIRA, M.; CAMPAGNE, C.; DEVAUX, E.; DUBOIS, P. High-performance polylactide/ZnO nanocomposites designed for films and fibers with special end-use properties. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1762–1771, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING AND BIOENGINEERING. **Biomaterials**. Disponível em: <<https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

NEPOMUCENO, N. C.; BARBOSA, M. A.; BONAN, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; SAMPAIO, F. C.; MEDEIROS, E. S. Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 6, 9 p., 2018.

NUN-ANAN, P.; WISUNTHORN, S.; PICHAIYUT, S.; NATHAWORN, C. D.; NAKASON, C. Influence of nonrubber components on properties of unvulcanized natural rubber. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 1, p. 44–59, 2020.

OLIVEIRA, M.; SANTOS, E.; ARAÚJO, A.; FECHINE, G. J. M.; MACHADO, A. V.; BOTELHO, G. The role of shear and stabilizer on PLA degradation. **Polymer Testing**, v. 51, p. 109–116, 2016.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. Espectroscopia no Infravermelho. In: **Introdução à Espectroscopia**. 2a. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. p. 15–59.

PANG, X.; ZHUANG, X.; TANG, Z.; CHEN, X. Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 11, p. 1125–1136, 2010.

PASCHOALIN, R. T.; TRALDI, B.; AYDIN, G.; OLIVEIRA, J. E.; RÜTTEN, S.; MATTOSO, L. H. C.; ZENKE, M.; SECHI, A. Solution blow spinning fibres: New immunologically inert substrates for the analysis of cell adhesion and motility. **Acta Biomaterialia**, v. 51, p. 161–174, 2017.

PAUL, D. R.; BARLOW, J. W. Polymer Blends (or Alloys). **Journal of Macromolecular Science, Part C**, v. 18, n. 1, p. 109–168, 1980.

- PRECEDENCE RESEARCH. **Biomaterials Market Size to Hit US\$ 390.92 Billion by 2027**. Disponível em: <<https://www.precedenceresearch.com/biomaterials-market>>. Acesso em: 28 nov. 2022.
- REDDY, K. M.; FERIS, K.; BELL, J.; WINGETT, D. G.; HANLEY, C.; PUNNOOSE, A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 21, p. 10–13, 2007.
- RODRÍGUEZ-TOBÍAS, H.; MORALES, G.; LEDEZMA, A.; ROMERO, J.; GRANDE, D. Novel antibacterial electrospun mats based on poly(D,L-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 24, p. 8373–8385, 2014.
- RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J. R.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; RAMÍREZ-WONG, B.; TORRES-CHAVEZ, P.; CORTEZ-ROCHA, M. O. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2127–2133, 2012.
- SAHOO, S.; MAITI, M.; GANGULY, A.; GEORGE, J. J.; BHOWMICK, A. K. Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 4, p. 2407–2415, 15 ago. 2007.
- SAHOO, S.; BHOWMICK, A. K. Influence of ZnO nanoparticles on the cure characteristics and mechanical properties of carboxylated nitrile rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 5, p. 3077–3083, 2007.
- SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Introdução à Nanotecnologia. In: **Nanotecnologia Aplicada a Polímeros**. São Paulo: Blucher, 2022. p. 27–48.
- SANTOS, D. M.; CORREA, D. S.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 41, p. 45673–45701, 2020.
- SANTOS, D. M.; LEITE, I. S.; BUKZEM, A. L.; SANTOS, R. P. O.; FROLLINI, E.; INADA, N. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, n. January, p. 110–121, 2018.
- SCHIFFMAN, J. D.; SCHAUER, C. L. A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. **Polymer Reviews**, v. 48, n. 2, p. 317–352, 2008.
- SCHNEIDER, R.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; BRANDÃO, H. M.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: Antibacterial activity and effect of pH on the release profile. **Reactive and Functional Polymers**, v. 132, n. August, p. 26–35, 2018.
- SCHUMANN, P. Peptidoglycan structure. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, 2011. p. 101–129.
- SEN, C. K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 39–48, 2019.
- SILVA, M. J. **Estudo da Influência da Composição Química nas Propriedades da Borracha Natural dos Novos Clones de Seringueira RRIM 711, RRIM 926 e RRIM 937**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017.
- SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 9, p. 1254–1276, 2011.

SOUSA, E. A.; SILVA, M. J.; SANCHES, A. O.; SOARES, V. O.; JOB, A. E.; MALMONGE, J. A. Mechanical, thermal, and morphological properties of natural rubber/45S5 Bioglass® fibrous mat with ribbon-like morphology produced by solution blow spinning. **European Polymer Journal**, v. 119, n. June, p. 1–7, 2019.

SOUZA NETO, F. N. **Efeito da inserção de nanopartículas sintéticas preparadas por rota coloidal em matriz acrílica comercial de uso odontológico**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2016.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159–167, 2018.

TAJARI, N.; SADRNI, H.; HOSSEINI, F. Effects of ZnO nanoparticles, plasticizer, and emulsifier on PLA films properties and mechanical aging stability. 2022.

TAMAI, Y.; ARATANI, K. Experimental Study of the Relation between Contact Angle and Surface Roughness. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 3267-3271, 1972.

TARACHIWIN, L.; SAKDAPIPANICH, J. T.; TANAKA, Y. Gel Formation in Natural Rubber Latex: 2. Effect of Magnesium Ion. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 76, n. 5, p. 1185-1193, 2003.

TEODORO, K. B. R.; SANTOS, D. M.; BALLESTEROS, C. A. S.; CHAGAS, P. A. M.; COSTA, V. P. V.; SCHNEIDER, R.; CORREA, D. S. Multifunctional Wound Dressings Based on Electrospun Nanofibers. In: VASEASHTA, A.; BÖLGEN, N. (Eds.). **Electrospun Nanofibers**. [s.l.] Springer Nature, 2022. p. 297–329.

TONCHEVA, A.; MINCHEVA, R.; KANCHEVA, M.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I.; DUBOIS, P.; MARKOVA, N. Antibacterial PLA/PEG electrospun fibers: Comparative study between grafting and blending PEG. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 223–233, 2016.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 9, p. 489–494, 2017.

WOJASIŃSKI, M.; PILAREK, M.; CIACH, T. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-Lactic Acid) materials for biomedical engineering. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 16, n. 2, p. 43–50, 2014.

ZAMEL, D.; KHAN, A. U. Bacterial immobilization on cellulose acetate based nanofibers for methylene blue removal from wastewater: Mini-review. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 131, n. May, p. 108766, 2021.

ZHANG, Y.; CHWEE, T. L.; RAMAKRISHNA, S.; HUANG, Z. M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 10, p. 933–946, 2005.

ZHOU, X.; ZHANG, D.; ZHU, Y.; SHEN, Y.; GUO, X.; DING, W.; CHEN, Y. Mechanistic investigations of PEG-directed assembly of one-dimensional ZnO nanostructures. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 51, p. 25734-25739, 2006.