

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)

CAMPUS SOROCABA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Gabriella Monteiro Alves

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM *SMART WOUND DRESSING*: MEMBRANA DE COLÁGENO COM PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E MONITORAMENTO BACTERIANO

SOROCABA

2025

UFSCar

CAMPUS SOROCABA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Gabriella Monteiro Alves

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM *SMART WOUND DRESSING*: MEMBRANA DE COLÁGENO COM PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E MONITORAMENTO BACTERIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Komatsu

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SOROCABA
2025

Alves, Gabriella Monteiro

Desenvolvimento e caracterização de um smart wound dressing: membrana de colágeno com propriedade antimicrobiana e monitoramento bacteriano / Gabriella Monteiro Alves -- 2025.
99f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca Examinadora: Marco Vinicius Chaud, Kelly

Roberta Francisco Muruci de Paula

Bibliografia

1. Colágeno. 2. Extrato de repolho roxo. 3. Indicador de pH. I. Alves, Gabriella Monteiro. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriella Monteiro Alves, realizada em 26/02/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek (PUC/SP)

Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud (UNISO)

Profa. Dra. Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus, que me concedeu a força, a saúde e a perseverança necessárias para seguir adiante. À minha família, expresso minha gratidão mais profunda pelo amor, apoio, compreensão e incentivo. Vocês sempre acreditaram em mim e foram a âncora em todos os momentos difíceis.

Minha eterna gratidão vai para minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Daniel Komatsu. Obrigada por toda a ajuda, confiança, paciência e pelos ensinamentos valiosos que levarei para a vida toda. Suas orientações foram fundamentais, proporcionando um grande crescimento.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomateriais (Labiomat), em especial a Ariana de Souza Moraes, pelo apoio, auxílio, compreensão, ensinamentos valiosos e amizade. Juliana Moraes, Jéssica Asami, Kaique Hergesel, Bruna Quevedo, Rodrigo Gomes, Bianca Sabino, Pamela Garcia, Cecília Torquetti e Professora Moema Hausen, agradeço imensamente pela amizade e apoio. Vocês tornam meus dias mais leves e cheios de alegria, criando um ambiente de trabalho acolhedor e estimulante.

Aos docentes da UFSCar, sou profundamente grata pelos ensinamentos adquiridos durante o mestrado. À PUC-SP, agradeço pelo suporte e desenvolvimento desta pesquisa. Ao Dr. André Rossi, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do Rio de Janeiro, pela concessão de uso do MEV JEOL no LABNANO, e à doutoranda Suzana Azevedo dos Anjos pela contribuição na metalização das amostras.

À empresa NovaProm pela doação de colágeno, que foi de suma importância para realização das membranas.

E, finalmente, minha gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Sem esse suporte, este trabalho não teria sido possível.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto. Muito obrigada!

“O importante é não parar de questionar;
a curiosidade tem sua própria razão de
existir”

(Albert Einstein)

RESUMO

As queimaduras são lesões complexas e graves que afetam a pele e, em casos severos, tecidos mais profundos, podendo levar a complicações como infecções e cicatrização prolongada. O tratamento de queimaduras com curativos convencionais pode causar lesões adicionais devido à sua aderência ao tecido. O colágeno (COL) é amplamente utilizado na área biomédica por suas propriedades regenerativas e pode auxiliar na cicatrização de queimaduras, no entanto, ele possui limitações como baixa resistência mecânica e rápida biodegradabilidade. Para superar essas limitações, o COL pode ser submetido a processos de reticulação para o qual a vanilina (VAN) foi utilizada neste trabalho, resultando em um material com melhores propriedades físicas. A fim de desenvolver uma membrana inteligente capaz de identificar mudanças de pH, o extrato de repolho roxo (ERR) foi utilizado na composição da membrana de COL reticulada com VAN. A metodologia para desenvolvimento e caracterização da membrana incluiu a extração e liofilização de antocianinas do repolho roxo, e a formação de membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). A análise de eletroforese por SDS-PAGE confirmou que o COL utilizado para o preparo das membranas corresponde ao colágeno do tipo I. Embora o *smart wound dressing* tenha apresentado propriedades mecânicas inferiores em comparação ao COL, as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (¹H RMN) demonstraram que o ERR e a concentração de 6% de VAN aumentaram a reticulação do COL, melhorando sua estabilidade e propriedades térmicas. As membranas com ERR mostraram menor intumescimento, indicando maior reticulação. Além disso, o ERR não sofreu interferência negativa do COL e da VAN em sua capacidade de indicador de pH. A VAN a 6% demonstrou efeito antimicrobiano e as membranas com ERR comprovaram sua eficácia em detectar a presença de bactérias. O estudo da influência da variação de ERR indicou que a VAN é essencial para a estabilidade estrutural e funcional das membranas, para promover a reticulação do COL. Dessa forma, a membrana COL/ERR/ 6% VAN possui potencial para ser utilizada como curativo para monitorar o estado de feridas como queimaduras, indica quando há infecção bacteriana presente na ferida, além de possuir baixo custo.

Palavras-chave: colágeno; extrato de repolho roxo; indicador de pH; reticulação; vanilina; queimaduras de segundo grau.

ABSTRACT

Burns are complex and severe injuries that affect the skin and, in severe cases, deeper tissues, potentially leading to complications such as infections and prolonged healing. The treatment of burns with conventional dressings can cause additional injuries due to their adherence to the tissue. Collagen (COL) is widely used in the biomedical field for its regenerative properties and can aid in burn healing. However, it has limitations such as low mechanical strength and rapid biodegradability. To overcome these limitations, COL can undergo crosslinking processes, for which vanillin (VAN) was used in this study, resulting in a material with improved physical properties. To develop an intelligent membrane capable of detecting pH changes, red cabbage extract (RCE) was incorporated into the COL membrane crosslinked with VAN. The methodology for the development and characterization of the membrane included the extraction and lyophilization of anthocyanins from red cabbage, as well as the formation of COL, COL/RCE, COL/VAN (0.5%, 1%, 3%, and 6% vanillin), and COL/RCE/VAN (0.5%, 1%, 3%, and 6% vanillin) membranes. SDS-PAGE electrophoresis analysis confirmed that the COL used in membrane preparation corresponds to type I collagen. Although the smart wound dressing exhibited lower mechanical properties compared to COL, techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H NMR) demonstrated that RCE and a 6% VAN concentration increased the crosslinking of COL, improving its stability and thermal properties. The membranes containing RCE exhibited lower swelling, indicating higher crosslinking. Furthermore, RCE was not negatively affected by COL and VAN in its pH indicator capability. VAN at 6% demonstrated an antimicrobial effect, and the membranes containing RCE proved effective in detecting the presence of bacteria. The influence study of RCE variation indicated that VAN is essential for the structural and functional stability of the membranes, as well as for promoting COL crosslinking. Thus, the COL/RCE/6% VAN membrane has the potential to be used as a wound dressing to monitor the condition of injuries such as burns, indicate the presence of bacterial infections in the wound, and offer a low-cost solution.

Keywords: collagen; red cabbage extract; pH indicator; crosslinking; vanillin; second-degree burns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme).	18
Figura 2- Demonstração das queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau	20
Figura 3- Demonstração das fases do processo cicatricial.	20
Figura 4- Estrutura do COL e partes do corpo onde está presente.	23
Figura 5- Diagrama de Venn das aplicações do COL na área médica.	24
Figura 6- Demonstração de reticulação do COL com a Vanilina.	25
Figura 7- Estrutura química da VAN e a orquídea <i>Vanilla planifolia</i> .	26
Figura 8- Cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo (um dos principais compostos antocianínicos encontrados no repolho roxo) e Repolho roxo (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>) do qual se obtém o extrato que pode ser utilizado como indicador de pH.	29
Figura 9- Formas moleculares e deslocalização eletrônica da cianidina em variados níveis de pH.	30
Figura 10- Fluxograma do processo de preparação da extração do repolho roxo e a liofilização do ERR.	33
Figura 11- Fluxograma do processo de preparação das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN.	35
Figura 12- Eletroforese em gel do padrão de massa molar. Bandas do (A) marcador-padrão, (B) COL (7 mg) e (C) COL (1 g).	41
Figura 13- Microscopia óptica das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (lente objetiva de 4x).	42
Figura 14- Indicação de pH pelo ERR. (A) ERR em tampões na faixa de pH de 4-10. (B) Espectros de UV-vis do ERR.	43
Figura 15- Resposta colorimétrica das membranas de COL/ERR/VAN em diferentes pHs (4 a 10).	44
Figura 16- Micrografias de MEV da superfície da fratura das membranas. (A) COL e (B) COL/ERR (Aumento: x1000, x3000 na área ampliada).	45
Figura 17- Micrografias de MEV da fratura das membranas. (A), (C), (E) e (G) COL/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente) e (B), (D), (F) e (H) COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente). (Aumento: x1000, x3000 na área ampliada).	46
Figura 18- Histogramas das membranas de COL/VAN e COL/ERR/VAN. (A), (C), (E) e (G) COL/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente) e (B), (D), (F) e (H)	

COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente).	48
Figura 19- Gráficos de ensaio mecânico de tração das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente) e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente). (A) Alongamento (%), (B) Módulo de Young (MPa) e (C) Tensão Má Máxima (MPa).	49
Figura 20- Dados de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) imersas em 5 mL de PBS.	52
Figura 21- Intumescimento com a média de exsudato (PBS) das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).	52
Figura 22- Estruturas moleculares e espectros de FTIR. (A) Estruturas moleculares do colágeno, vanilina, Cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo (repolho roxo) e maltodextrina. Espectros de FTIR de (B) COL, (C) ERR e (D) VAN (* e ** Ar-H de compostos aromáticos 1, 2, 4-trissubstituídos).	54
Figura 23- Espectros de FTIR das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).	57
Figura 24- Espectros de FTIR das membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).	59
Figura 25- Termogravimetria das amostras de COL, ERR, VAN e COL/ERR A) TG; B) DTG.	60
Figura 26- Termogravimetria das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). (A) TG e (B) DTG	62
Figura 27- Termogravimetria das membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). (A) TG e (B) DTG.	63
Figura 28- Termogramas de DSC das membranas. (A) COL, (B) ERR, (C) VAN e (D) COL/ERR.	65
Figura 29- Termogramas de DSC das membranas de COL/VAN. (A) 0,5%, (B) 1%, (C) 3% e (D) 6%.	66
Figura 30- Termogramas de DSC das membranas de COL/ERR/VAN. (A) 0,5%, (B) 1%, (C) 3% e (D) 6% de vanilina.	67
Figura 31- Espectro ¹ H RMN da membrana de COL.	68
Figura 32- Espectro ¹ H RMN da membrana de COL/ERR.	69
Figura 33- Espectro ¹ H RMN da membrana de COL/6% VAN.	70

- Figura 34-** Espectro 1H RMN da membrana de COL/ ERR/ 6% VAN. 72
- Figura 35-** Antibiograma das membranas. (A) 3h, (B) 7h e (C) 31h de exposição do disco de gentamicina (G), das membranas COL/ERR (1), COL/ERR/0,5% VAN (2), COL/ERR/1% VAN (3), COL/ERR/3% VAN (4), COL/ERR/6% VAN (5), COL (6), COL/0,5% VAN (7) e COL/6% VAN (8). 74
- Figura 36-** Gráficos do Módulo de Young (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%) por ensaio mecânico de tração das amostras de COL e COL/ERR (4g e 5g de ERR). (*) p<0,05. 76
- Figura 37-** Dados de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR 4g, COL/ERR 5g e COL/ERR 8g. 78
- Figura 38-** Espectros de FTIR das membranas de COL com diferentes concentrações de ERR (4g; 5g e 8g de ERR). 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Causas que influenciam na alteração do pH.	19
Tabela 2- Proporções utilizadas para obtenção das membranas de COL/ERR, COL/VAN (0,5%; 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%, 3% e 6% de vanilina).	34
Tabela 3- Valores médios e respectivos desvios padrão do alongamento (%), módulo de Young e tensão máxima das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).	50
Tabela 4- Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (Tonset), máxima (Tmax) e final (Tendset) de perda de massa dos materiais puros (COL; ERR; VAN e COL/ERR).	61
Tabela 5- Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (Tonset), máxima (Tmax) e final (Tendset) de perda de massa das membranas de COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).	62
Tabela 6- Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (Tonset), máxima (Tmax) e final (Tendset) de perda de massa das membranas de COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).	64
Tabela 7- Valores médios e respectivos desvios padrão do alongamento (%), módulo de Young e tensão máxima de ruptura das membranas de COL/ERR (4g, 5g e 8g de ERR).	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COL	Colágeno
ERR	Extrato de Repolho Roxo
VAN	Vanilina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
ppm	Parte por milhão
HMDS	Hexametildisilazano
PFA	Paraformaldeído
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
DSC	Calorimetria Exploratoria Diferencial
TGA	Termogravimetria
MO	Microscopia Óptica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
¹ H RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SDS-PAGE	
sódio (SDS)	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
GI	Grau de Intumescimento
pH	Potencial Hidrogeniônico
Tonset	Temperatura de início de perda de massa
Tendset	Temperatura final de perda de massa
Tmax	Temperatura de taxa de degradação máxima
Tg	Temperatura de Transição Vítreá
Tf	Temperatura de Ponto de Fusão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Pele	18
2.1.1 Queimaduras e processo de cicatrização	19
2.2 Colágeno	22
2.3 Reticulação do colágeno	24
2.3.1 Vanilina	26
2.4 Curativos para queimaduras e sua evolução	27
2.5 Justificativa	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Materiais	32
4.2 Métodos	33
4.2.1 Extração e liofilização do extrato de repolho roxo	33
4.2.2 Obtenção das membranas	34
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO	36
4.2.3.1. Eletroforese em gel SDS (SDS-PAGE)	36
4.2.3.2 Medição dos espectros no UV-vis do ERR	36
4.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
4.2.3.5 Ensaio Mecânico de Tração	38
4.2.3.6 Ensaio de Intumescimento	38
4.2.3.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	39
4.2.3.8 Termogravimetria (TG)	39
4.2.3.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	39
4.2.3.10 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹ H RMN)	39
4.2.3.11 Antibiograma	39
4.2.4 Estudo complementar da influência da variação de concentração de ERR	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Eletroforese por SDS-PAGE	40

5.2 APARÊNCIA MICROSCÓPICA DAS MEMBRANAS	41
5.3 ANÁLISE POR UV-VIS DO EXTRATO DE REPOLHO ROXO (ERR)	42
5.4 RESPOSTA COLORIMÉTRICA DO <i>SMART WOUND DRESSING</i>	44
5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	44
5.6 ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO	49
5.7 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO	51
5.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	53
5.9 TERMOGRAVIMETRIA (TG)	60
5.10 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	64
5.11 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (¹ H RMN)	68
5.12 ANTIBIOGRAMA	74
5.13 ESTUDO COMPLEMENTAR DA INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ERR	76
5.13.1 ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO	76
5.13.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO	78
5.13.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	79
6. RESUMO GRÁFICO	80
7. CONCLUSÃO	81
8. DESAFIOS TÉCNICOS ENFRENTADOS	82
8.1 PERSPECTIVA E SUGESTÃO DE CONTINUIDADE DESSE ESTUDO	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os biomateriais desempenham um papel fundamental no avanço das práticas médicas, oferecendo novas perspectivas para o tratamento e a recuperação de pacientes com lesões e condições complexas. Lesões como queimaduras representam desafios significativos para a saúde pública, bem como um impacto profundo na qualidade de vida dos pacientes. As queimaduras afetam principalmente, a pele, o maior e mais visível órgão do corpo humano, que é vital para a proteção contra agentes externos e infecciosos. As queimaduras de segundo grau causam dor intensa, cicatrizes permanentes e complicações por infecções, exigindo tratamentos prolongados e custosos. No Brasil, são registrados cerca de 1 milhão de casos de queimaduras por ano, resultando em 20 mil hospitalizações no SUS, conforme dados do Ministério da Saúde (Ministério da saúde, 2021). Essas lesões, especialmente as de segundo e terceiro graus, demandam cuidados intensivos, como internações em UTIs, cirurgias e reabilitação, o que gera custos significativos ao sistema público. Um estudo realizado em uma Unidade de Tratamento de Queimados no Centro-Oeste apontou que o reembolso médio do SUS por paciente é de R\$2.144,05, com 48,8% desse valor destinado a medicamentos (Saavedra, 2021). Além disso, a *Revista Brasileira de Queimaduras* estima que os custos diários por paciente em tratamento especializado podem ultrapassar R\$1.500,00 (França, Lize Zanchetin Hosoume *et al.*, 2023). Esses números evidenciam o impacto significativo das queimaduras no SUS, tanto em termos de custos quanto na sobrecarga dos serviços de saúde.

O tratamento dessas lesões frequentemente envolve o uso de curativos convencionais que visam proteger e promover a cicatrização. No entanto, a principal desvantagem do curativo convencional é a aderência entre a gaze e o tecido lesionado, podendo causar uma lesão secundária durante a troca do curativo, atrasando o processo de cicatrização da ferida. Uma alternativa de material de base para tais curativos pode ser o colágeno, um componente essencial na matriz extracelular, que fornece suporte estrutural e funcional para o tecido, facilitando a regeneração celular e formação de novos tecidos. Devido às suas propriedades biocompatíveis e bioativas, o colágeno tem sido amplamente utilizado em diversas aplicações biomédicas, incluindo curativos para feridas. No entanto, o colágeno possui algumas limitações como baixa resistência mecânica, rápida biodegradabilidade, alta solubilidade aquosa e limitada barreira ao vapor de água. Diante disso, há possibilidade de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno com processos de reticulação (Adamiak; Sionkowska, 2020). A reticulação promove a formação de uma rede tridimensional estável que resulta em um material com características físicas e propriedades superiores, ampliando suas potenciais aplicações. Comumente, agentes

reticulantes sintéticos, como glutaraldeído, carbodiimidas e epóxidos (por exemplo, diepóxido de polietilenoglicol - PEGDE), são amplamente utilizados. Por outro lado, reticulantes naturais, como genipina, taninos e vanilina, têm ganhado destaque devido às suas propriedades biocompatíveis e menor toxicidade. Ainda em estudo, um agente reticulante promissor para a melhorar as propriedades mecânicas do colágeno é a vanilina, que atua como agente reticulante natural, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo, portanto, um componente de grande interesse na área biomédica.

Os avanços na biotecnologia têm levado ao desenvolvimento de curativos avançados, conhecido no inglês como *Smart Wound Dressing*, que são projetados para monitorar as alterações no ambiente da queimadura, proporcionando um monitoramento eficaz, promovendo a cicatrização sem prejudicar o tecido cutâneo. Recentemente, o extrato de repolho roxo tem ganhado atenção na área médica devido às suas propriedades como indicador de pH, com propriedade para alterar a cor conforme o pH do meio, por meio da cianidina (em pH ácido as antocianinas assumem coloração avermelhada, em pH neutro tendem a ficar roxas e em meio básico, azuladas ou esverdeadas), um potencial para o monitoramento, em tempo real, do estado de saúde das feridas. Sua combinação com o colágeno reticulado com a vanilina pode melhorar significativamente a eficácia do curativo, proporcionando uma cicatrização funcional do tecido da área afetada.

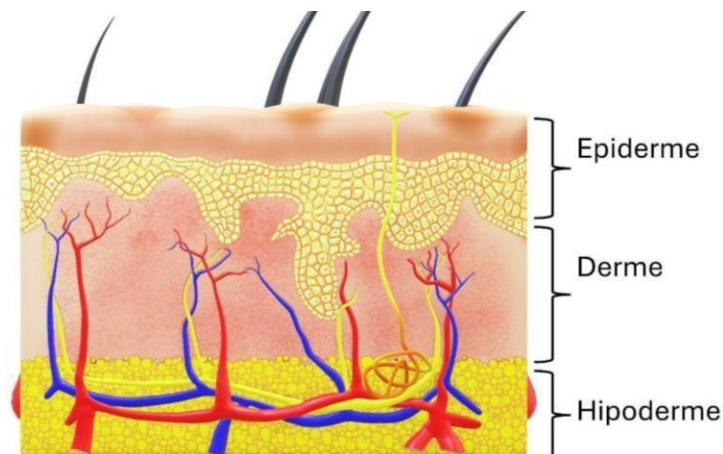
Neste sentido, este trabalho teve o objetivo de desenvolver uma membrana funcional, estabelecendo protocolos para a reticulação do colágeno com a vanilina e adicionando um agente indicador de pH, o repolho roxo, a fim de obter uma membrana com potencial protetor, curativo e de monitoramento de pH como uma alternativa promissora e de baixo custo para ser utilizada, no futuro, no tratamento de feridas de queimaduras de segundo grau.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, desempenha funções essenciais que vão além da mera proteção física. É composta por três camadas principais: a hipoderme, a derme e a epiderme (Figura 1), cada uma com funções e características específicas que contribuem para a manutenção da homeostase corporal (Bernardo; Santos; Silva, 2019; Alves et al., 2019). A hipoderme, ou tecido subcutâneo, é composta principalmente por tecido adiposo, que fornece isolamento térmico, absorção de choques e reserva de energia (Speakman, 2018; Driskell et al., 2014). A derme, localizada abaixo da epiderme, é rica em fibras colágenas e elásticas, que conferem força e elasticidade à pele. Nesta camada, encontram-se também vasos sanguíneos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que desempenham papéis cruciais na termorregulação e na resposta imunológica (Da Trindade, 2022). A epiderme, a camada mais externa, é constituída principalmente por queratinócitos, células que produzem queratina, uma proteína que confere resistência e impermeabilidade à pele (Miot et al., 2007). Além disso, contém melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, que protege contra os danos causados pela radiação ultravioleta (Niero, 2010).

Figura 1- Camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme).



Fonte: Autoria própria.

O pH da pele é um fator importante para a manutenção de sua saúde e função protetora. Normalmente, a pele possui um pH ligeiramente ácido, o que é essencial para preservar sua barreira natural e proteger contra microorganismos prejudiciais. No entanto, o pH pode ser alterado por causas como as infecções, podendo comprometer a integridade da pele, afetando

seu processo de cicatrização. A tabela 1 apresenta as causas que influenciam nos valores do pH (Power, 2016; Ono *et al.*, 2015).

Tabela 1- Causas que influenciam na alteração do pH.

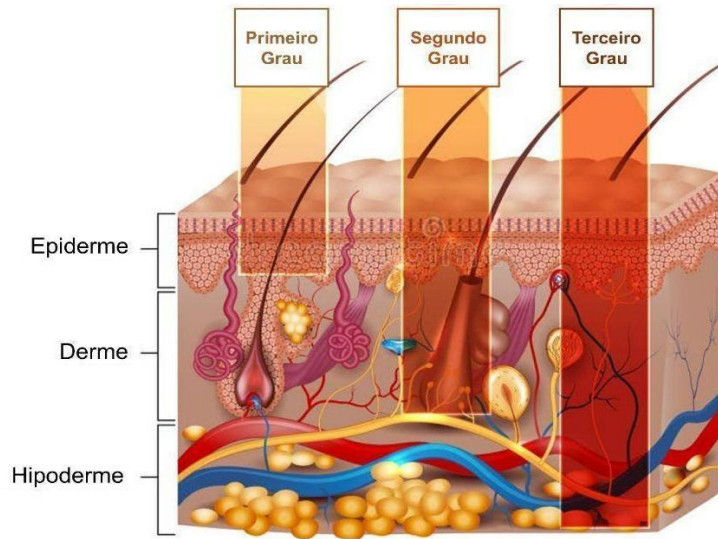
Causas	pH	Referências
Normal - adultos	4,5 - 6	Power (2016)
Boa cicatrização	4,5 - 6	Svensson; Wahlstrom (2017)
Sangue	7,4	Svensson, Ester; Wahlstrom (2017)
Exsudatos	7,4	Schneider <i>et al.</i> (2007)
Proliferação de bactérias	7,4 - 9	Ono <i>et al.</i> (2015)
Feridas crônicas	7 -9	Percival <i>et al.</i> (2016)

2.1.1 Queimaduras e processo de cicatrização

A pele pode sofrer vários tipos de lesões como cortes, escoriações, contusões e queimaduras. As queimaduras representam um dos tipos mais graves de lesões na pele, podendo ser causadas por uma variedade de agentes, incluindo calor, produtos químicos, eletricidade e radiação. São classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau, de acordo com a profundidade e extensão do dano tecidual (Figura 2).

As queimaduras de primeiro grau afetam apenas a epiderme, a camada mais superficial da pele, causando vermelhidão e leve inchaço. A superfície da pele pode apresentar uma aparência seca e escamosa, sem formação de bolhas (Greenhalgh, 2019). Esse tipo de queimadura, apesar de doloroso, geralmente resulta em uma cicatrização completa sem complicações significativas. As queimaduras de segundo grau, também conhecidas como queimaduras de espessura parcial, afetam tanto a epiderme quanto a derme, caracterizam-se por dor intensa, eritema e formação de bolhas. As bolhas podem ser úmidas e exsudativas (Katherine *et al.*, 2022). Enquanto as de terceiro grau são mais graves e envolvem a destruição completa da epiderme e a derme, podendo comprometer tecidos mais profundos, como músculos e ossos. A área afetada pode exibir uma aparência variada, que vai desde a cor branca, carbonizada ou escura, até uma textura seca e dura (Warby; Maani, 2023). Devido à destruição de terminações nervosas, essas queimaduras podem não causar dor imediata, o que pode mascarar a extensão real do dano.

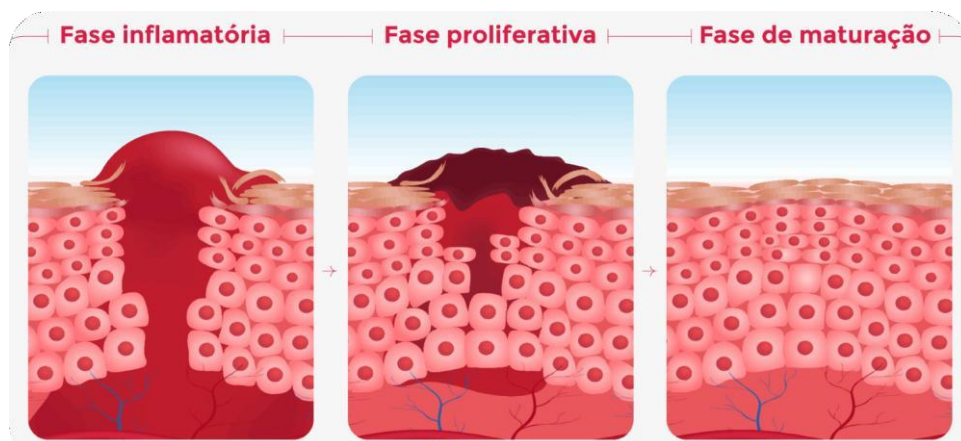
Figura 2- Demonstração das queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau



Fonte: Adaptado dreamstime.

O processo de cicatrização das queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau envolve algumas etapas. Inicialmente, ocorre uma fase inflamatória, onde células imunológicas são recrutadas para remover tecidos danificados e combater possíveis infecções. Subsequentemente, durante a fase proliferativa, células-tronco presentes nos folículos pilosos e glândulas sudoríparas são ativadas para promover a regeneração da epiderme. As células epiteliais proliferam e migram para cobrir a área lesionada, enquanto fibroblastos na derme produzem novas fibras colágenas para restaurar a estrutura e a função da pele. Na fase de maturação, o tecido cicatricial é remodelado, com reorganização das fibras colágenas e diminuição da vascularização, culminando na formação de uma cicatriz mais resistente e funcional (Figura 3) (Rowan *et al.*, 2015; Singer; Boyce, 2017).

Figura 3- Demonstração das fases do processo cicatricial.



Fonte: Equipe Medcel.

A formação do colágeno é um processo complexo que se inicia dentro das células especializadas, como fibroblastos. Primeiramente, o DNA é transcrito em mRNA no núcleo celular, que é subsequentemente traduzido em cadeias polipeptídicas de pré- procolágeno nos ribossomos (Neklyudov, 2003; Silva, 2012). Estas cadeias entram no retículo endoplasmático rugoso, onde sofrem modificações pós-tradução, como a hidroxilação de resíduos de prolina e lisina, que requerem a glicosilação de resíduos de hidroxilisina (Borst, 2024). As cadeias modificadas se enrolam em uma hélice tripla para formar o procolágeno. Este é então transportado para o aparelho de Golgi, onde é empacotado em vesículas secretoras e liberado no espaço extracelular. No espaço extracelular, enzimas específicas clivam as extremidades do procolágeno, convertendo-o em tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno se auto-asseblam em uma estrutura regular para formar fibrilas de colágeno, estabilizadas por ligações cruzadas covalentes entre resíduos de lisina e hidroxilisina, catalisadas por enzimas como a lisil oxidase (Silva, 2012; Damodaran; Parkin; Fennema; Artmed, 2010).

O colágeno tipo I e tipo III são os principais presentes na pele, que constituem cerca de 80-85% e 15-20% do total de colágenos na pele humana, respectivamente (Sugita *et al.*, 2021; Brown *et al.*, 2011). A transição do colágeno tipo III para tipo I é crucial durante o desenvolvimento, cicatrização e remodelação tecidual. Inicialmente, após uma lesão, o colágeno tipo III é predominantemente sintetizado devido à sua flexibilidade, elasticidade e maciez (Xue; Jackson, 2015). Este tipo de colágeno é encontrado em grandes quantidades nas primeiras fases de cicatrização. À medida que a cicatrização progride, o processo de remodelação tecidual envolve a substituição gradual do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I (Su, *et al.*, 2023; Singh; Rai; Agrawal, 2023). Este processo é mediado por fibroblastos que degradam o colágeno tipo III através de metaloproteinases de matriz (MMPs) e sintetizam colágeno tipo I, que é mais resistente e proporciona maior força mecânica ao tecido (Singh; Rai; Agrawal, 2023). O colágeno desempenha um papel crucial na cicatrização de feridas em todas as etapas (inflamação, proliferação e remodelação). Durante a inflamação, citocinas atraem neutrófilos e fragmentos de colágeno degradado recrutam células imunológicas para remover microrganismos e tecidos danificados. Na fase proliferativa, fibroblastos migram para a ferida e produzem uma nova matriz de colágeno e proteoglicanos, substituindo a matriz provisória de fibrina e hialuronano (Theoret, 2005; Xue; Jackson, 2015; Su *et al.*, 2023). Nesta etapa, há uma transição de colágeno tipo III para tipo I, que oferece maior resistência. Fragmentos de colágeno também promovem a angiogênese. Na fase de remodelação, o tecido cicatrizado recupera entre 50% e 80% da integridade e resistência da pele normal (Su *et al.*, 2023).

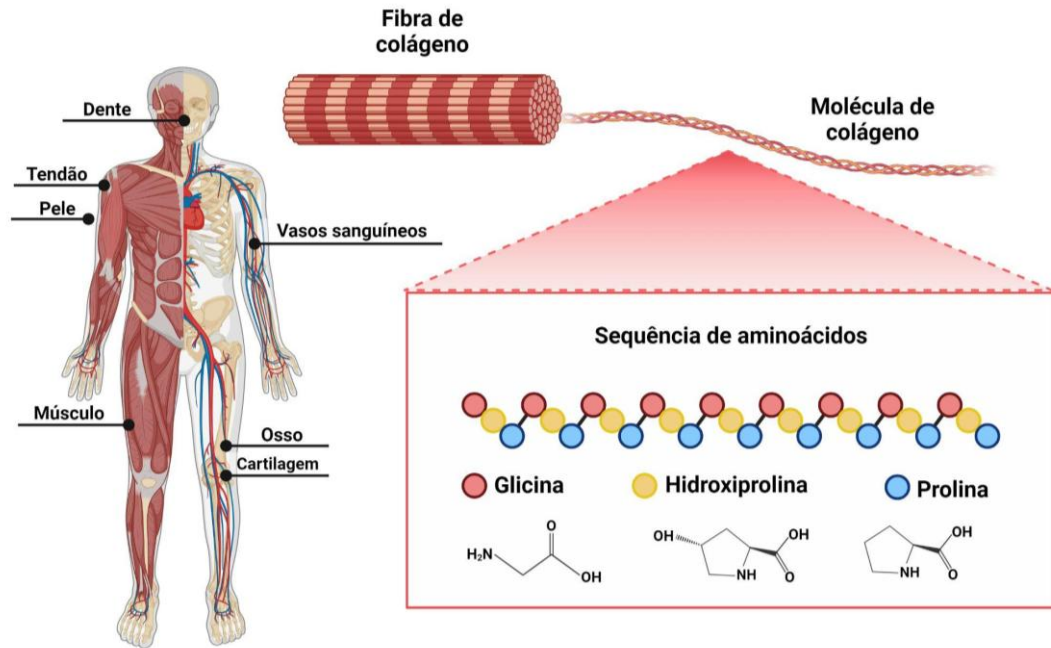
A substituição completa do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I resulta em uma cicatriz mais forte e menos elástica, sendo a qualidade do tecido cicatrizado determinada pela quantidade e organização do colágeno tipo I. Em suma, o colágeno é essencial para o processo de cicatrização de feridas, uma vez que confere ao tecido regenerado resistência e funcionalidade.

2.2 Colágeno

O colágeno (COL) é uma proteína fibrosa, de origem animal, presente em partes do corpo como tendões, ossos, vasos sanguíneos, músculos, cartilagens, dentes e pele. Sua função é contribuir com a integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz (Silva; Barreto, 2012). O colágeno desempenha um papel fundamental na cicatrização de feridas, oferecendo suporte estrutural e protegendo fatores de crescimento da degradação por proteases, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Diller, Robert B., 2022; Potekaev, Nikolai N. *et al.*, 2021). Ao se ligar a esses fatores, o colágeno cria um reservatório biológico que prolonga sua atividade e permite uma liberação controlada, estimulando a proliferação celular e a angiogênese (Potekaev, Nikolai N. *et al.*, 2021). Além disso, o colágeno regula a atividade proteolítica, reduzindo a degradação excessiva da matriz extracelular e promovendo a formação ordenada de novo tecido (Mathew-Steiner, Shomita S.; Roy, Sashwati; Sen, Chandan K., 2021). Os biomateriais de COL estimulam células como fibroblastos e macrófagos a produzirem novo COL, melhorando assim, o processo de cicatrização de feridas (Fleck; Simman, 2010). Eles possuem uma excelente biocompatibilidade, devido às suas características biológicas como a biodegradabilidade e baixa antigenicidade (Lee; Singla; Lee, 2001), além disso, possui alta resistência à tração, é atóxico e imunogênico (Patino *et al.*, 2002).

Por sua vez, o COL é formado por três cadeias polipeptídicas, chamadas de cadeias alfa ou tropocolágeno. Essa cadeia é formada por uma sequência de aminoácidos como a glicina, hidroxiprolina e prolina (Figura 4), e confere à proteína sua característica fibrosa e resistente à tração (Prestes *et al.*, 2013). As α -hélices de colágeno se unem para formar fibrilas de COL, que são fibras finas e longas, conferindo assim, resistência e elasticidade aos tecidos que estão presentes (Hulmes, 2002). Essas fibrilas, se unem para formar fibras de COL ainda maiores, que constituem estruturas como partes do corpo que foram supracitadas.

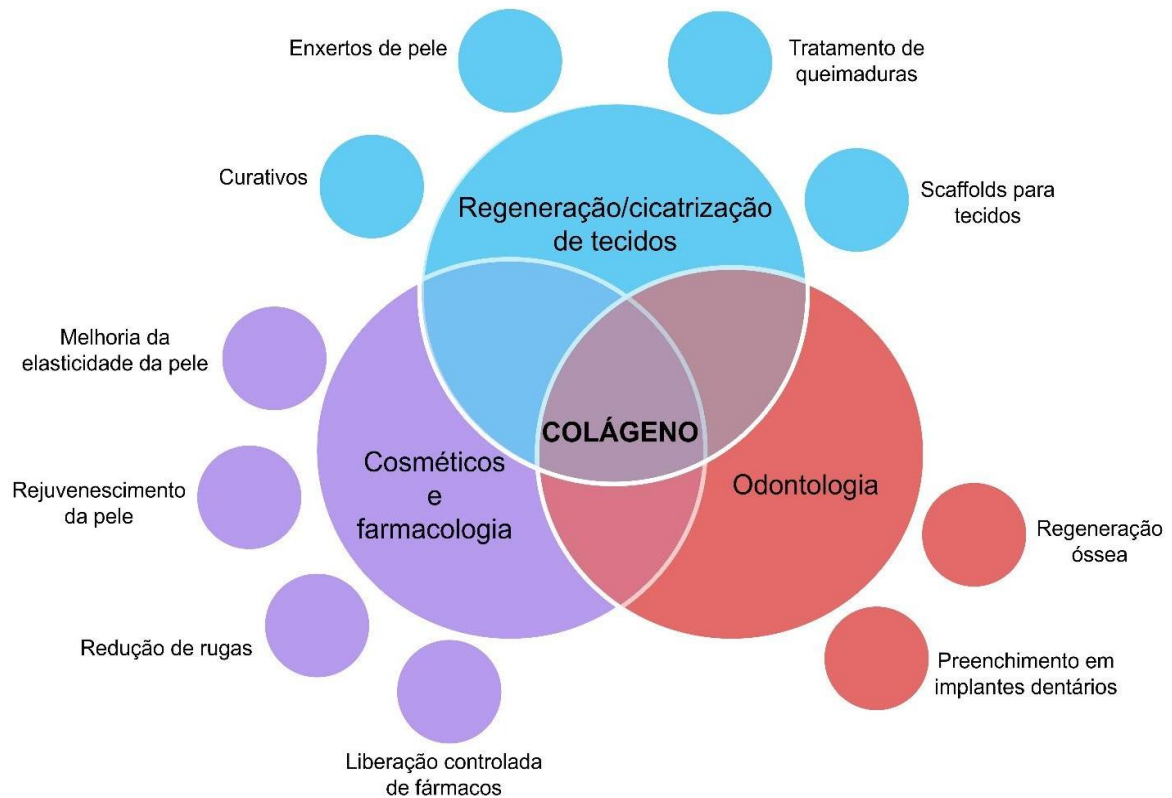
Figura 4- Estrutura do COL e partes do corpo onde está presente.



Fonte: Autoria própria.

Na área médica, o COL é amplamente explorado devido às suas propriedades bioquímicas e biomecânicas. Suas aplicações incluem a regeneração de tecidos e cicatrização de feridas, nas quais os curativos à base de COL fornecem uma matriz tridimensional que suporta a migração celular e a formação de novos tecidos, acelerando a cicatrização e minimizando cicatrizes (Indrani; Lukitowati; Yulizar, 2020; Ramasamy; Shanmugam, 2015). Também é utilizado em enxertos de pele e tratamentos de queimaduras devido à sua biocompatibilidade (Souza *et al.*, 2018). Na engenharia de tecidos, o COL é empregado como material de construção para criar tecidos artificiais, sendo na fabricação de *scaffolds* que imitam a matriz extracelular natural, promovendo o crescimento celular (Mo; Chen; Weber, 2007). No campo odontológico é usado para regeneração óssea e como material de preenchimento em implantes dentários (Jung *et al.*, 2009). Adicionalmente, o COL é usado em cosméticos e dermatologia para rejuvenescimento da pele, através de injeções de COL que ajudam a reduzir rugas e melhorar a elasticidade (Sionkowska *et al.*, 2020; Avila; Rodríguez; Sánchez, 2018). Por fim, na farmacologia, o colágeno serve como veículo para liberação controlada de medicamentos, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo efeitos colaterais (Vulcani, 2004; Oliveira, 2017). A Figura 5 apresenta as aplicações do colágeno na área médica.

Figura 5- Diagrama de Venn das aplicações do COL na área médica.



Fonte: Autoria própria.

Apesar de suas notáveis propriedades, o COL puro apresenta algumas limitações como baixa resistência mecânica, rápida biodegradabilidade, alta solubilidade aquosa e limitada barreira ao vapor de água (Brett, 2008). Diante disso, há possibilidade de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno com processos de reticulação. A reticulação promove a formação de uma rede tridimensional estável que resulta em um material com características físicas e propriedades superiores, ampliando suas aplicações potenciais (Alavarse *et al.*, 2022).

2.3 Reticulação do colágeno

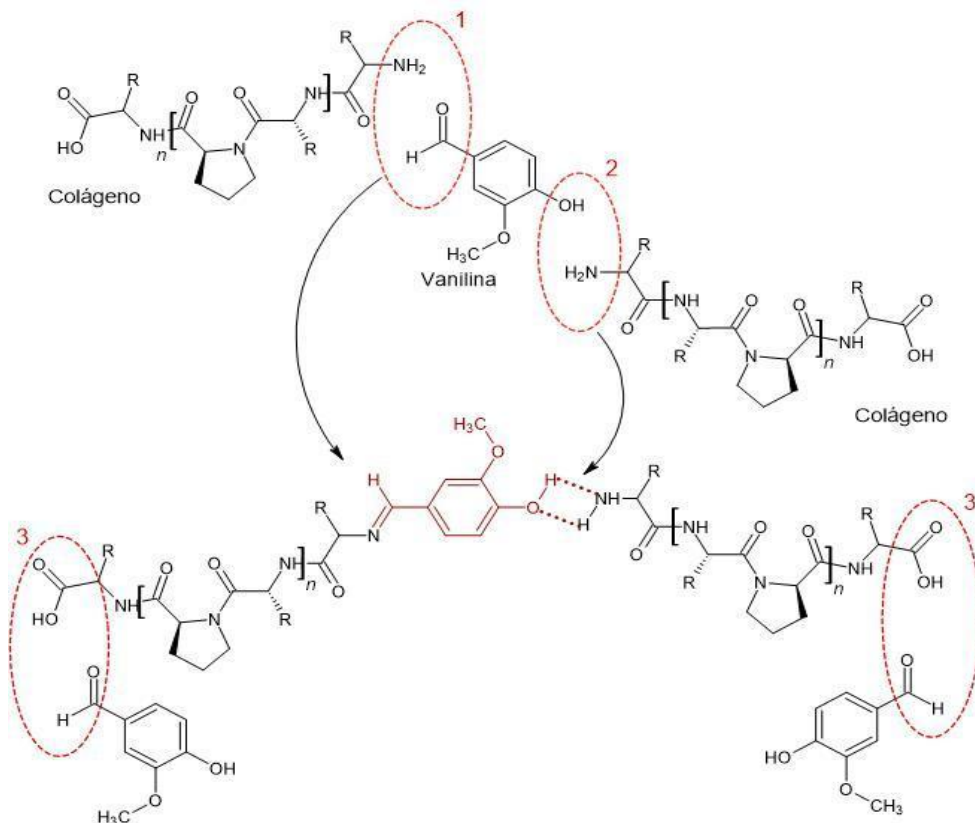
A reticulação envolve a formação de ligações covalentes ou interações cruzadas entre cadeias poliméricas, resultando em uma rede tridimensional que melhora a resistência mecânica do colágeno, reduz sua solubilidade, e aumenta a resistência ao vapor de água. Esse processo resulta em um material com características físicas e funcionais superiores, ampliando suas aplicações potenciais (Alavarse *et al.*, 2022; Gu *et al.*, 2019).

Ademais, a reticulação pode ser realizada utilizando diversos tipos de agentes reticuladores naturais e sintéticos que são substâncias que promovem a formação dessas ligações cruzadas. Entre os agentes reticuladores comuns estão os glutaraldeídos, carbodiimida, ácido bórico, trimetafosfato de sódio, N,N'- metileno bisacrilamida (MBA) e ácidos

policarboxílicos, e os naturais como enzimas, genipina, ácido tânico, ácido fítico e vanilina (Alavarse *et al.*, 2022; Kajave *et al.*, 2020; YAN, Le-Ping *et al.*, 2010; Bax *et al.*, 2017; Adamiak; Sionkowska, 2020). Especificamente para o colágeno, que é uma proteína fibrosa amplamente utilizada em engenharia de tecidos e outras aplicações biomédicas, a reticulação é fundamental para melhorar a sua estabilidade e funcionalidade (Eyre; Wu, 2005).

De acordo com Inbasekar (2023), a vanilina foi utilizada como agente de reticulação do colágeno no processo de curtimento de couro. Os resultados mostraram que a vanilina é eficaz na formação de ligações cruzadas com as fibras de colágeno, aumentando tanto a estabilidade térmica quanto a resistência mecânica do couro. A análise de XPS confirmou a formação de ligações imina entre os grupos amina do COL e os grupos aldeído da vanilina (Figura 6-1), resultando em uma estrutura de COL mais compacta e resistente.

Figura 6- Demonstração de reticulação do COL com a Vanilina.



Fonte: Produzido no software ChemSketch.

O processo de reticulação ocorre principalmente através de ligações de imina (ou base de Schiff) entre o grupo aldeído da vanilina e o grupo amina livre do colágeno (Figura 6-1). Além disso, a reticulação pode ocorrer pela formação de ligações de hidrogênio entre a amina do COL e a OH fenol da VAN (Figura 6-2) e também entre o grupo COOH do COL e o grupo

aldeído (C-H) da VAN (Figura 6-3). Essas reações criam uma rede tridimensional que interliga as fibras de colágeno, aumentando a rigidez e a resistência mecânica da matriz.

Embora os relatos na literatura com uso da vanilina para reticular colágeno sejam limitados, a reticulação tem mostrado um potencial significativo para superar as limitações das membranas de colágeno puro.

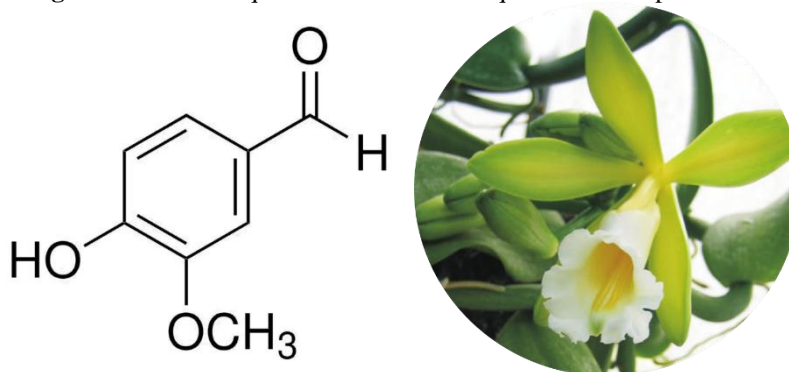
2.3.1 Vanilina

A vanilina (VAN) é obtida tradicionalmente das sementes da orquídea tropical (*Vanilla planifolia*) encontrada na fava da baunilha (Ibrahim; Sipaut; Yusof; Nn, 2009), conhecida como 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Figura 7), um composto aromático que faz parte da classe dos compostos fenólicos, amplamente conhecido por seu uso como agente aromatizante, possui diversas propriedades que a tornam interessante para aplicações na área biomédica. Além de seu aroma característico, a VAN apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa citotoxicidade, analgésicas e antioxidante, é obtido de recursos naturais e é inofensivo ao meio ambiente (Sapula; Bialik-Wąs; Malarz, 2023; Boiko *et al.*, 2019).

A VAN sintética é uma versão quimicamente produzida do composto natural, sendo amplamente utilizada em diversas indústrias, incluindo alimentos, fragrâncias e cosméticos, aliadas às propriedades da VAN natural, ela possui baixo custo e maior disponibilidade. Ela pode ser produzida através de diferentes métodos, como a partir da lignina, guaiacol e ácido ferúlico (Fache; Boutevin; Caillol, 2016; Priefert; Rabenhorst; Steinbüchel, 2001; Yoon *et al.*, 2005).

Essas características fazem da VAN um elemento promissor para o desenvolvimento de novos materiais biomédicos, oferecendo benefícios tanto para a eficácia quanto para a sustentabilidade dos produtos.

Figura 7- Estrutura química da VAN e a orquídea *Vanilla planifolia*.



Fonte: Adaptado no software ChemSketch. (Ortobotanico, 2008).

A VAN tem se destacado na área médica devido às suas propriedades terapêuticas. Estudos recentes demonstraram que a VAN possui atividades antimicrobianas significativas (Mourtzinou *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2017; Polo *et al.*, 2018), que a tornam uma alternativa promissora para a formulação de conservantes naturais em alimentos e cosméticos, além de aplicações em materiais médicos destinados à prevenção de infecções. Além disso, suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias são de grande interesse para o desenvolvimento de biomateriais e terapias farmacológicas (Breilly *et al.*, 2024; Castor, 2013). Adicionalmente, a VAN está sendo investigada como um agente terapêutico para condições inflamatórias e doenças neurodegenerativas, devido à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e modular a inflamação (Bezerra *et al.*, 2018).

Essas aplicações não apenas ampliam o uso da VAN além do seu papel tradicional, mas também destaca seu potencial como um componente inovador em novas abordagens biomédicas. Diante de relatos na literatura, VAN é conhecida como reticulador natural de polissacarídeos, porém, já existem alguns estudos que comprovam que o material pode reticular proteínas, como o colágeno (Inbasekar, Chandrasekar; Fathima, 2023; Alavarse *et al.*, 2022).

2.4 Curativos para queimaduras e sua evolução

Curativos para queimaduras desempenham um papel crucial no manejo de feridas, proporcionando proteção, umidade e um ambiente adequado para a cicatrização. A evolução desses curativos, desde os métodos tradicionais até os avanços tecnológicos mais recentes, têm melhorado significativamente os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes.

Os primeiros curativos para queimaduras consistiam em materiais naturais como folhas, mel e gordura animal (Shah, 2011; Moues *et al.*, 2009). O mel, conhecido por suas propriedades antibacterianas, era amplamente utilizado. Com o tempo, materiais como gaze e algodão passaram a ser usados, proporcionando uma barreira física para proteger a ferida de infecções e desidratação (Daunton *et al.*, 2012). Com o avanço da medicina e na área de biomateriais, os curativos evoluíram para incluir materiais sintéticos e semissintéticos. Curativos de hidrocoloides, hidrogel, entre outros, foram desenvolvidos para manter um ambiente úmido ideal para a cicatrização, reduzir a dor e minimizar o risco de infecção (Barnea; Weiss; Gur, 2010; Pinheiro; Borges; Donoso, 2013).

Os curativos hidrocoloides são compostos por uma camada adesiva de polímeros absorventes que formam um gel quando em contato com o exsudato da ferida. Eles mantêm um ambiente úmido e protegem contra contaminação externa, promovendo a cicatrização

(Abraham *et al.*, 2022). Os hidrogéis são compostos de uma matriz polimérica tridimensional que contém grande quantidade de água (Almeida; Deutsch; Nogueira, 2021). Eles são ideais para feridas com exsudato mínimo a moderado, proporcionando alívio da dor e um ambiente úmido que facilita a cicatrização (Brito *et al.*, 2013; Silva, 2021). Derivados de algas marinhas, os curativos de alginato são altamente absorventes e formam um gel quando em contato com o exsudato (Franco; Gonçalves, 2008). Eles são ideais para feridas com exsudato moderado a alto e ajudam a desbridar naturalmente a ferida (De Azevedo *et al.*, 2014). Além disso, os curativos podem ser impregnados com prata ou outras substâncias antimicrobianas também se tornaram comuns, fornecendo proteção adicional contra infecções (Vieira *et al.* 2017).

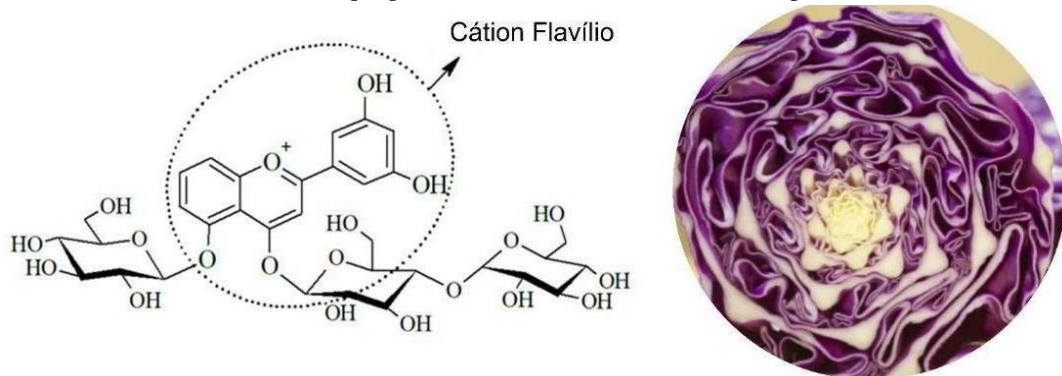
Os efeitos antimicrobianos dos curativos podem ser alcançados com liberação modificada de fármacos, os quais são projetados para liberar substâncias terapêuticas, como antimicrobianos, analgésicos ou fatores de crescimento, de maneira controlada e sustentada. A liberação controlada ajuda a manter concentrações terapêuticas constantes no local da ferida, melhorando a eficácia do tratamento e reduzindo a necessidade de trocas frequentes de curativo (Junior; Shiota; Chiavacci, 2014; Rodrigues, 2012). Tais curativos são denominados avançados, pois são um avanço na gestão de feridas, monitorando e respondendo às condições da ferida em tempo real.

Os curativos avançados podem ser utilizados também como sensores que detectam mudanças de temperatura, umidade e pH, além disso, fornecem informações valiosas sobre o estado da ferida e a eficácia do tratamento. Curativos sensores de pH, ou *smart wound dressing*, podem indicar infecção através do aumento do pH (8-10), permitindo detecção precoce e intervenções rápidas. Indicadores de pH visualmente mudam de cor, sinalizando o estado da ferida, com pH neutro ou ligeiramente ácido favorecendo a cicatrização, enquanto pH alcalino indica infecção (Tabela 1). Os *smart wound dressing* melhoram resultados clínicos com monitoramento em tempo real, liberação modificada de medicamentos e respostas rápidas, reduzindo o tempo de cicatrização e melhorando a qualidade de vida. Estudos como o de Zepon *et al.* (2019), desenvolveram curativos baseados em κ -carragenina/goma de alfarroba/extrato de cranberry para monitorar infecções bacterianas, mostraram que o curativo foi eficaz na detecção de infecções bacterianas através de mudanças no pH e alterações visíveis na cor do curativo. O estudo de Arafa *et al.* (2021) preparou curativos terapêuticos avançados sensíveis ao pH a partir de extrato de repolho roxo e hidrogel de quitosana, demonstrando que esse curativo pode responder às mudanças de pH no ambiente da ferida, mudando de cor conforme o nível de acidez ou alcalinidade.

2.4.1 Indicador de pH: extrato de repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

O extrato de repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) (ERR) (Figura 8), é um indicador sensível às alterações de pH, devido a uma variedade de compostos bioativos como flavonoides principalmente pela sua riqueza em antocianinas (Machado *et al.*, 2022; Freitas; 2018). Além de sua aplicação na indústria alimentícia, as antocianinas do repolho roxo estão sendo estudadas para serem utilizadas em cosméticos, bioindicadores ambientais e fármacos, refletindo um crescente interesse em soluções naturais e sustentáveis para diversas áreas (Carvalho *et al.*, 2019; Trilokchandran; Vijayakumar; Thippareddy, 2019; Wardana; Widyaningsih, 2017; Ha; Lee, 2014). As antocianinas possuem pigmentos naturais que conferem a coloração vermelha, roxa e azul em pH's de 2 a 8 (Machado *et al.*, 2022; Khoo; 2017). Além disso, possui uma ampla gama de cores e ampla faixa de pH, o que a diferencia de outros extratos vegetais indicadores que podem ser mais limitados em termos de faixa de pH e mudança de cor.

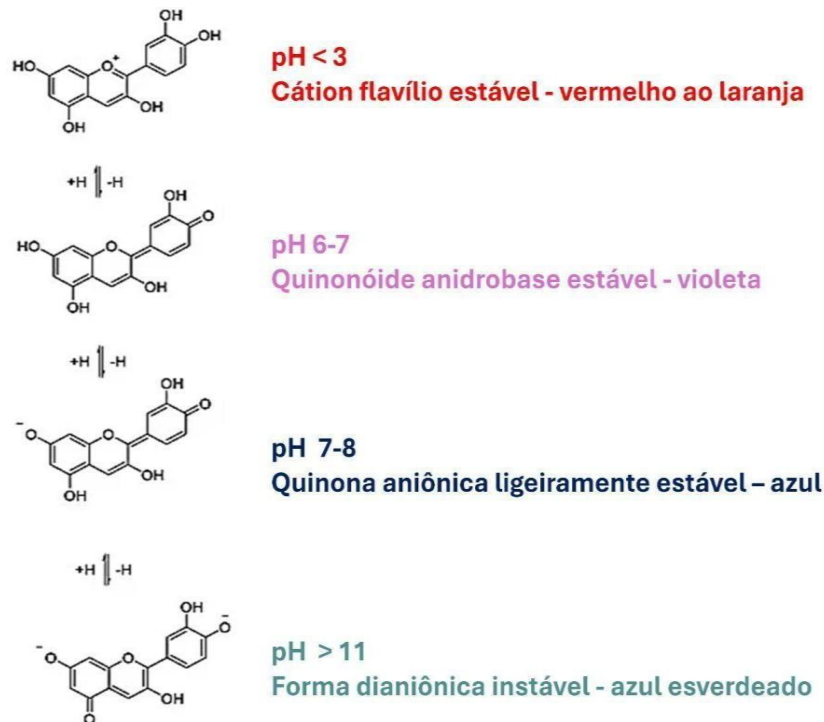
Figura 8- Cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo (um dos principais compostos antocianínicos encontrados no repolho roxo) e Repolho roxo (*B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) do qual se obtém o extrato que pode ser utilizado como indicador de pH.



Fonte: Adaptado e traduzido de Rodríguez *et al.* (2024) e Rea, 2017.

As antocianinas são compostos polifenólicos, que consistem em um núcleo flavílico ligado a grupos de hidroxila e metoxila, e são geralmente glicosiladas, o que significa que possui moléculas de açúcar ligadas. Em ambientes com pH baixo, as antocianinas existem predominantemente como cátions flavílicos, onde o oxigênio possui uma carga positiva de oxônio. Quando o pH é neutro, essas moléculas se transformam em quinonas neutras, sem carga. Já em condições alcalinas, todas as antocianinas demonstram uma leve estabilidade, uma característica que se intensifica conforme o pH aumenta. Entretanto, mesmo em pH alto, essas moléculas podem sofrer diversas vias de degradação, o que leva à perda gradual da coloração, como ilustrado na Figura 9 (Mattioli; Francioso; Mosca; Silva, 2020).

Figura 9- Formas moleculares e deslocalização eletrônica da cianidina em variados níveis de pH.



Fonte: Adaptado de Mattioli; Francioso; Mosca; Silva, 2020.

Além das antocianinas serem potentes antioxidantes, possuem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, bactericidas, antifúngicas e antivirais (Mattioli *et al.*, 2020; Arafa *et al.*, 2021). Seu uso como corante natural vem ganhando destaque devido à sua segurança para consumo humano, contrastando com riscos associados aos corantes artificiais, como efeitos alergênicos e carcinogênicos (Lopes; Quadri; Quadri, 2006).

A combinação de COL, ERR e VAN em *smart wound dressing* representa uma abordagem inovadora para o tratamento de queimaduras, unindo as propriedades benéficas de cada componente. O COL fornece uma matriz estrutural que apoia a regeneração tecidual, a VAN atua como um reticulador natural e agente antimicrobiano, e o ERR oferece tanto benefícios bioativos quanto uma funcionalidade de indicação de pH. Este tipo de curativo não só auxilia na cicatrização por não afetar o tecido lesionado e por oferecer fonte de fibras colágenas, mas também porque oferece a possibilidade de monitoramento contínuo da saúde da ferida. Além disso, o material é inteiramente natural, biodegradável, baixo custo e contribui para uma solução sustentável e segura no tratamento de feridas.

2.5 Justificativa

Infecções hospitalares em queimaduras de pele frequentemente levam a um prolongado período de recuperação das feridas e a uma elevada taxa de perda de curativos devido a complicações infecciosas. Durante o tratamento de queimaduras de segundo grau, é crucial manter a área afetada limpa e protegida para prevenir infecções, que podem complicar significativamente o processo de cicatrização. O uso de *smart wound dressing*, que monitoram a saúde da ferida, pode oferecer um ambiente úmido adequado para a cicatrização, além de monitorar a condição da ferida de acordo com o pH. A compreensão aprofundada da estrutura e função da pele, bem como dos mecanismos de cicatrização, é fundamental para o desenvolvimento de novos biomateriais, como membranas de COL/ERR reticulado com VAN, que visam otimizar o tratamento de lesões cutâneas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, não lesionando ainda mais o tecido. Assim, a motivação para esta pesquisa é o desenvolvimento de um *smart wound dressing* que, por meio do monitoramento das alterações de pH, pode identificar a presença de infecções, a colonização por bactérias e avaliar o estado de cicatrização da ferida. O uso do COL é funcional devido às suas propriedades naturais de promover a cicatrização, enquanto o uso da VAN é fundamental para reticular o COL, melhorando a resistência e a integridade da membrana, além de promover propriedades antimicrobianas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver e caracterizar uma membrana composta por COL reticulado com diferentes concentrações de VAN, e ERR atuando como indicador natural de pH, visando avaliar o potencial desta membrana para futuras aplicações biomédicas em queimaduras.

3.2 Específicos

- Caracterizar o ERR por meio de Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis);
- Produzir qmembranas de COL contendo ERR (COL/ERR);
- Reticular as membranas de COL/ERR com diferentes concentrações de vanilina (VAN) (0,5%; 1%; 3% e 6%);
- Avaliar o potencial de indicador de pH das membranas COL/ERR/VAN;
- Caracterizar o COL por meio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE);
- Caracterizar físico-quimicamente as membranas por meio de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratório Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), intumescimento, ensaio de tração, Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN);
- Caracterizar biologicamente as membranas por meio de antibiograma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para esse projeto, foi utilizado o colágeno nativo (não hidrolisado) tipo I em pó bovino, fornecido pela empresa NovaProm (Guaíçara, Brasil), a vanilina Reagentplus 99%, fornecido pela Sigma Aldrich - Merck (Brasil), o repolho roxo foi adquirido no Grupo Fartura De Hortifrut S.A. (Oba Hortifrut - Sorocaba, Brasil), e a maltodextrina foi adquirida na Cerealista Sorocaba Comércio de Condimentos e Especiarias LTDA (Sorocaba, Brasil). Acetato de sódio (Synth - Diadema, SP), fosfato de potássio (Synth - Diadema, SP), tetraborato de sódio (Synth - Diadema, SP), tampão fosfato salino (pH em torno de 7,4), álcool etílico (PA) (Synth - Diadema, SP).

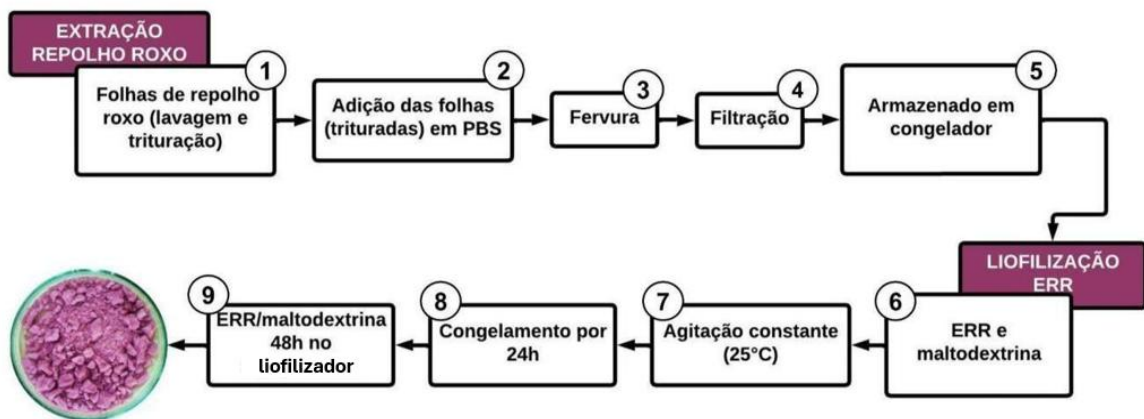
4.2 Métodos

4.2.1 Extração e liofilização do extrato de repolho roxo

Para extração da antocianina obtida do repolho roxo foi utilizada a metodologia segundo Almeida *et al.* (2015), com modificações. Foram separados aproximadamente 150g de repolho roxo (*B. oleracea var. capitata f. rubra*) *in natura*, limpas, secas e trituradas (Figura 10-1). Posteriormente, adicionou-se 450 ml de tampão fosfato salino (PBS) (Figura 10-2), que foi submetido à fervura até diminuir 50% do volume inicial (Figura 10-3). Em seguida, com o líquido em temperatura ambiente, foi filtrado através de bomba a vácuo (Figura 10-4) e armazenados em tubos Falcon envoltos com papel alumínio a -18°C (Figura 10-5). O rendimento do extrato foi de 300 mL (Figura 10).

O repolho roxo contém antocianinas glicosiladas, moléculas que possuem açúcares ligados. Conseqüentemente, a liofilização do extrato líquido puro não resulta na formação de um pó manipulável, dificultando o manuseio do extrato liofilizado. Com isso, estudos na literatura indicam o uso da maltodextrina como agente estabilizante para o ERR (Araújo *et al.*, 2018; Coutinho *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2022). A liofilização do ERR é um processo fundamental, pois intensifica a coloração da membrana, contribuindo para uma visualização mais nítida e uniforme. Para liofilização do ERR foram separadas 85 mL para 15% de maltodextrina (Figura 10-6). Primeiramente foi vertido 85 mL de ERR em um béquer e 12,75 g de maltodextrina, o mesmo foi submetido a uma temperatura de 25°C em agitador magnético com agitação constante (Figura 10-7). Por fim, o extrato foi separado em tubos Falcon e congelados por 24 h (Figura 10-8), o mesmo ficou no equipamento por 48 h (Figura 10-9). A liofilização foi realizada para a coloração mais nítida do ERR na membrana.

Figura 10- Fluxograma do processo de preparação da extração do repolho roxo e a liofilização do ERR.



Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Obtenção das membranas

As membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6%) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6%) foram obtidas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 11. A membrana de COL foi obtida dissolvendo-se 2 g de COL em 20 mL de água destilada (10%) sob agitação constante a 35°C até a completa solubilização. A membrana de COL/ERR foi obtida também dissolvendo 2 g de COL e 3 g de ERR seco em 20 mL de água destilada sob agitação constante a 35°C até a completa solubilização.

Para formular as membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6%), 2 g de COL foram dissolvidos em 20 mL de água destilada a 35°C com agitação constante. Posteriormente, diferentes quantidades de VAN (5 mg, 10 mg, 30 mg e 60 mg) foram dissolvidas em 10 mL de álcool 70%, também sob agitação constante, para obter soluções de VAN nas concentrações desejadas. As soluções de VAN foram adicionadas ao COL sob as mesmas condições de temperatura e agitação, garantindo a completa solubilização.

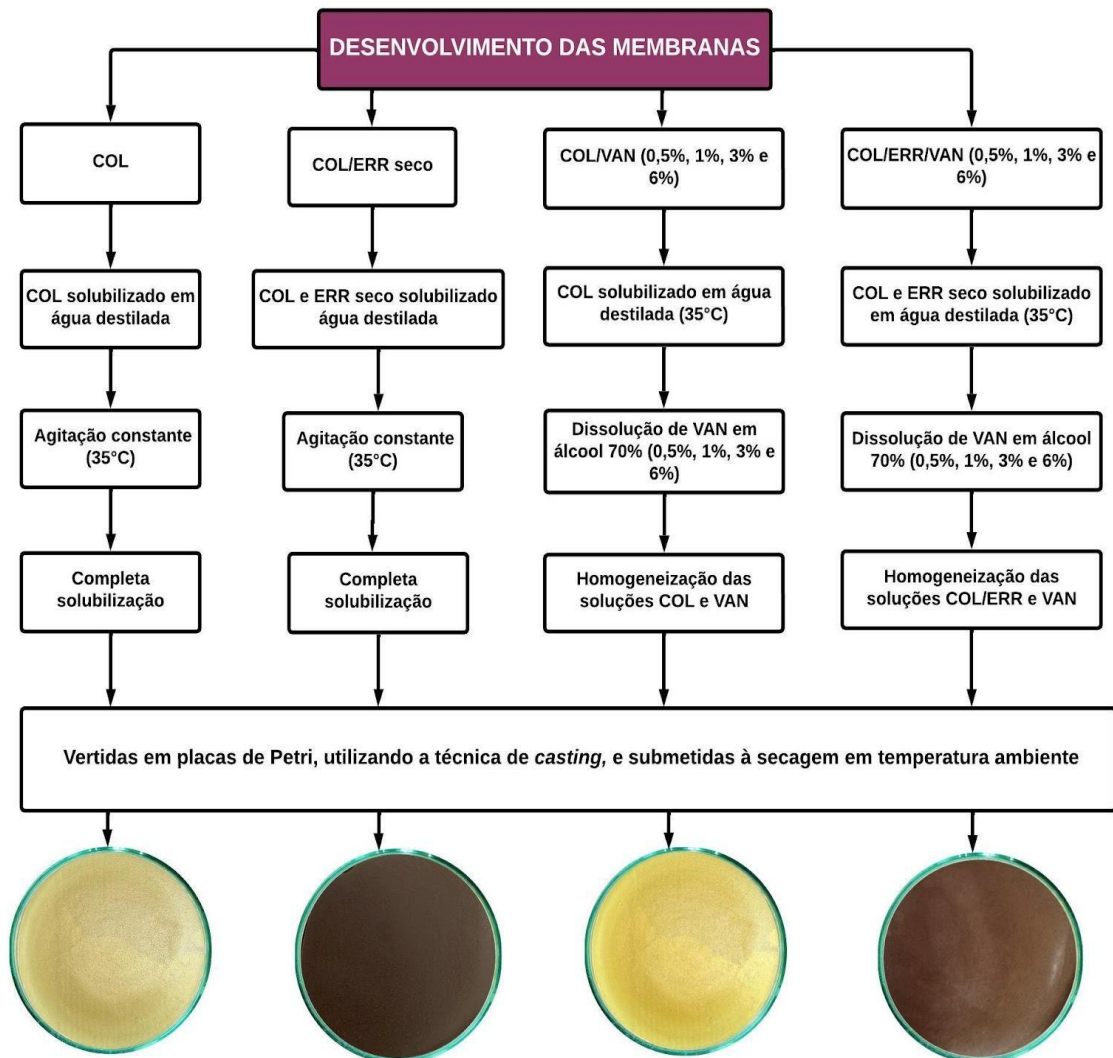
Para a preparação das membranas de COL/ERR/VAN, foram utilizados 2 g de COL, 20 mL de água destilada e 3 g de ERR seco, sob agitação constante, mantendo-se a temperatura até completa solubilização. Após, foi realizada a dissolução da VAN, empregando 10 mL de álcool 70% para 5 mg, 10 mg, 30 mg e 60 mg, com agitação constante até sua completa dissolução, para obter soluções de VAN a 0,5%; 1%; 3% e 6%, respectivamente. Em seguida, a solução de VAN foi adicionada ao COL com ERR, mantendo-se a temperatura de 35°C e agitação constante até completa solubilização. As proporções utilizadas estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2- Proporções utilizadas para obtenção das membranas de COL/ERR, COL/VAN (0,5%; 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%, 3% e 6% de vanilina).

Amostras	Proporções
COL/ERR	2:3
COL/0,5% VAN	20:1
COL/1% VAN	10:1
COL/3% VAN	10:3
COL/6% VAN	10:6
COL/ERR/0,5% VAN	4:6:0,1
COL/ERR/1% VAN	2:3:0,1
COL/ERR/3% VAN	2:3:0,3
COL/ERR/6% VAN	2:3:0,6

As soluções resultantes das diferentes formulações (COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN) foram vertidas em placas de Petri, utilizando a técnica de *casting*, e submetidas à secagem em temperatura ambiente (Figura 11). Para verificação da secagem total das membranas, foram realizadas pesagens até que não houvesse mais variação na massa. As membranas secas apresentaram 4 mm de espessura. Enquanto as membranas formuladas com COL/ERR/VAN demonstraram maior flexibilidade, aquelas contendo apenas COL/VAN resultaram em membranas mais quebradiças.

Figura 11- Fluxograma do processo de preparação das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN.



Fonte: Autoria própria.

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO

4.2.3.1. Eletroforese em gel SDS (SDS-PAGE)

A fim de caracterizar o tipo de colágeno que contém nas amostras utilizadas para produzir as membranas, foi realizado eletroforese em gel SDS (SDS-PAGE) do colágeno em pó (NovaProm).

A preparação do gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) com modificações. Em um sistema de placas de vidro montado em sanduíche. Foram preparados o gel de resolução, que forma a base, e o gel de empilhamento, posicionado sobre o gel de resolução, com as seguintes composições: (i) gel de resolução com 7,5% de acrilamida-bisacrilamida, 0,375M de TRIS-HCl (pH 8,8), 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED; (ii) gel de empilhamento com 4% de acrilamida-bisacrilamida, 0,125M de TRIS-HCl (pH 6,8), 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED.

Para o preparo das amostras foram separadas as alíquotas de proteínas colágenas foram misturadas 1:1 ao tampão de amostra (TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8, 20% de glicerol, 40% SDS 10%, 10% 2-mercapetanol e 2% de bromofenol-blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos no termomisturador para que desnaturassem. Posteriormente, as amostras foram congeladas por 24 h. Os géis foram previamente montados e colocados em uma cuba de eletroforese, imersos em tampão de corrida composto por 16,3% de TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS (pH 8,3).

A eletroforese foi realizada por 40 minutos sob uma tensão de 130 V. Após a corrida eletroforética, os géis foram removidos e imersos em uma solução corante de *Coomassie Blue* durante 60 minutos, sob a mesa agitadora orbital. Em seguida, os géis foram lavados repetidamente com água destilada, trocada a cada 20 min, até que as bandas proteicas do colágeno ficassem visíveis.

4.2.3.2 Medição dos espectros no UV-vis do ERR

Para verificar a capacidade de indicador de pH do ERR líquido, antes da produção das membranas foram realizadas medições dos espectros na faixa de 200 a 1100 nm utilizando um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) Femto - Cirrus 80 MB (Femto Indústria e Comércio de Instrumentos, Brasil). Para as medições, foram utilizados 3 mL de cada solução tampão com pH variando entre 4 a 10, além de uma amostra de ERR puro.

4.2.3.3 Resposta colorimétrica da membrana do *smart wound dressing*

Para verificar a resposta colorimétrica do *smart wound dressing* em diferentes pHs, amostras da membrana de COL/ERR/6% VAN (por ter apresentado uma coloração roxa mais evidente) foram imersas nos seguintes tampões: (i) 76,5 mL de acetato de sódio (0,1M) em 423,5 mL de ácido acético (0,1M) (pH 4); (ii) 321,5 mL de acetato de sódio (0,1M) em 178,5 mL de ácido acético (0,1M) (pH 5); (iii) 6,81 g de de fosfato de dihidrogênio de potássio em 56 mL de NaOH (0,10M) (pH 6); (iv) 6,81 g de de fosfato de dihidrogênio de potássio em 291 mL de NaOH (0,10M) (pH 7); (v) 6,81 g de fosfato de dihidrogênio de potássio em 467 mL de NaOH (0,10M) (pH 8); (vi) 4,77 g de tetraborato de sódio em 46 mL de HCl (pH 9), e (vii) 4,77 g de tetraborato de sódio em 183 mL de NaOH (pH 10). Todos os tampões foram submetidos a agitação constante até a completa solubilização. Realizou-se um registro fotográfico das membranas imersas em soluções com pH variando de 4 a 10.

4.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de MEV, as amostras COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) foram previamente fixadas e desidratadas. A fixação e desidratação da membrana de colágeno com extrato de repolho roxo e vanilina são essenciais para a preparação para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A fixação preserva a estrutura da membrana, estabilizando as proteínas e prevenindo a degradação. A desidratação é necessária para remover a água e evitar artefatos, além de melhorar a condutividade da amostra, permitindo a formação de imagens claras e detalhadas. Para tal, as amostras foram cortadas com um punch de 8 mm, adicionadas em placa de 24 poços e nelas foram inseridos 500 µL de paraformaldeído a 4% (PFA) por 1 h. Depois, o PFA foi retirado e as amostras foram lavadas duas vezes com PBS estéril. Para o processo de desidratação, as amostras foram imersas em soluções de água destilada contendo 30%, 50%, 70%, 90% de etanol (1x) e em seguida em etanol 100% (2x), cada imersão durou 30 minutos. Após a etapa de desidratação, o etanol foi removido. Em seguida, foram adicionados 500 µL de HMDS em um tubo Falcon. Em outro tubo Falcon, foi preparada uma solução na proporção 1:1 de HMDS e álcool 70%. Posteriormente, a solução foi adicionada sobre as amostras (até cobri-las) e deixada agir por 10 minutos. Depois, a solução anterior foi substituída por HMDS puro, que agiu por mais 10 minutos para completar a desidratação das amostras. Após esse período, as amostras foram retiradas do HMDS e submetidas à secagem na capela.

As amostras foram fraturadas em temperatura ambiente e metalizadas sob plasma de ouro e atmosfera de argônio, corrente de 40 mA por 4 min, gerando um recobrimento de 60 nm. As imagens foram obtidas por elétrons secundários sob 5kV em spot size de 50 nm, em WD de 7 a 8 mm, sob alto vácuo no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6490LV.

Para os histogramas, foi utilizado o software Image J. Primeiramente as imagens foram calibradas e binarizadas para contagem de tamanho de poros. Posteriormente, os dados obtidos foram plotados no software OriginPro

4.2.3.5 Ensaio Mecânico de Tração

As propriedades mecânicas das amostras de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina, respectivamente) foram avaliadas por meio de ensaios de tração. Os testes foram realizados utilizando cinco corpos de prova retangulares, com dimensões de 6 cm de comprimento x 1 cm de largura x 4 mm de espessura, em uma máquina de ensaio universal INSTRON EMIC 23-30, equipada com célula de carga de 500 N e uma taxa de alongamento de 10 mm/min. Os procedimentos seguiram os padrões estabelecidos pela norma ASTM D882.

4.2.3.6 Ensaio de Intumescimento

As amostras de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) foram cortadas usando um *punch* de 7 mm e imersas em 5 mL de PBS que teve por objetivo simular os fluidos biológicos e pH fisiológico (7,4). Após imersas, as amostras foram retiradas em intervalos de tempos pré-determinados (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 24h), secas levemente para retirada do excesso de PBS e posterior pesagem. Foi realizado triplicata de cada amostra. O grau de intumescimento (GI) das amostras foi calculado a partir da equação 1 (Almeida, 2009).

$$I\% = \left(\frac{m_f - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde I% representa o grau de intumescimento em porcentagem, *mf* é a massa final em gramas e *mi* é a massa inicial em gramas. Além disso, foi realizada uma simulação de intumescimento com PBS na quantidade média equivalente ao exsudato de queimaduras (Ousey; Djohan; Dowsett, 2023), para o qual foi pipetado 500 µL de PBS sobre as membranas que foram secas levemente para retirada do excesso de PBS e posterior pesagem em intervalos de tempos pré-determinados (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 24h).

4.2.3.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise para as amostras de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) foi realizada em um espectrofotômetro de modelo Spectrum 65 (Perkin Elmer), em módulo ATR, com número de onda na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans.

4.2.3.8 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi efetuada para avaliar o percentual de perda de massa das amostras de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) e, conseqüentemente, a estabilidade térmica das membranas. Para a análise das propriedades térmicas da membrana, foram realizadas análises termogravimétricas em um equipamento TGA 55 (TA Instruments, USA), com intervalo de temperatura de 30 a 600°C, sob atmosfera dinâmica de gás nitrogênio com fluxo de 30 mL/min, com taxa de aquecimento de 10°C/min, no qual foi utilizado aproximadamente 7 mg das amostras.

4.2.3.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Aproximadamente 7 mg das amostras de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) foi submetida à análise de DSC, em equipamento Discovery DSC 25 (TA Instruments, USA), com uma temperatura que variou de -50 à 250°C, sob taxa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min, com o objetivo de avaliar as transições de fases e observar se houve mudanças nas propriedades das membranas proporcionadas pela reticulação.

4.2.3.10 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN)

As amostras de COL, COL/ERR, COL/ERR/6% VAN e COL/6% VAN foram analisadas por ^1H RMN para determinar o grau de reticulação. Utilizou-se um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio Bruker Avance, operando a 600 MHz para ^1H RMN. As amostras foram solubilizadas em óxido de deutério a 35°C. Os valores dos deslocamentos químicos (δ) foram referidos em ppm.

4.2.3.11 Antibiógrama

O ensaio microbiológico foi realizado pela técnica de difusão com discos (*Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI 2015*) e tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana das membranas frente a bactérias. Primeiramente, uma alça bacteriológica devidamente flambada e resfriada foi utilizada para suspender as diferentes colônias recentes

(18-24h) na solução salina estéril até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala *McFarland* (1×10^8 UFC/mL). Após este procedimento, foi molhado um *swab* estéril na suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e depois de retirado o seu excesso, foi aplicado ao longo da superfície do ágar em placa de Petri sem deixar qualquer falha. A esta placa, com o auxílio de uma pinça levemente flambada e fria, foi adicionado, com leve compressão, um disco com 10 µg de Gentamicina (controle) e as membranas de COL, COL/V (0,5% e 6% de vanilina), COL/ERR e COL/ERR/V (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) (cortadas com punch de 7 mm), tratadas previamente com luz UV. O processo de incubação na estufa bacteriológica se iniciou depois de dois minutos do acondicionamento dos discos sobre a placa, ocorrendo com as placas invertidas sob temperatura de 37°C por 48 h.

4.2.4 Estudo complementar da influência da variação de concentração de ERR

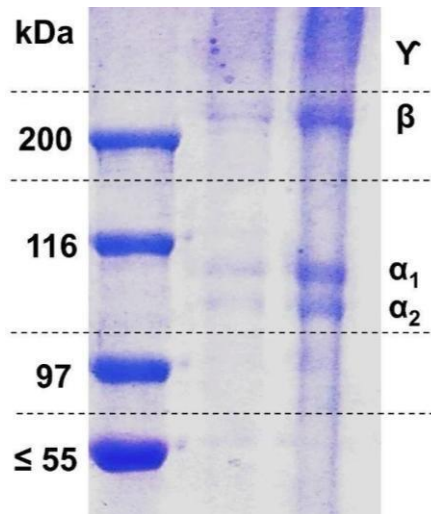
Para avaliar a influência da variação de ERR nas membranas de COL, foram realizadas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), ensaio de intumescimento e ensaio mecânico de tração. As membranas produzidas foram caracterizadas conforme descrito nos itens supracitados 4.2.3.5; 4.2.3.6 e 4.2.3.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eletroforese por SDS-PAGE

A eletroforese por SDS-PAGE foi realizada para verificar a presença das proteínas do COL em pó em quantidades distintas, sendo uma de 7 mg para caracterização do COL e outra de 1 g para comprovação das bandas proteicas. Foi possível observar que o COL apresenta as principais cadeias, sendo elas γ , β , α_1 e α_2 (Figura 12).

Figura 12- Eletroforese em gel do padrão de massa molar. Bandas do (A) marcador-padrão, (B) COL (7 mg) e (C) COL (1 g).

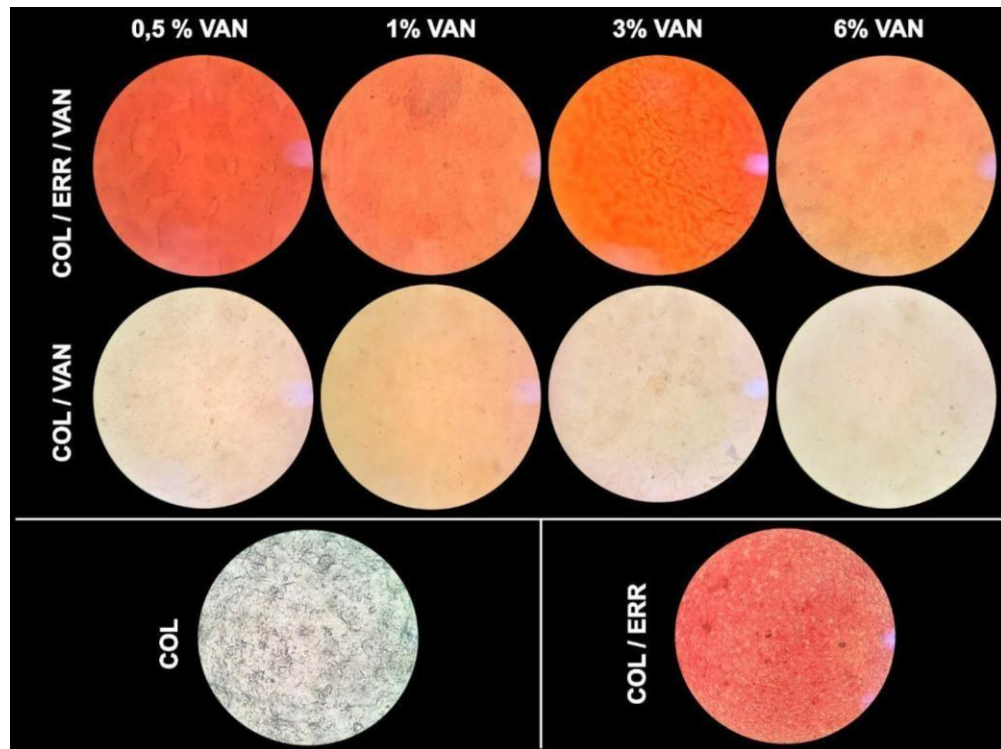


No gel de SDS-PAGE é possível observar pequenas bandas acima de 200 kDa referentes às cadeias γ formadas por heterotrímeros de cadeias α ($(\alpha_1)_2 \alpha_2$). Próximo à 200 kDa é possível observar uma intensa banda referente à cadeia β formada por um dímero de cadeias α . Em torno de 116 kDa, o gel apresenta duas bandas relativas às α -hélices: uma mais intensa, que corresponde à cadeia α_1 , e outra menos intensa correspondente à cadeia α_2 . Tal perfil indica que o COL utilizado neste trabalho apresenta as bandas características de COL tipo 1, conforme observado por Kuwahara (2021) e Rodrigues (2023).

5.2 APARÊNCIA MICROSCÓPICA DAS MEMBRANAS

As membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (com 0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) foram analisadas no microscópio óptico para avaliar a aparência microscópica. A análise evidenciou a distribuição homogênea do ERR, conforme a Figura 13.

Figura 13- Microscopia óptica das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (lente objetiva de 4x).

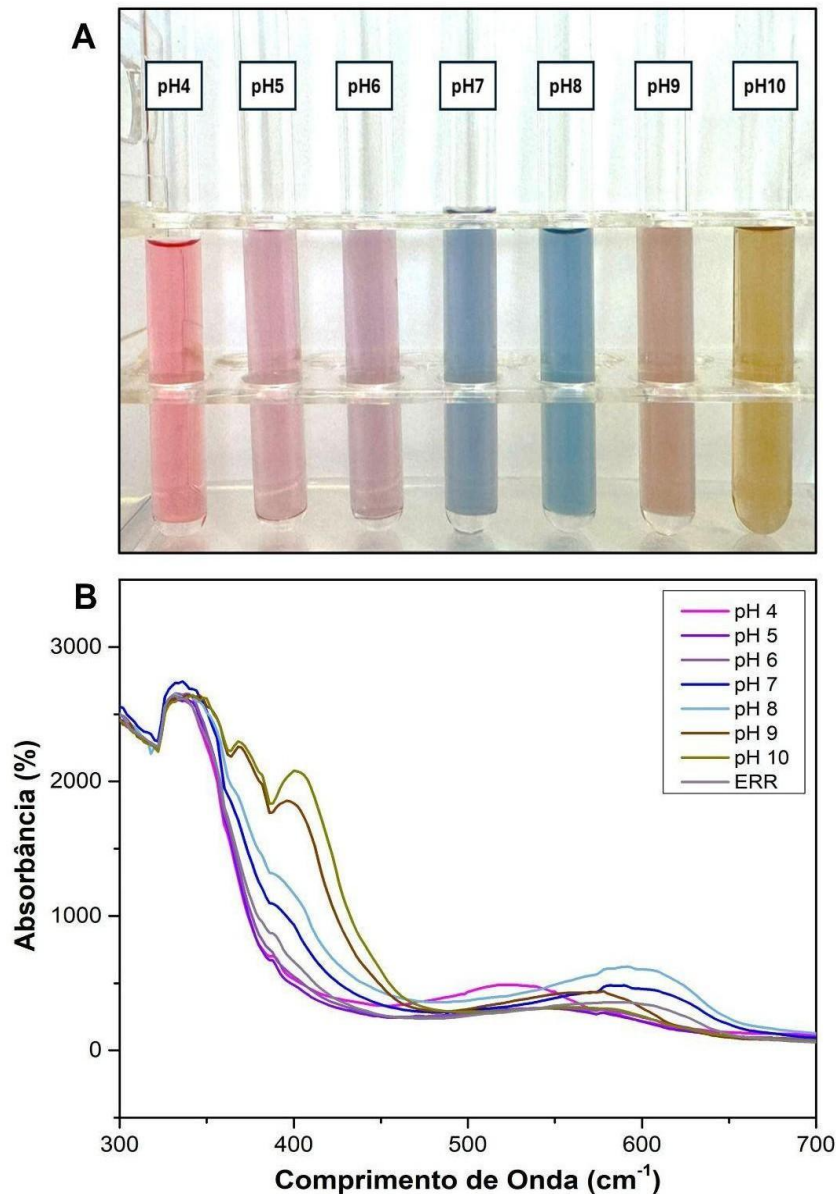


Por meio da microscopia óptica, observou-se que as membranas de COL contendo ERR apresentaram uma distribuição homogênea do extrato ao longo da matriz colágena. Esta homogeneidade é essencial para garantir a consistência nas propriedades físico- químicas da membrana, bem como sua eficácia em possíveis aplicações biomédicas, como *smart wound dressing* (Reddy, Narendra; Reddy, Roopa; Jiang, Qiuran 2015).

5.3 ANÁLISE POR UV-VIS DO EXTRATO DE REPOLHO ROXO (ERR)

A Figura 14 apresenta as diferentes colorações de amostras de ERR em função dos valores de pH e os respectivos espectros de UV-Vis para cada amostra.

Figura 14- Indicação de pH pelo ERR. (A) ERR em tampões na faixa de pH de 4-10. (B) Espectros de UV-vis do ERR.



Verifica-se que em meio ácido, nos pHs 4 e 5, a cor mudou de rosa para lilás à medida que o pH aumentou (Figura 14A), os quais tiveram absorvância entre 522 nm e 540 nm (Figura 14B), indicando a presença do cátion flavílio vermelho e base quinoidal do ERR (Arafa *et al.*, 2021). À medida que o pH aumentou para valores de 6 a 8, e as cores mudaram de violeta para azul claro, os picos de absorvância aumentaram para 590 nm, indicando a presença da pseudobase do carbinol incolor e também das chalconas amarelas das antocianinas (Saveski *et al.*, 2015). Quando o pH atinge valores de 9 e 10 são observados o aparecimento de picos em 368 nm e 400 nm, além do pico em 560 nm, que está associado com a instabilidade natural das antocianinas em meio alcalino (Arafa *et al.*, 2021).

5.4 RESPOSTA COLORIMÉTRICA DO *SMART WOUND DRESSING*

A Figura 15 apresenta a fotografia das membranas compostas por COL/ERR/VAN evidenciando a mudança de cor em função da variação do pH.

Figura 15- Resposta colorimétrica das membranas de COL/ERR/VAN em diferentes pHs (4 a 10).



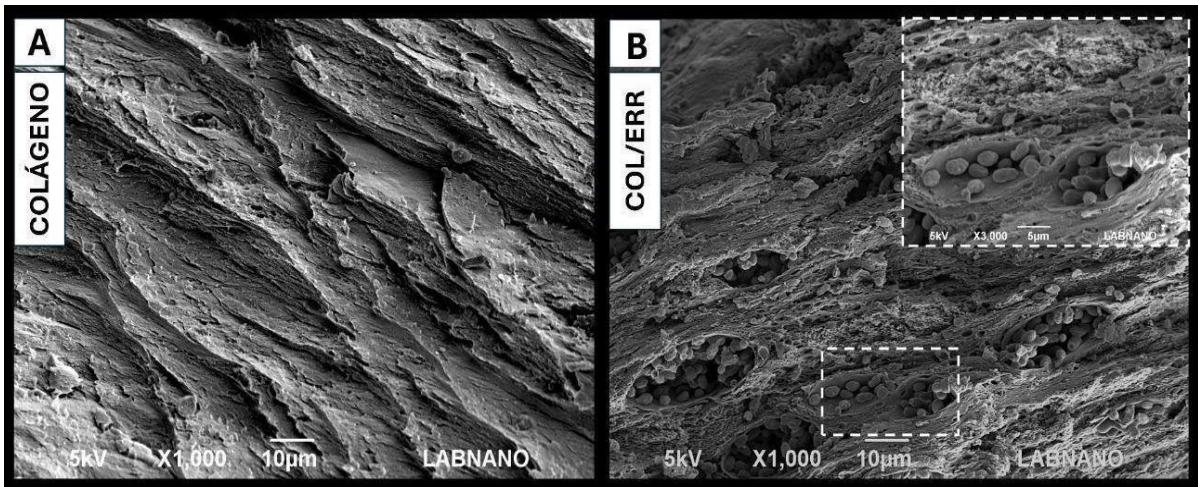
A avaliação do potencial indicador de pH da membrana evidenciou que o COL e a VAN mesmo tendo a cor amarelada não interferiram na capacidade de mudança colorimétrica do ERR. Em pH ácido (4 e 5) a membrana passou de rosa para lilás. Em pH neutro (6 e 7) a membrana passou de roxo escuro para azul escuro. Por fim, quando o pH foi tornando-se alcalino (8 a 10) a membrana adquiriu colorações esverdeadas. Dessa forma, a membrana COL/ERR/VAN possui potencial para ser utilizada como curativo para monitorar o estado de feridas como queimaduras, inclusive alertar quando há infecção presente na ferida.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Figura 16 apresenta eletromicrografias da superfície de fratura das membranas de COL e COL/ERR.

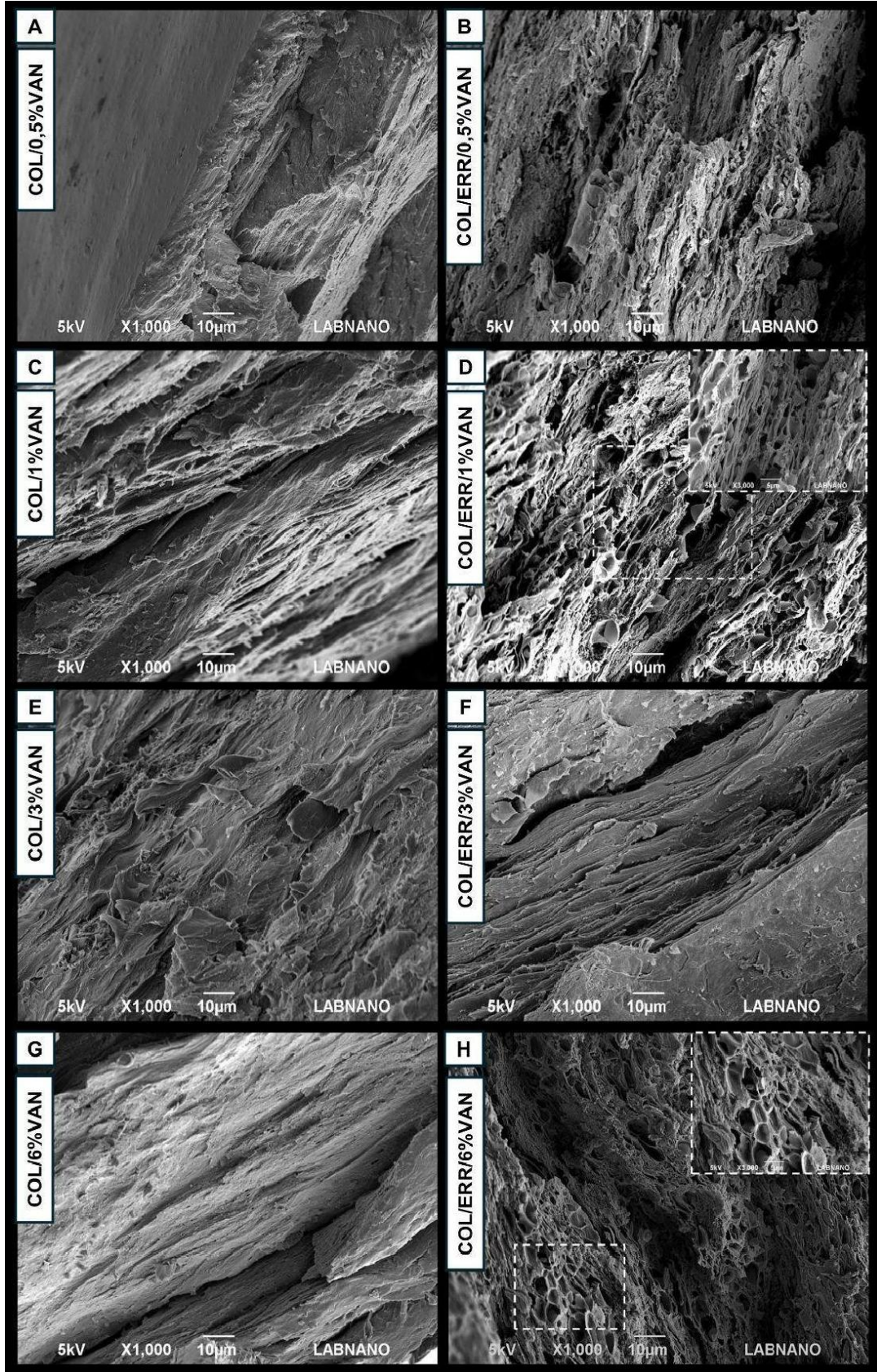
A membrana de COL (Figura 16A) apresenta fibras compactadas com morfologia alinhada e densa, evidenciando uma organização homogênea da matriz colágena. Da mesma forma, a membrana de COL/ERR (Figura 16B) apresenta semelhança nas fibras alinhadas e compactadas do COL, além de partículas de maltodextrina impregnadas com antocianinas de ERR na forma de microesferas como reportado no estudo de Machado (2022), sugerindo uma distribuição homogênea do ERR no COL.

Figura 16- Micrografias de MEV da superfície da fratura das membranas. (A) COL e (B) COL/ERR (Aumento: x1000, x3000 na área ampliada).



A Figura 17 apresenta as micrografias de MEV da superfície da fratura das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). Nas Figuras 17A, 17C, 17E e 17G pode-se observar as micrografias das membranas de COL/VAN que exibem uma morfologia semelhante entre si e em comparação ao COL (Figura 17A), conforme também foi encontrado na caracterização do COL não reticulado realizada por Fan *et al.* (2024). À medida que a concentração de VAN aumenta, pode-se notar um aumento na densidade das fibras colágenas de acordo com o trabalho de reticulação de COL com genipina de Zhang *et al.* (2014), podendo-se, portanto, atribuir a alteração da densidade das fibras alinhadas à reticulação do COL.

Figura 17- Micrografias de MEV da fratura das membranas. (A), (C), (E) e (G) COL/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente) e (B), (D), (F) e (H) COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente). (Aumento: x1000, x3000 na área ampliada).



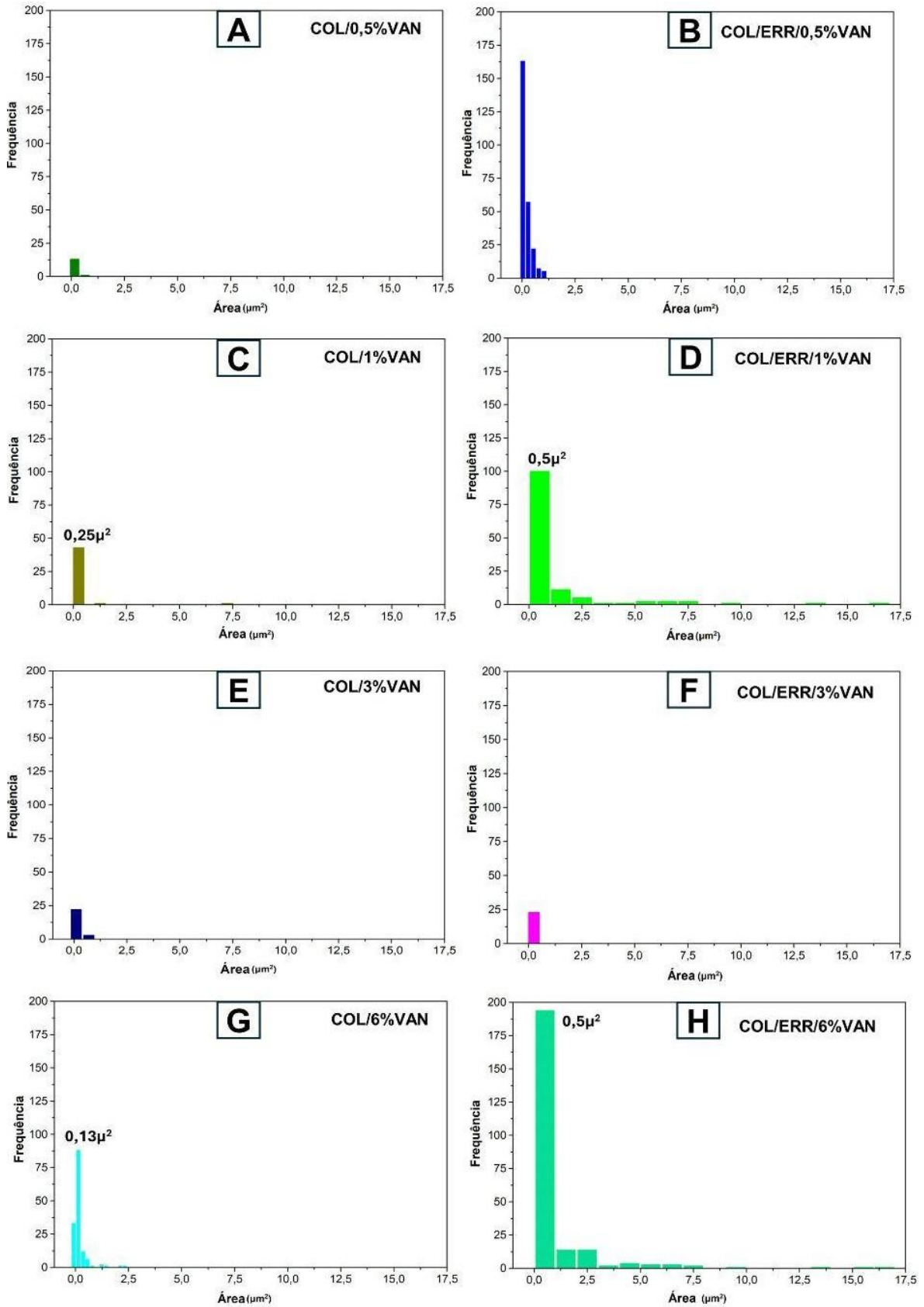
Para a membrana de COL/ERR/0,5% VAN, as fibras de COL apresentaram uma densidade menor em relação ao COL puro. Contudo, é possível observar a incidência de alguns poros, bem como identificar estruturas porosas tridimensionais (Scaffold). Nas membranas de COL/ERR/VAN (1% e 6%), a porosidade do COL aumentou conforme a concentração de VAN aumentou, formando fibras interconectadas. Embora a membrana de COL/ERR/3% VAN tenha apresentado alguma incidência de poros, apresentou também um rompimento das fibras colágenas, dificultando sua análise.

Diferentemente do que foi observado na membrana de COL/ERR (Figura 16B), nas membranas de COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina) não há microesferas de ERR, embora as membranas tenham a coloração do ERR (Figura 13). Isso foi atribuído a adição de VAN dissolvida no etanol, uma vez que o etanol como um solvente fenólico aumenta a solubilização de compostos fenólicos (VAN e a antocianina do ERR) (Ghareaghajlou; Hallaj-Nezhadi; Ghasempour, 2022).

A presença de VAN nas membranas de COL/VAN (0,5%, 1% e 6% de vanilina) (Figuras 18A, 18C e 18G) e COL/ERR/VAN (1% e 6% de vanilina) (Figuras 17D e 17H) favoreceu maior frequência na formação de poros, conforme aumentou a concentração de VAN, exceto nas membranas com COL/3% VAN (Figura 17E) e COL/ERR/0,5% VAN e COL/ERR/3% VAN (Figuras 18B e 18F, respectivamente). Possivelmente a concentração de 0,5% VAN não é suficiente para a reticulação do COL como observado por Zhang *et al.* (2015) em seu estudo de melhoramento das propriedades mecânicas da quitosana por meio da reticulação com VAN. Já as membranas de 3% VAN apresentaram rompimento das fibras colágenas, como pode ser observado na Figura 16E, influenciando consideravelmente na sua estrutura.

Na análise quantitativa de poros, as membranas de COL/ERR/VAN apresentaram maior frequência de poros comparadas às membranas de COL/VAN (Figura 18).

Figura 18- Histogramas das membranas de COL/VAN e COL/ERR/VAN. (A), (C), (E) e (G) COL/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente) e (B), (D), (F) e (H) COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3%, 6% de vanilina, respectivamente).



Levando em consideração a possibilidade de reticulação das membranas de COL/VAN e COL/ERR/VAN (1% VAN e 6% VAN das respectivas membranas) é possível observar a partir dos histogramas que o tamanho dos poros das membranas de COL/ERR/VAN foram mais homogêneos em comparação com o COL/VAN, sendo $0,5\mu^2$ para ambas COL/ERR/1%VAN e COL/ERR/6%VAN enquanto que para COL/1%VAN e COL/6%VAN foram $0,25\mu^2$ e $0,13\mu^2$, respectivamente, sugerindo que o ERR também teve um papel importante na reticulação do COL. Segundo Musso; Salgado; Mauri (2019) em seu estudo de preparos de filmes de gelatina, o ERR favoreceu a reticulação das proteínas. Com relação à heterogeneidade dos poros, quanto maior a heterogeneidade dos poros menor o grau de reticulação (Martins, Talita., 2017).

Para que se tenha mais evidências sobre a eficiência da reticulação é necessária a correlação do resultado com mais técnicas que forneçam informações sobre o grau de reticulação por meio das propriedades mecânicas, capacidade de intumescimento e características químicas das membranas.

5.6 ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO

O ensaio mecânico de tração foi realizado nas membranas de COL, COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente), COL/ERR, COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente) para avaliar as propriedades mecânicas das membranas, como resistência à tração. A Figura 19 e a tabela 3 apresentam os resultados obtidos para o ensaio de tração.

Figura 19- Gráficos de ensaio mecânico de tração das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente) e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina, respectivamente). (A) Alongamento (%), (B) Módulo de Young (MPa) e (C) Tensão Máxima (MPa).

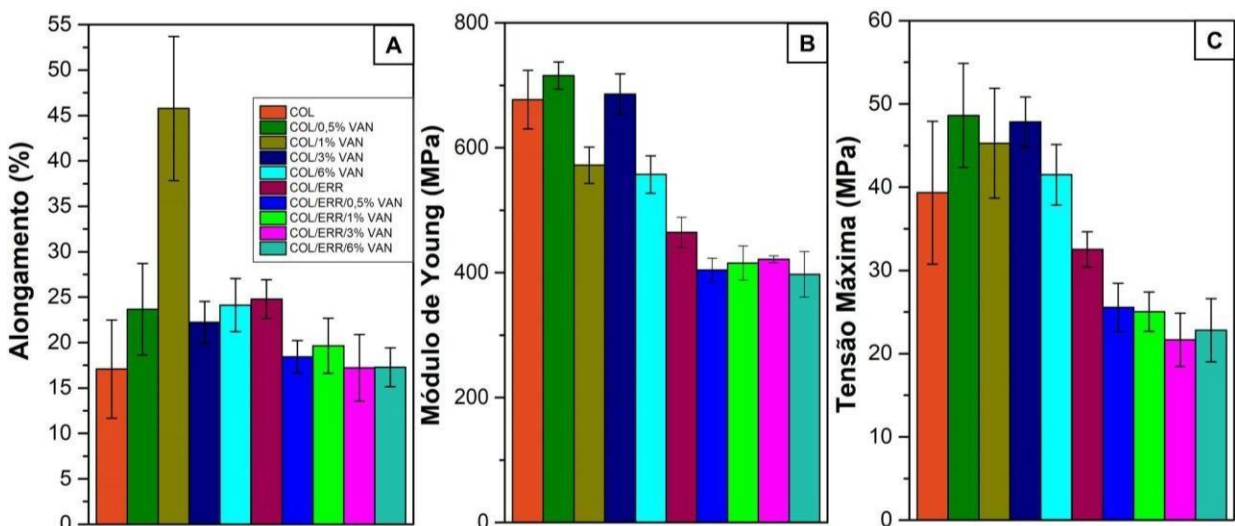


Tabela 3- Valores médios e respectivos desvios padrão do alongamento (%), módulo de Young e tensão máxima das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN e COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).

Amostras	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)	Tensão Máxima (MPa)
COL	17,09 ± 5,41	677,2 ± 46,92	39,33 ± 8,59
COL/0,5% VAN	23,67 ± 5,04	715,6 ± 21,74	48,61 ± 6,25
COL/1% VAN	45,77 ± 7,94	572,02 ± 29,01	45,28 ± 6,59
COL/3 % VAN	22,24 ± 2,3	685,84 ± 32,55	47,83 ± 3,01
COL/6%VAN	24,13 ± 2,92	557,11 ± 29,86	41,49 ± 3,63
COL/ERR	24,8 ± 2,14	464,35 ± 24,35	32,52 ± 2,12
COL/ERR/0,5% VAN	18,44 ± 1,8	404,14 ± 18,84	25,55 ± 2,9
COL/ERR/1% VAN	19,64 ± 3,03	415,35 ± 27,53	25,03 ± 2,36
COL/ERR/3% VAN	17,24 ± 3,67	421,17 ± 5,57	21,65 ± 3,2
COL/ERR/6% VAN	17,3 ± 2,14	397,39 ± 36,4	22,82 ± 3,8

O ensaio mecânico realizado demonstrou o impacto significativo da adição de ERR e VAN nas propriedades mecânicas das membranas de COL. Observou-se que o COL apresentou um alongamento de $17,09 \pm 5,41\%$, módulo de Young de $677,2 \pm 46,92$ MPa e tensão máxima de $39,33 \pm 8,59$ MPa (Figura 19A, 19B e 19C e tabela 3), valores que refletem sua elasticidade e resistência intrínsecas. Nas membranas composta por COL/0,5% VAN, a adição da VAN aumentou o alongamento para $23,67 \pm 5,04\%$ (Figura 19A), enquanto que o módulo de Young foi levemente elevado para $715,6 \pm 21,74$ MPa (Figura 19B) e a tensão máxima para $48,61 \pm 6,25$ MPa (Figura 19C). Esses resultados indicam que a reticulação inicial causada pela VAN fortalece a matriz de COL sem comprometer sua elasticidade.

Por outro lado, a concentração de 1% de VAN (COL/1% VAN), resultou em um aumento expressivo no alongamento ($45,77 \pm 7,94\%$), acompanhado por uma redução no módulo de Young ($572,02 \pm 29,01$ MPa) (Figura 19A e 19B e tabela 3). Esses resultados sugerem que, em concentrações moderadas, a VAN favorece a mobilidade molecular, promovendo maior deformação antes do rompimento. No entanto, concentrações superiores (3% e 6% de VAN) resultaram em redução tanto do alongamento ($22,24 \pm 2,3\%$ e $24,13 \pm 2,92\%$, respectivamente) quanto da tensão máxima ($47,83 \pm 3,01$ MPa e $41,49 \pm 3,63$ MPa, respectivamente) (Figura 19A e 19C e tabela 3), possivelmente devido a uma reticulação excessiva que limita a deformabilidade da matriz (Kamml, Julia; Acevedo, Claire; Kammer, David S., 2024).

As membranas contendo ERR apresentaram um resultado distinto. A membrana de COL/ERR exibiu alongamento máximo superior ao COL ($24,8 \pm 2,14\%$) (Figura 19A e tabela

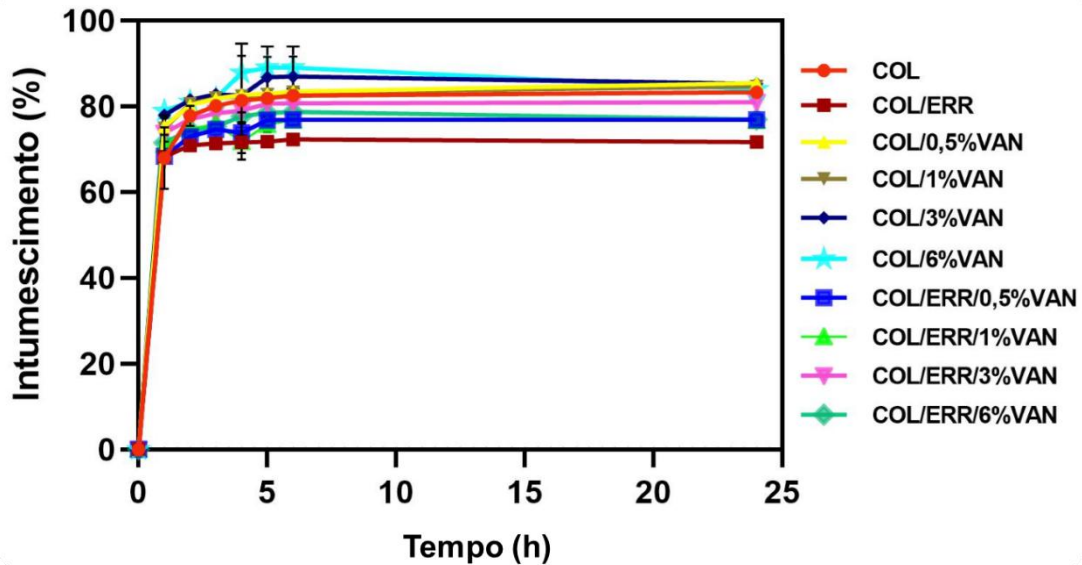
3), mas o módulo de Young foi limitado a $464,35 \pm 24,35$ MPa (Figura 19B e tabela 3). Além disso, a tensão máxima ($32,52 \pm 2,12$ MPa) também foi inferior em comparação ao COL, indicando que o ERR introduz fragilidade à membrana. Esse efeito foi ainda mais evidente nas membranas contendo ERR e VAN (COL/ERR/VAN), nas quais os valores de módulo de Young e tensão máxima diminuíram progressivamente com o aumento da concentração de VAN, atingindo mínimos na COL/ERR/6% VAN de $17,3 \pm 2,14\%$ de alongamento, $397,39 \pm 36,4$ MPa de módulo de Young e $22,82 \pm 3,8$ MPa de tensão máxima (Figura 19A, 19B e 19C e tabela 3).

Contudo, a redução do alongamento, módulo de Young e tensão máxima nas membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN está relacionado à alteração na organização e estruturação da matriz colágena durante o processo de reticulação. Embora a VAN tenha sido utilizada como agente reticulante, a interação química entre os grupos fenólicos das antocianinas do repolho roxo e as moléculas de COL gerou uma rede menos ordenada (Kamml, J.; Acevedo, C.; Kammer, D. S., 2024). Estudos indicam que reticulações desorganizadas podem surgir devido à competição entre agentes reticulantes ou à distribuição heterogênea dos grupos reativos. Esse processo leva à formação de redes densas, que enrijecem as fibrilas de COL durante a reticulação, reduzindo a capacidade do material de se deformar e tornando a membrana mais quebradiça (Martins, Talita., 2017; Kamml, J.; Acevedo, C.; Kammer, D. S., 2024). É importante ressaltar que a diminuição das propriedades mecânicas não significa ausência de reticulação. O processo de reticulação ocorreu, mas de forma menos eficiente no que diz respeito à formação de uma rede tridimensional homogênea. A redução das propriedades mecânicas no ensaio de tração indica reticulação com cadeias desorganizadas e densas, mas não interferem na utilização da membrana para o fim previsto.

5.7 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

O ensaio de intumescimento tem por finalidade avaliar a capacidade do material de absorver o solvente no qual ele está imerso. A Figura 20 apresenta o gráfico de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina), imersas em PBS (5 mL).

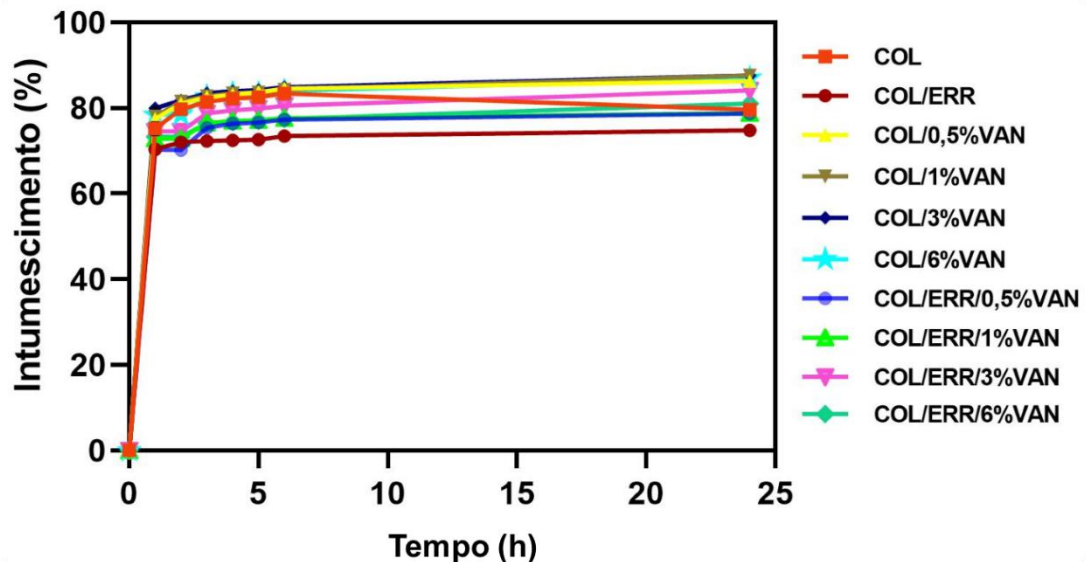
Figura 20- Dados de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) imersas em 5 mL de PBS.



As membranas apresentaram uma capacidade de intumescimento nas primeiras 6h e estabilizaram nas horas seguintes. A membrana de COL obteve cerca de 78% de intumescimento, enquanto as membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) obtiveram cerca de 83% de intumescimento. Já as membranas de COL/ERR/VAN variaram de 73% a 78% de intumescimento.

A Figura 21 apresenta o ensaio de intumescimento simulando o contato das membranas com o exsudato (500 μ L de PBS – pH 7,2).

Figura 21- Intumescimento com a média de exsudato (PBS) das membranas de COL, COL/ERR, COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).



O intumescimento das membranas da simulação foi semelhante ao das membranas imersas. A membrana de COL obteve cerca de 80% de intumescimento, enquanto as membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) obtiveram cerca de 82% de intumescimento. Já as membranas de COL/ERR/VAN apresentaram menor intumescimento, variando de 74% a 77%, atribuído à reticulação do COL o que corrobora com os resultados de MEV no qual foi possível observar maior grau de organização das fibras colágenas nas membranas de COL contendo VAN e ERR (Castro *et al.*, 2017).

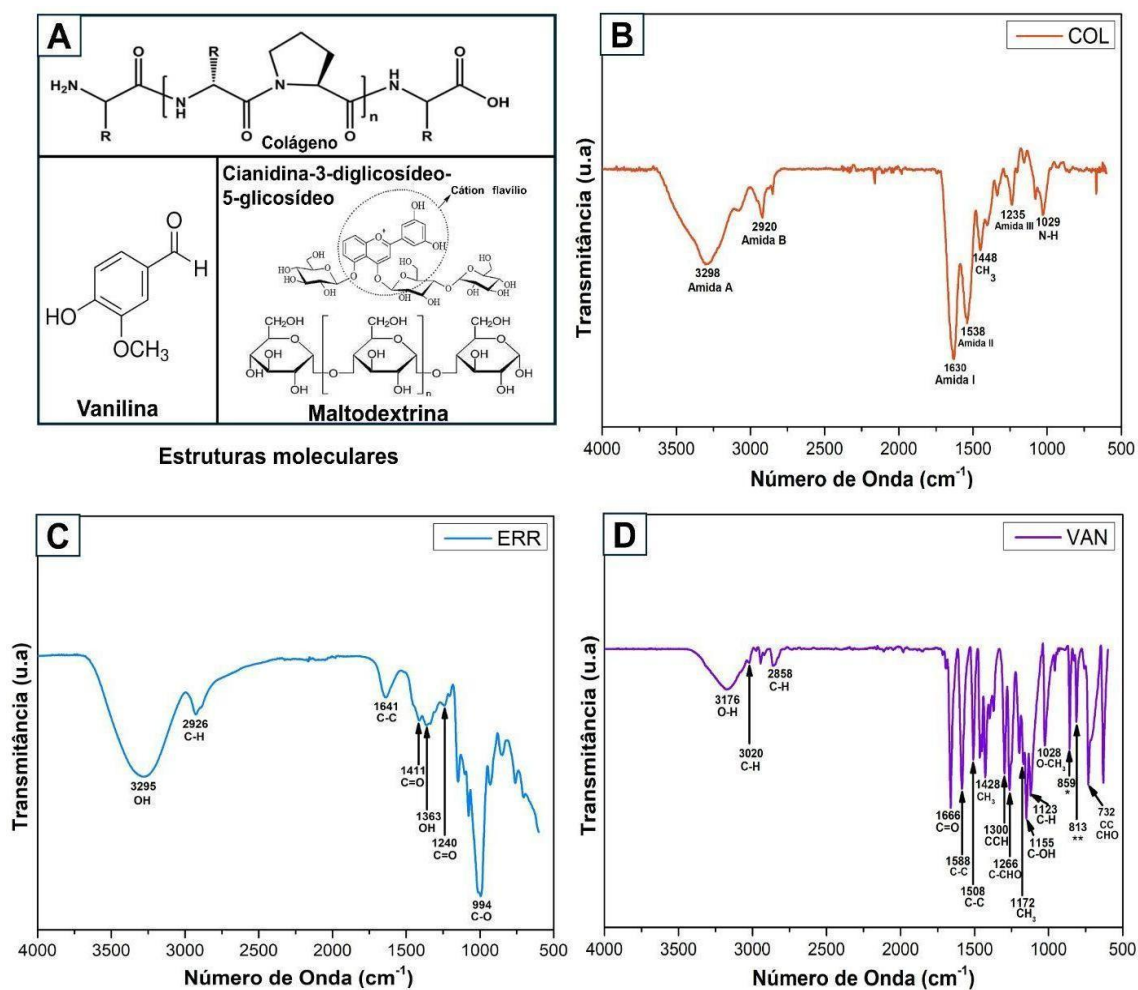
O menor intumescimento observado nas membranas contendo o ERR (COL/ERR e COL/ERR/VAN) está relacionado à reticulação das fibras colágenas mas também com o aumento do ambiente hidrofóbico ocasionados pela presença das antocianinas do ERR (Shi, S. *et al.*, 2023), o que explicaria o menor intumescimento da membrana COL/ERR. Por outro lado, a VAN juntamente com o ERR fornecem características distintas à membrana quando associadas, uma vez que as membranas de COL/ERR/VAN têm uma taxa de intumescimento média, evidenciando o efeito da reticulação que ambos, VAN e ERR, conferem à membrana, e não somente devido ao aumento do ambiente hidrofóbico na membrana.

No estudo de Rekulapally *et al.* (2021) as amostras de COL reticuladas com goma arábica obtiveram menor grau de intumescimento conforme aumentou o grau de reticulação proporcional ao aumento de goma arábica. De fato, o grau de intumescimento é inversamente proporcional ao grau de reticulação, uma vez que a reticulação melhora as propriedades físicas do COL. O moderado grau de intumescimento obtido está em consonância com o esperado para membrana desenvolvida neste trabalho, dado que a membrana de COL/ERR/VAN concomitantemente precisa ser estruturada e capaz de absorver exsudato.

5.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Figuras 22A, 22B e 22C apresentam os espectros obtidos por FTIR, os quais mostraram bandas características das amostras de COL, ERR e VAN. Além disso, a Figura 22A mostra as estruturas moleculares destes compostos e também da maltodextrina que foi utilizada para liofilização do ERR, sendo ela um polissacarídeo rico em dextrose (Kong *et al.*, 2018). O COL tipo I é composto por duas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formadas por cadeias polipeptídicas ricas em prolina (Mecham, 2012). Para a reticulação do COL foi utilizada a VAN, um composto do grupo dos fenóis, grupo este ao qual também pertencem as antocianinas presentes no ERR (Machado *et al.*, 2022).

Figura 22- Estruturas moleculares e espectros de FTIR. (A) Estruturas moleculares do colágeno, vanilina, Cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo (repolho roxo) e maltodextrina. Espectros de FTIR de (B) COL, (C) ERR e (D) VAN (* e ** Ar-H de compostos aromáticos 1, 2, 4-trissubstituídos).



Na Figura 22B referente a amostra de COL, a banda observada em 3298 cm⁻¹ é atribuída à amida A, que está relacionada às vibrações de estiramento da ligação N-H. Em 2920 cm⁻¹, encontra-se a banda referente à amida B, que reflete as vibrações de estiramento assimétrico e simétrico das ligações CH₃ e CH₂, conforme descrito por Riaz (2018) e Shanmugasundaram *et al.* (2001). A banda observada em 1630 cm⁻¹, é atribuída à amida I e está associada ao estiramento da carbonila (C=O). Em 1538 cm⁻¹, a banda é correspondente à amida II, relacionada às vibrações de deformação da ligação N-H e estiramento da ligação C-N (Riaz *et al.*, 2018; Stani *et al.*, 2020). As vibrações dos anéis pirrolidínicos foram detectadas na banda de 1448 cm⁻¹ (deformação angular assimétrico de CH₃), que corresponde à estereoquímica desses anéis presentes na hidroxiprolina e prolina do COL (Júnior *et al.*, 2015). A banda em 1235 cm⁻¹ corresponde à amida III, associada às vibrações combinadas do estiramento C-N e deformação N-H. Além disso, a banda em 1029 cm⁻¹ é indicativa das deformações da ligação N-H e de absorções C-O-C na estrutura do COL (Stani *et al.*, 2020). A

presença dessas bandas no espectro confirma que a estrutura peptídica do COL tipo I foi preservada, evidenciando a manutenção da integridade das cadeias peptídicas.

Esses resultados são consistentes com os achados na literatura. Por exemplo, Gelse *et al.* (2003) relatam bandas similares para COL tipo I, destacando a importância das bandas em torno de 3300 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} para a identificação das estruturas amídicas. A preservação das bandas das amidas I, II e III é indicativa da estabilidade estrutural das cadeias peptídicas (Gil, 2013).

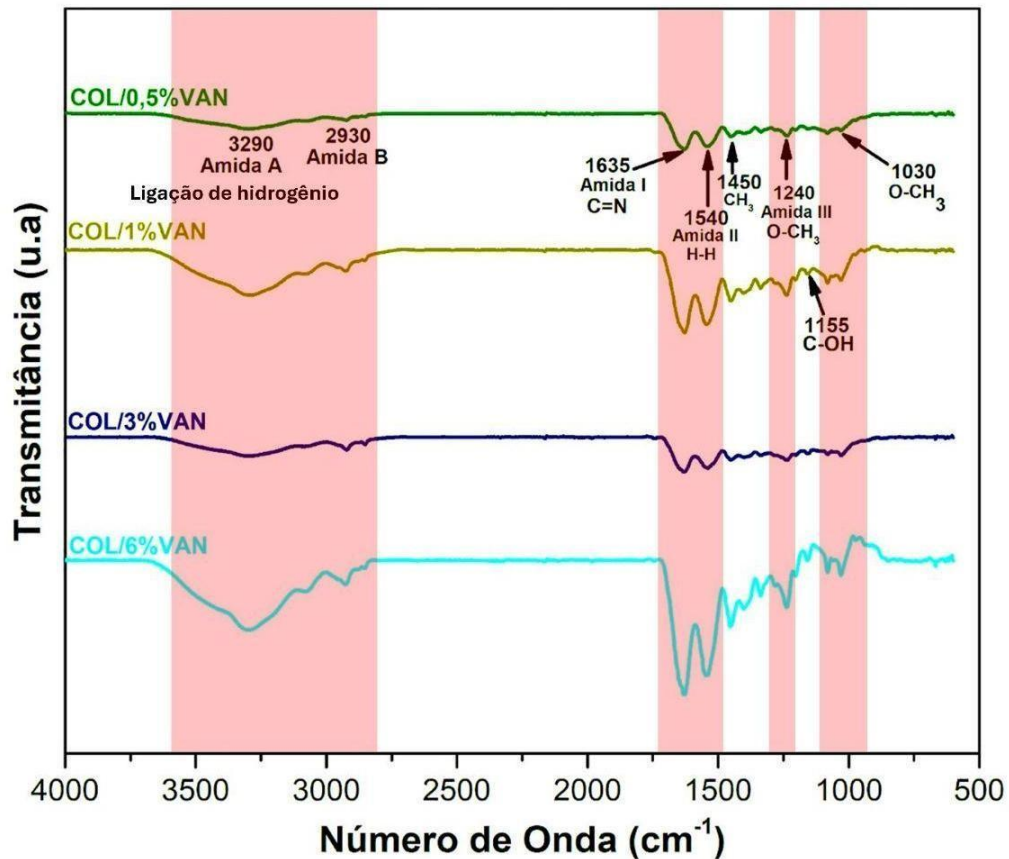
No espectro do ERR (Figura 22C) foi observada uma banda em 3295 cm^{-1} que está associada ao estiramento dos grupos OH que foi atribuído à presença de água livre, bem como aos grupos fenólicos e alcoólicos presentes nos extratos vegetais. A largura e a intensidade desta banda são indicativas da quantidade de água e dos compostos fenólicos, refletindo a umidade do extrato e a concentração de polifenóis, como as antocianinas. A banda em 2926 cm^{-1} é referente ao estiramento das ligações C-H alifáticas, associadas aos grupos CH_2 e CH_3 . A banda em 1641 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-C dos compostos aromáticos. Esta banda está associada aos anéis aromáticos das antocianinas, que são um dos principais componentes bioativos do repolho roxo (Machado *et al.*, 2022). As bandas encontradas em 1411 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} estão associadas à deformação angular C=O de compostos fenólicos. A banda em 1363 cm^{-1} se refere a deformação no plano de OH que ocorre em polifenóis presentes nas antocianinas (Seke *et al.*, 2022). Essas bandas são indicativas da presença de grupos fenólicos conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Machado *et al.*, 2022). A banda na região de 994 cm^{-1} está associada ao estiramento da ligação C-O dos grupos C-O-C presentes nos anéis anidroglicose da maltodextrina (Wu *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2022).

No espectro da VAN (Figura 22D), a banda em 3176 cm^{-1} , corresponde ao estiramento axial OH do grupo fenólico, essencial para a reatividade e formação de ligações de hidrogênio, o que possibilita a reticulação do COL (Sapula; Bialik-Wąs; Malarz, 2023). A banda em 3020 cm^{-1} é atribuída ao estiramento axial C-H dos compostos aromáticos, confirmando a presença do anel benzênico da estrutura da VAN. A banda em 2858 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-H do grupo aldeído. A banda intensa em 1666 cm^{-1} , característica do estiramento C=O do grupo aldeído. As bandas em 1588 cm^{-1} e 1508 cm^{-1} são indicativas do estiramento C-C aromático no anel benzênico. A banda em 1428 cm^{-1} está associada ao estiramento assimétrico CH_3 do grupo metóxi (O- CH_3). Banda em 1300 cm^{-1} associada à deformação angular assimétrica CCH do anel (Medeiros, 2014). A banda em 1266 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-CHO do grupo aldeído presente na VAN (Medeiros, 2014; Da Silva *et al.*, 2022). Em 1172 cm^{-1} está associada à deformação angular CH_3 do grupo metóxido (Medeiros, 2014).

A banda em 1155 cm^{-1} é característica do estiramento da ligação C-OH do grupo fenol da VAN responsável por suas propriedades antioxidantes (Silva *et al.*, 2023; Medeiros, 2014). Banda em 1123 cm^{-1} associada à deformação angular C-H no plano, a banda em 1028 cm^{-1} é referente ao grupo metóxi (O-CH₃) presente na VAN (Medeiros, 2014; Da Silva *et al.*, 2022). Bandas em 859 cm^{-1} e 813 cm^{-1} referem-se ao estiramento Ar-H de compostos aromáticos 1, 2, 4-trissubstituídos, confirmando a substituição específica no anel benzênico (Karakurt *et al.*, 2021; Medeiros, 2014). A banda em 732 cm^{-1} é referente à deformação angular C-C(CHO) fora do plano, pertinente ao grupo aldeído. Esses resultados são consistentes com a literatura existente sobre a análise de FTIR da VAN (Da Silva *et al.*, 2022; Medeiros, 2014; Karakurt *et al.*, 2021). As bandas descritas estão apresentadas na Figura 23.

A Figura 23 apresenta os espectros de FTIR das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). O efeito da adição de VAN pode ser observado nos espectros das membranas de COL/1%VAN e COL/6%VAN, nos quais há um aumento da intensidade na banda em 1155 cm^{-1} , que está relacionada ao fenol (C-OH) presente na VAN. Além disso, há aumento nas bandas das membranas de COL/0,5%VAN, COL/1%VAN e COL/6%VAN em 1030 cm^{-1} que está associada à sobreposição das bandas referentes tanto ao N-H do COL, como ao grupo metóxi (O-CH₃) presente na VAN (Medeiros, 2014). Levando em consideração os grupos fenol e metóxi, o aumento na intensidade destas bandas sugere que a VAN esteja contribuindo ao perfil espectral das membranas. Isso não foi observado na membrana de COL/3%VAN, visto que a mesma apresentou um rompimento das fibras colágenas, que pode ser observado no MEV (Figura 17E).

Figura 23- Espectros de FTIR das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).



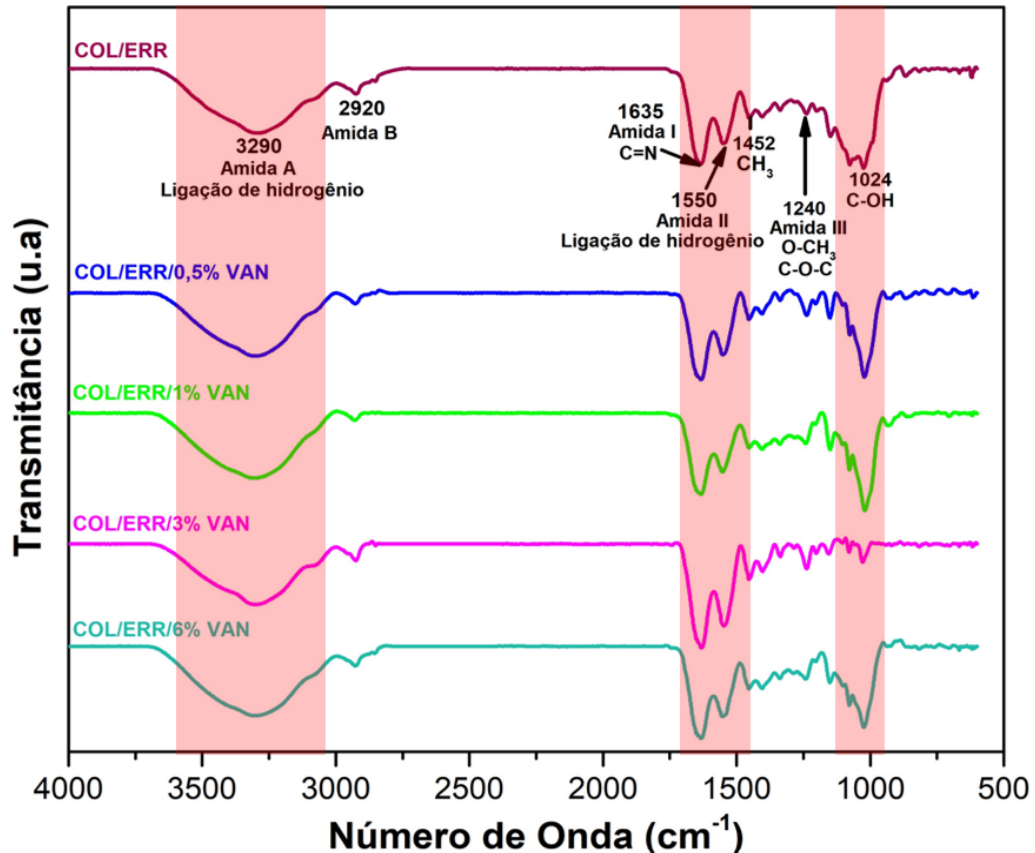
Analisando as bandas das membranas de COL/0,5% VAN, COL/1% VAN e COL/6% VAN é possível observar que as principais bandas relacionadas às amidas do COL (Amida A, I, II e III) (Kudo; Nakashima, 2020; Riaz *et al.*, 2018) (em 3290 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , respectivamente) e grupo metil (CH_3) (em 1450 cm^{-1}), que é correspondente aos anéis presentes na hidroxiprolina e prolina do COL (Júnior *et al.*, 2015), permaneceram inalteradas com relação ao desaparecimento ou deslocamentos de bandas. Já na banda da amida B em 2930 cm^{-1} pode-se observar um deslocamento com relação a amida B do COL (puro), o que indica alterações na estrutura do COL ou ainda formação de imina ($\text{C}=\text{N}$) a partir da interação do COL com a VAN (Knöpke *et al.*, 2010). É importante ressaltar que algumas bandas apresentam aumento em sua intensidade conforme aumenta a concentração de VAN. A banda em 1240 cm^{-1} apresentou um aumento em sua intensidade, correspondendo à sobreposição das bandas referentes à amida III e grupo metóxi (Nastasiienko *et al.*, 2021; Kudo; Nakashima, 2020).

Além disso, este aumento da intensidade está relacionado com a possível formação de éster fenólico (C-O-C) a partir da ligação entre a OH fenol da VAN e grupo COOH do COL, indicando reticulação do COL pela VAN, o que pode ser confirmado mais adiante com a técnica de ^1H RMN.

Ao comparar os espectros de COL/VAN (0,5%, 1% e 6%) com o espectro da VAN (pura) também é possível observar que esta banda está sobreposta a banda 1266 cm^{-1} (C-CHO do grupo aldeído). Também é possível observar um aumento na intensidade das bandas em 3290 cm^{-1} da amida A e 1540 cm^{-1} da amida II relacionado a uma sobreposição das bandas das amidas com as bandas de ligações de hidrogênio provenientes da interação química entre o grupo hidroxila do fenol da VAN e a amina do COL (Hidayati *et al.*, 2021; Nandiyanto; Oktiani; Ragadhita, 2019). Já na banda em 1635 cm^{-1} pode-se observar um aumento gradual referindo-se a sobreposição da banda da amida I com a banda da imina (C=N) formada pela base de Schiff na modificação química que ocorre da ligação entre o aldeído da VAN e a amina do COL (Hidayati *et al.*, 2021; Al-Shuja'a *et al.*, 2017). Segundo Hidayati *et al.* (2021), a reticulação de proteínas pela VAN pode acontecer por meio de interações e modificações químicas como ocorrem nas ligações de hidrogênio e formação do grupo imina, respectivamente, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho na reticulação do COL com a VAN.

A Figura 24 apresenta os espectros das membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).

Figura 24- Espectros de FTIR das membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).



Nas membranas com ERR, as bandas em 3290 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} foram mantidas nos espectros, embora não seja possível observar um aumento gradual com adição da VAN como foi observado na Figura 16. Entretanto, a banda em 3290 cm^{-1} , relacionada tanto a amida A do COL, quanto às ligações de hidrogênio (Hidayati *et al.*, 2021), se mostra mais intensa em todos os espectros em comparação com a Figura 24, indicando novas ligações de hidrogênio, provindas da interação do COL com a cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo, evidenciando que o ERR também possa estar atuando como reticulador natural (Kossyvakí, D. *et al.* C, 2022), confirmando a análise de MEV (Figura 17). A semelhança na alta intensidade da banda em 3290 cm^{-1} em todos os espectros (Figura 18), relacionada ao fato de não ter sido variada a concentração de ERR, uma vez que este teria neste trabalho apenas a função de indicador de pH e não de reticulador, embora com essas análises há evidências da função do ERR também como reticulador.

A banda em 1550 cm^{-1} está relacionada ao deslocamento da banda referente à amida II (na região de 1540 cm^{-1}) e ligações de hidrogênio observadas nas membranas de COL e COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina), respectivamente. O deslocamento está relacionado a novas ligações de hidrogênio (Ryu *et al.*, 2018) resultantes do processo de

reticulação causado pelo ERR.

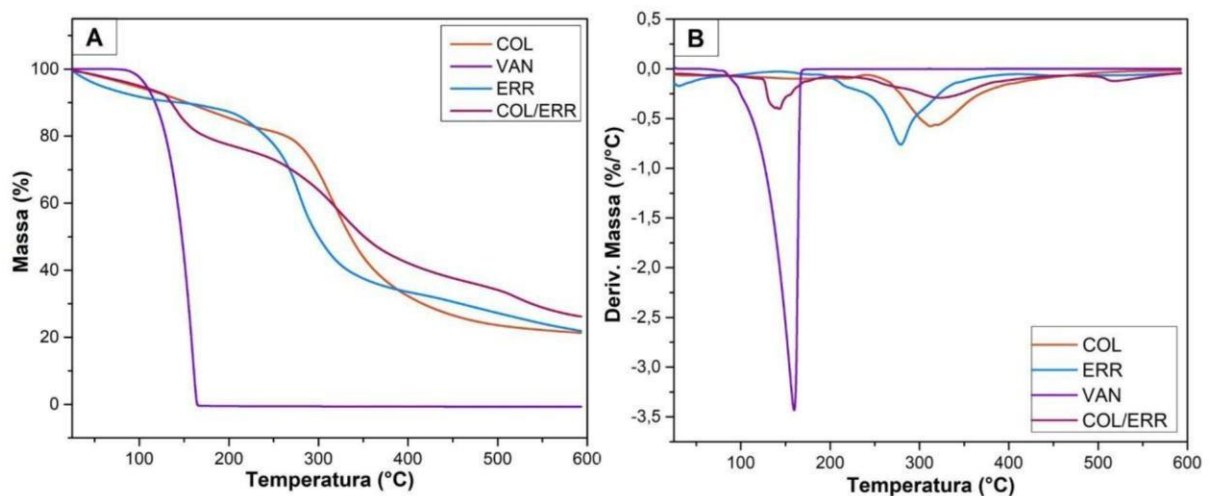
O aparecimento da banda em 1024 cm^{-1} em todos os espectros das membranas com ERR está relacionado à formação de fenol glicosilado (Kim *et al.*, 2023), formada da interação entre o grupo fenol da VAN e os açúcares presentes na maltodextrina e cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo, ambos presentes no ERR.

Dessa forma, o ERR e concentrações mais altas de VAN sugerem maior reticulação do COL, podendo melhorar significativamente a estabilidade estrutural e as propriedades mecânicas da membrana (Indrani; Lukitowati; Yulizar, 2020; Ramasamy; Shanmugam, 2015), corroborando com os resultados de MEV.

5.9 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A análise termogravimétrica das membranas de COL, ERR, VAN e COL/ERR são apresentadas na Figura 25.

Figura 25- Termogravimetria das amostras de COL, ERR, VAN e COL/ERR A) TG; B) DTG.



Verifica-se que a VAN (pura) apresentou um único e acentuado evento de perda de massa (100%), em 164°C . O início de perda de massa (T_{onset}) foi em 111°C , associada à evaporação da VAN, a qual teve sua temperatura máxima de perda de massa (T_{max}) em 160°C associada à sua degradação (Thyriyalakshmi; Radha, 2019; Milanovic *et al.*, 2010). Por sua vez, a amostra de ERR exibiu dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro associado à evaporação de moléculas de água em até 100°C e o segundo evento, com T_{max} de 279°C (78%), está relacionado à degradação de glicosídeos, antocianinas e os componentes fenólicos presentes tanto no repolho roxo quanto na maltodextrina (Machado *et al.*, 2022).

A amostra pura de COL exibiu três eventos de perda de massa, sendo o primeiro associado à evaporação de moléculas de água em até 100°C. O segundo e o terceiro eventos de perda de massa do COL, uma em T_{max} de 160°C (9%) e outra em T_{max} 312°C (61%), são atribuídos à perda de água estrutural ligada às moléculas do COL e à decomposição da estrutura macromolecular do COL, respectivamente (Mekonnen; Ragothanman; Palamisamy, 2017; Lakra; Kiran; Sai, 2015). Diferente do observado nos termogramas de COL e ERR, a curva de TG da membrana composta por ambos (COL/ERR) resultou em quatro eventos distintos de perda de massa. O primeiro evento com T_{max} em 59°C (3% de perda de massa) está associado à evaporação de água. O segundo com T_{max} em 142°C (18%), não observado no COL nem no ERR (puros), é atribuído à reticulação do COL pelo ERR, conforme evidenciado pelas análises de MEV e FTIR. De acordo com Lakra, Kiran e Sai (2015), o processo de reticulação pode influenciar na capacidade de absorção de água, bem como no tipo de interação dessas moléculas de água com o COL, o que pode resultar em uma diminuição da temperatura de perda de massa. O terceiro evento, por sua vez, teve uma evidente perda de massa na T_{max} de 322°C (36%), que está associado à decomposição térmica de COL. Por fim, o último evento ocorreu em uma T_{max} de 516°C (12%) e é atribuído à uma provável decomposição pirolítica, ou seja, decomposição das moléculas remanescentes do COL (Wu *et al.*, 2019). Os resultados obtidos das análises de TG e DTG estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4— Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (T_{onset}), máxima (T_{max}) e final (T_{endset}) de perda de massa dos materiais puros (COL; ERR; VAN e COL/ERR).

Amostras	Eventos	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{endset} (°C)	Perda de massa (%)
COL	1	-	160	-	9
	2	279	312	392	61
ERR	1	257	279	311	78
VAN	1	111	160	164	100
	1	127	142	162	18
COL/ERR	2	268	322	376	36
	3	503	516	567	12

A análise termogravimétrica das membranas de COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) estão apresentadas na Figura 26 e tabela 5. Para todas as amostras houve dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro, abaixo de 100°C, relacionado à evaporação de água. O segundo evento com T_{max} variando de 318°C a 324°C (77-80% de perda de massa) está associado à decomposição do COL. A supressão do pico de decomposição da VAN está

relacionada à sua interação com o COL em um processo de reticulação, o que pode ser também evidenciado pelo deslocamento da T_{max} de decomposição do COL (de 312°C para 324°C), uma vez que materiais reticulados tendem a ser termicamente mais estáveis do que materiais não reticulados (Wu *et al.*, 2018).

Figura 26- Termogravimetria das membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). (A) TG e (B) DTG

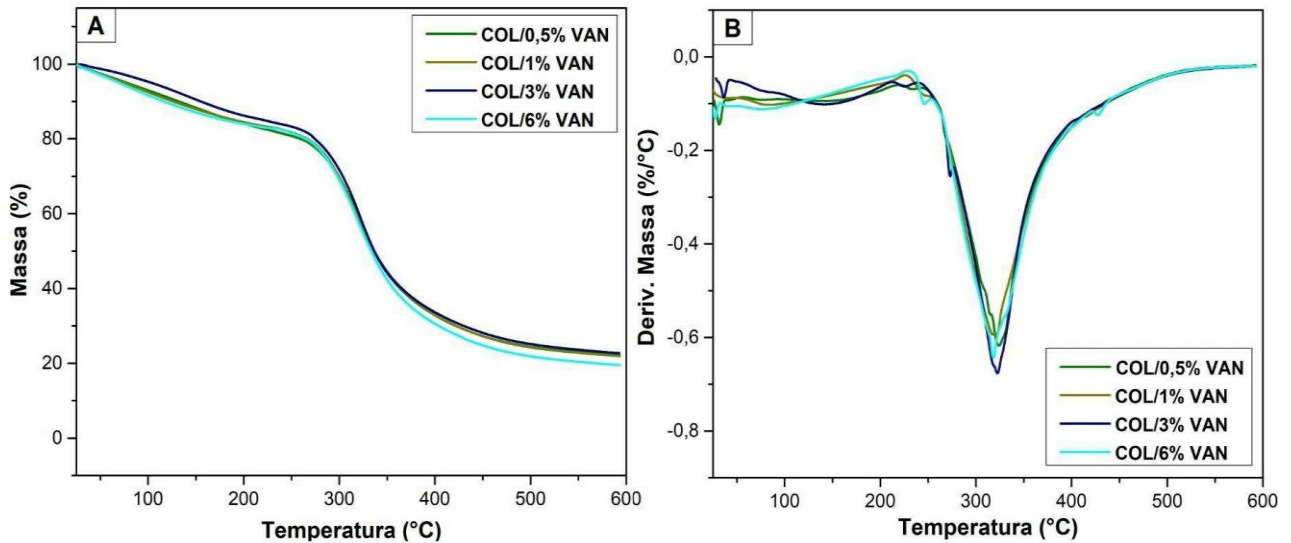


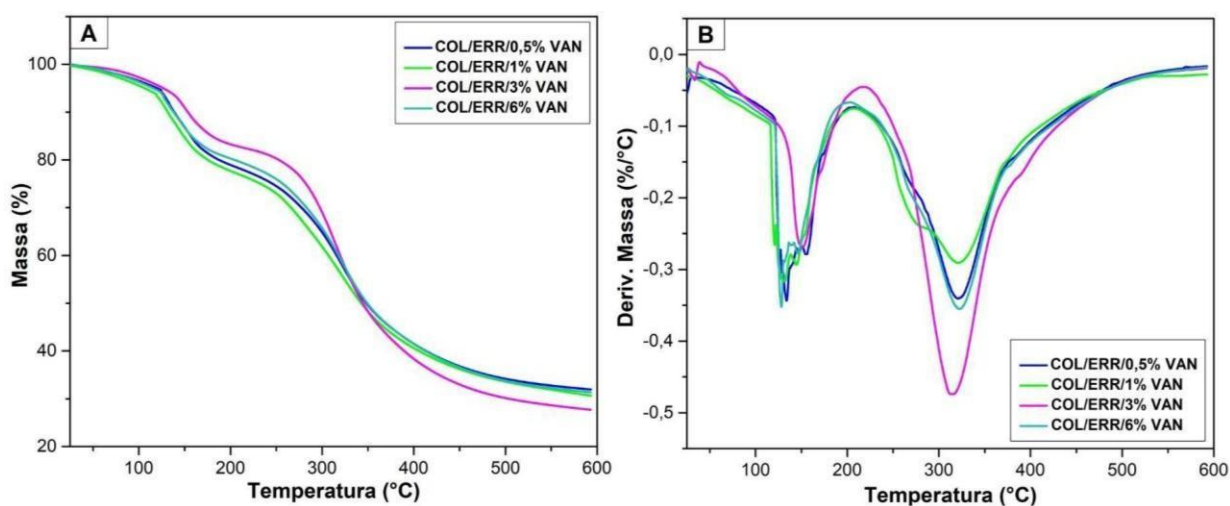
Tabela 5- Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (T_{onset}), máxima (T_{max}) e final (T_{endset}) de perda de massa das membranas de COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).

Amostras	Eventos	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{endset} (°C)	Perda de massa (%)
COL/0,5%VAN	1	293	324	375	78
COL/1%VAN	1	288	322	376	78
COL/3%VAN	1	292	322	370	77
COL/6%VAN	1	283	318	375	80

A termogravimetria das membranas de COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina) são apresentadas pela Figura 27. Todas as membranas exceto a de COL/ERR/3%VAN apresentaram o mesmo padrão de perda de massa. O fato do padrão de perda de massa dessa membrana ter sido diferente pode estar relacionada ao possível rompimento das fibras colágenas, como foi observado nas análises de MEV. Outra evidência deste rompimento das fibras de COL pode ser observada na sua perda de massa que ocorre na T_{max} de 314°C, temperatura próxima à perda de massa do COL não reticulado.

As membranas de COL/ERR incorporadas com 0,5%, 1% e 6% de VAN (COL/ERR/VAN) exibiram dois eventos principais de perda de massa. O primeiro evento, com DTG exibindo consecutivos estágios de decomposição térmica (Figura 22B), teve T_{max} variando de 127°C a 133°C (18 a 21% de perda de massa), estão associadas à perda de massa de COL reticulado pelo ERR, uma vez que a reticulação causada pelo ERR resultou em uma rede colágena com maior número de poros e poros maiores em comparação as membranas sem ERR, conforme pode ser observado nos histogramas do MEV (Figuras 17 e 18). Além disso, essa T_{max} só foi observada nas membranas de COL/ERR/VAN.

Figura 27- Termogravimetria das membranas de COL/ERR e COL/ERR/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina). (A) TG e (B) DTG.



O segundo evento para todas as membranas também apresentou deslocamento na T_{max} em comparação ao COL puro, com valores entre 321°C e 322°C (46 a 49% de perda de massa), associado à decomposição do COL reticulado pela VAN, como já observado nas membranas de COL/VAN (0,5%, 1%, 3% e 6% de vanilina).

Na tabela 6 estão sumarizados os dados obtidos pela termogravimetria das membranas de COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).

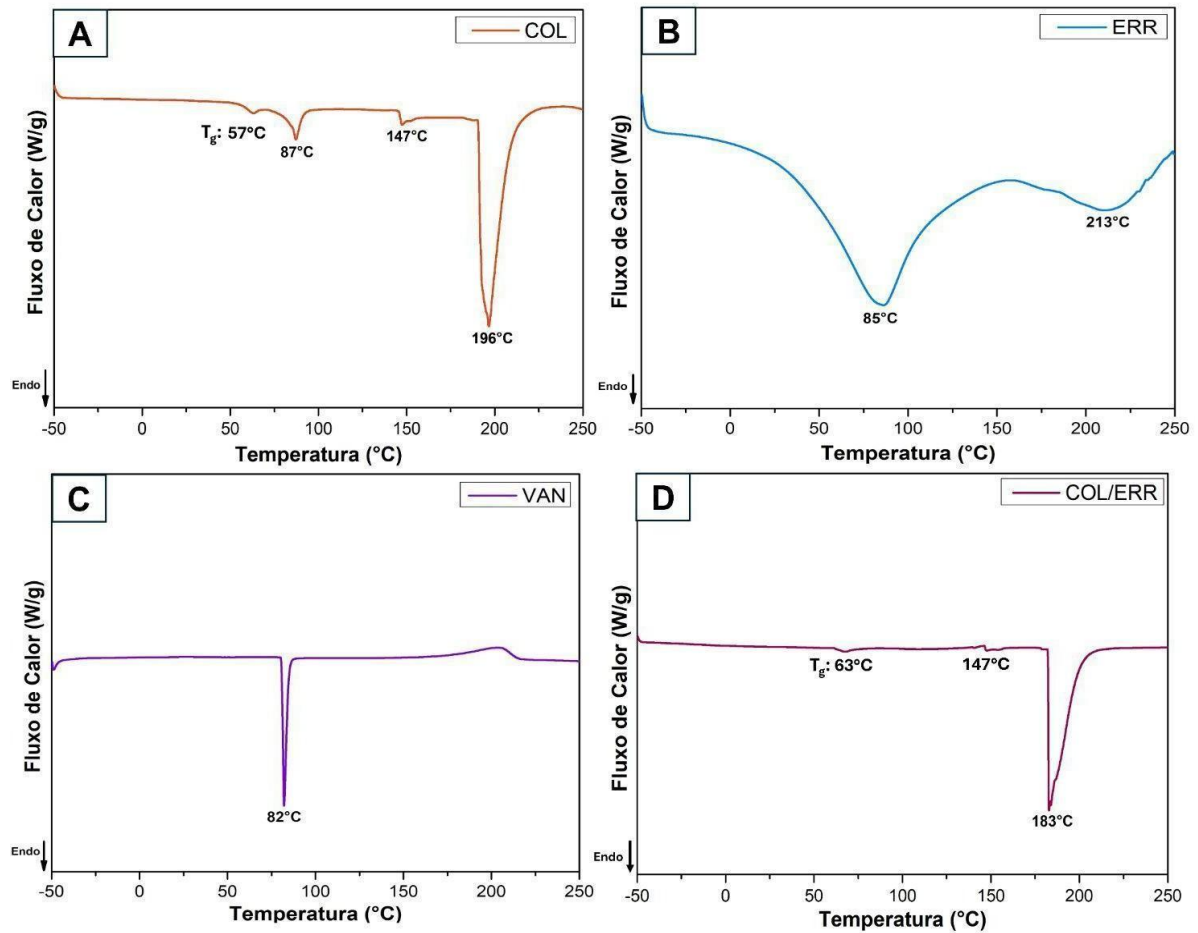
Tabela 6- Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG associadas à temperatura de início (T_{onset}), máxima (T_{max}) e final (T_{endset}) de perda de massa das membranas de COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).

Amostras	Eventos	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{endset} (°C)	Perda de massa (%)
COL/ERR/0,5%VAN	1	125	133	164	20
	2	254	321	369	47
COL/ERR/1%VAN	1	116	131	162	21
	2	251	321	383	46
COL/ERR/3%VAN	1	134	150	178	16
	2	276	314	377	54
COL/ERR/6%VAN	1	121	127	162	18
	2	262	322	367	49

5.10 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Figura 28 apresenta os termogramas de DSC para as amostras de COL, ERR, VAN e COL/ERR. A curva de DSC do COL (Figura 28A) apresenta quatro eventos endotérmicos. O primeiro pico em 57°C corresponde à temperatura de transição vítrea (T_g) do COL, que segundo Ocak (2018) e Ocak (2021) pode variar em temperaturas entre 43°C a 58°C. O segundo e o terceiro eventos endotérmicos em 87°C e 147°C, respectivamente, estão associados à temperatura de desnaturação do COL (Lakra; Kiran; Sai, 2015). Após o processo de desnaturação térmica, as fibrilas de COL podem sofrer várias mudanças conformacionais resultantes da quebra de ligações cruzadas e liberação de água ligada. (Perkasa; Erizal; Abbas, 2013). Por fim, o quarto evento endotérmico ocorreu em 196°C que foi atribuído a temperatura de fusão (T_f) do COL (Lizarazo *et al.*, 2019).

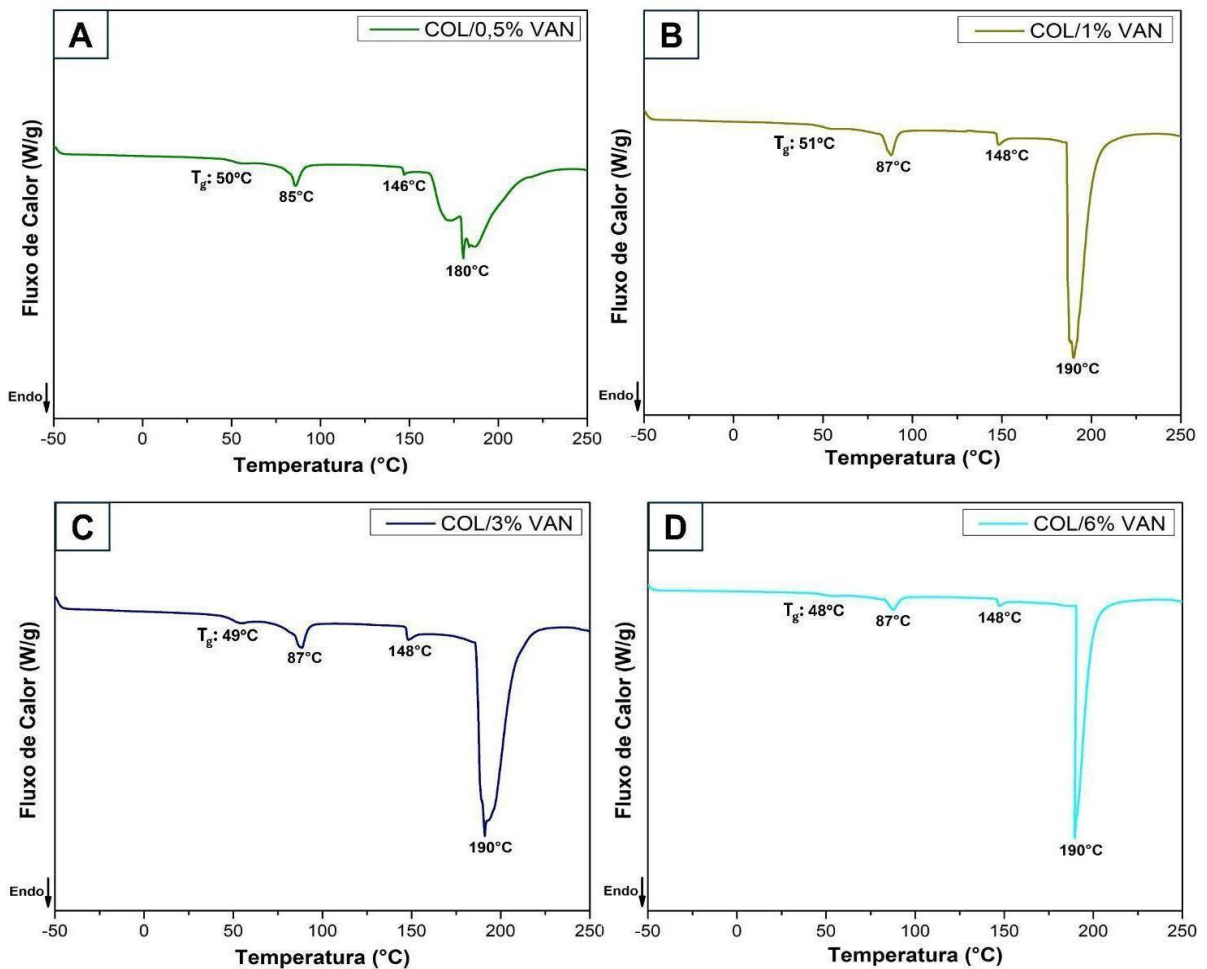
Figura 28- Termogramas de DSC das membranas. (A) COL, (B) ERR, (C) VAN e (D) COL/ERR.



Por sua vez, a curva de DSC de ERR (Figura 28B) exibiu dois eventos endotérmicos amplos em 85°C e 213°C. O primeiro pico endotérmico (85°C) foi atribuído à evaporação de água fracamente ligada, enquanto o segundo (213°C) está associado à carbonização da maltodextrina presente no ERR (Elnaggar *et al.*, 2010). A VAN (Figura 28C) exibiu um único evento endotérmico em 82°C que corresponde à sua T_f (Zheng *et al.*, 2020). Por sua vez, o COL/ERR (Figura 28D) exibiu três eventos endotérmicos, sendo o primeiro em 63°C correspondente à T_g do COL, o segundo em 147°C associado à desnaturação do COL e o terceiro em 183°C está associado à fusão do COL reticulado pelo ERR, sofrendo influência da maltodextrina na estrutura da fibra colágena, tornando a membrana de COL/ERR mais flexível do que a membrana de COL (pura) (Pacheco *et al.*, 2021), o que pode ser observado no manuseio das membranas.

Os termogramas de DSC das membranas de COL/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina) são apresentados pela Figura 29.

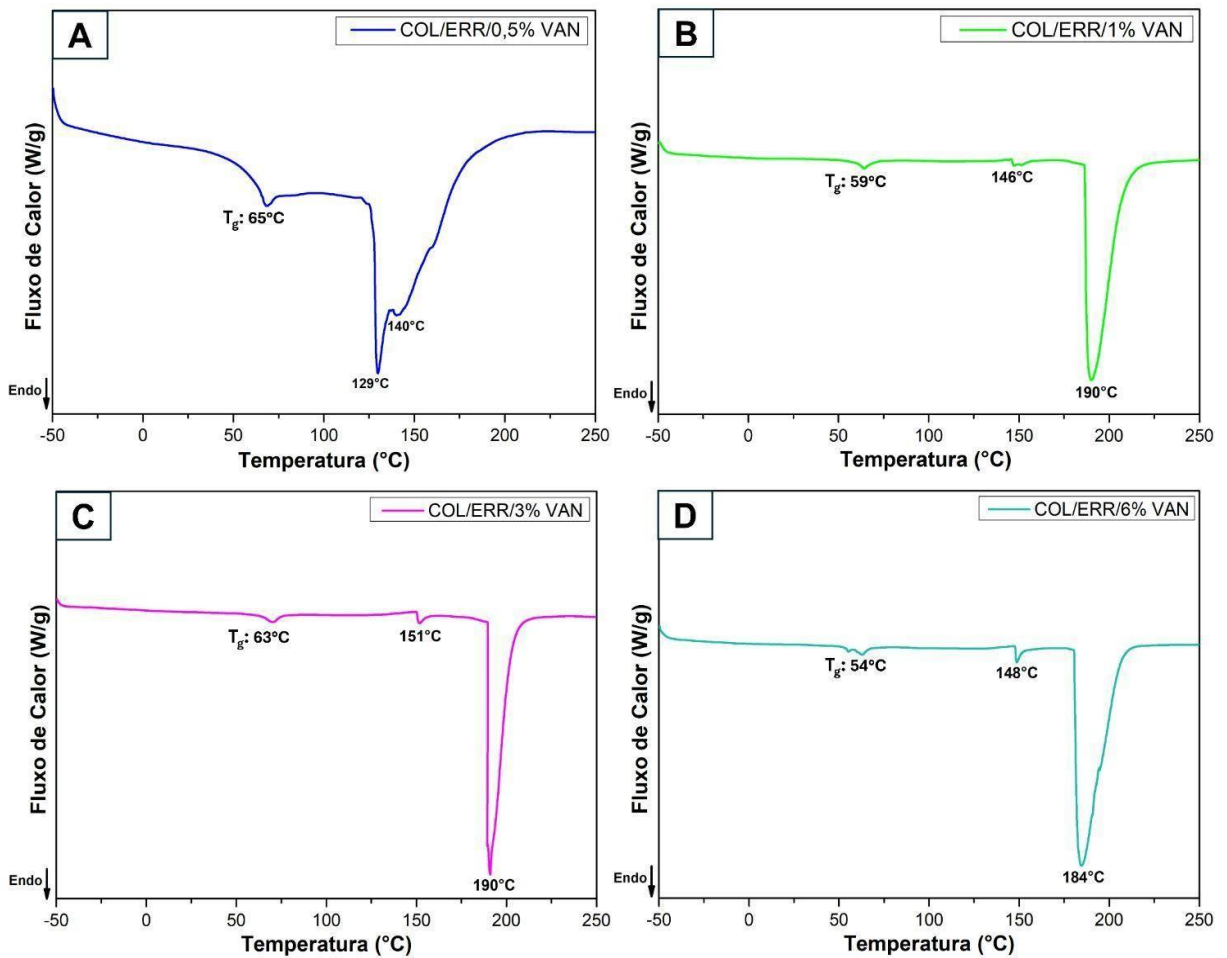
Figura 29- Termogramas de DSC das membranas de COL/VAN. (A) 0,5%, (B) 1%, (C) 3% e (D) 6%.



O primeiro pico endotérmico apresentado por todas as membranas de COL/VAN de 48°C a 51°C está associado à T_g do COL. Os dois seguintes picos endotérmicos, um entre 85°C e 87°C e o outro entre 146°C e 148°C, estão associados à desnaturação do COL, como foi possível observar no termograma do COL puro (Figura 28A). O seguinte pico endotérmico mais pronunciado observado nos termogramas está em 180°C que está relacionado à T_f do COL sofrendo provavelmente influência da reticulação pela VAN, uma vez que a temperatura tende a ser menor do que à T_f do COL não reticulado. Os demais picos adjacentes à 190°C estão associados à desnaturação das moléculas de COL não ligadas no processo de reticulação.

A Figura 30 apresenta os termogramas de DSC das membranas de COL/ERR/VAN (0,5%; 1%; 3% e 6% de vanilina).

Figura 30- Termogramas de DSC das membranas de COL/ERR/VAN. (A) 0,5%, (B) 1%, (C) 3% e (D) 6% de vanilina.



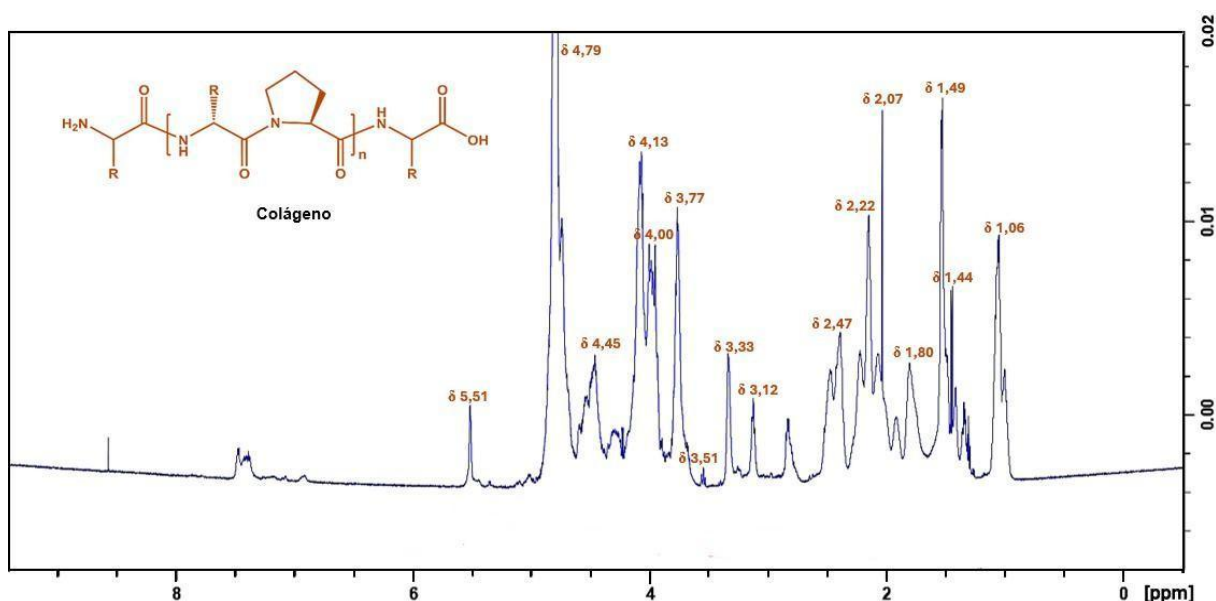
O primeiro pico endotérmico apresentado por todas as membranas de COL/ERR/VAN de 54°C a 65°C está associado à T_g do COL. O aumento na T_g do COL está associado à reticulação do COL pelo ERR, como observado no estudo de reticulação do COL realizado por Thongchai *et al.* (2020). A membrana de COL/ERR/0,5% VAN apresentou picos endotérmicos em 129°C e 140°C que estão associados à T_f da maltodextrina e à desnaturação do COL, respectivamente (Machado *et al.*, 2022; Lakra; Kiran; Sai, 2015). As membranas de COL/ERR/VAN (1%, 3% e 6%) apresentam picos endotérmicos entre 146°C a 151°C que estão associados à desnaturação do COL. Os picos endotérmicos entre 184°C a 190°C possivelmente são referentes à T_f do COL reticulado, como pode ser observado nas membranas de COL/VAN (Figura 29).

A análise de DSC evidenciou as características térmicas próprias dos materiais utilizados para compor as membranas e, além disso, evidenciou a reticulação do COL tanto pela VAN quanto pelo ERR, como pode ser observado pelos deslocamentos das T_f .

5.11 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (^1H RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN) foi realizada para investigar as características estruturais da membrana de COL e das membranas de COL/ERR, COL/6% VAN e COL/ERR/6% VAN. Essas membranas foram selecionadas com base nos resultados obtidos aqui por meio das análises de MEV, FTIR, TG e DSC, que demonstraram que a membrana COL/ERR/6% VAN apresentou maior eficiência da reticulação. Para efeito de comparação, também foram utilizadas as membranas COL, COL/ERR e COL/6% VAN. A Figura 31 apresenta o espectro de ^1H RMN da membrana COL.

Figura 31- Espectro ^1H RMN da membrana de COL.



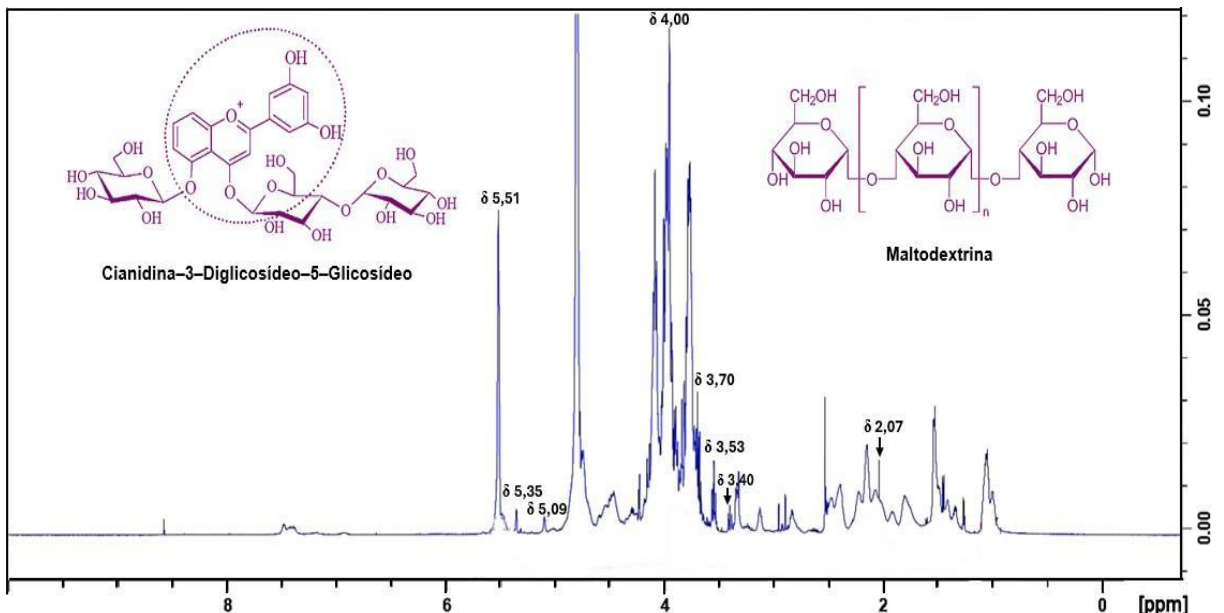
A análise do espectro de ^1H RMN da membrana de COL permitiu identificar os principais picos de aminoácidos presentes na proteína. Os sinais observados em δ 1,06 ppm e δ 1,44 ppm foram atribuídos aos grupos metil (CH_3) da alanina, que aparecem como dupletos devido ao acoplamento *spin-spin* com o próton vinculado ao α -carbono (CH). A alanina também apresenta sinais em δ 4,00 ppm e δ 4,13 ppm, relacionados a multipletos provenientes do ambiente químico dos prótons vinculados ao α -carbono (Riemer, T. *et al.*, 2012; Ahmad, T. *et al.*, 2021; Voron'ko, N. G. *et al.*, 2017).

A prolina, um aminoácido abundante no COL, foi identificada com diversos sinais no espectro. Os picos em δ 1,49 ppm, δ 1,80 ppm e δ 2,07 ppm envolvem os prótons das cadeias laterais da prolina, enquanto os sinais em δ 2,22 ppm, δ 3,12 ppm, δ 3,33 ppm e δ 3,51 ppm estão associados aos prótons metilênicos e metínicos de sua estrutura cíclica. O sinal em δ 4,45 ppm, distribuído como um múltiplo, é atribuído ao próton α da prolina (Ahmad, T. *et al.*, 2021; Riemer, T. *et al.*, 2012; Voron'ko, N. G. *et al.*, 2017).

A hidroxiprolina, um derivado da prolina e componente essencial para a estabilidade estrutural do COL, foi identificada por picos específicos: o sinal em δ 2,47 ppm é atribuído ao próton do grupo hidroxila, enquanto o tripleto observado em δ 3,77 ppm relacionado ao próton β e os sinais em δ 4,79 ppm e δ 5,51 ppm estão relacionados ao próton α , cujas posições refletem a interação do grupo hidroxila com a matriz proteica. Esses resultados confirmaram a presença predominante de prolina, hidroxiprolina e alanina no COL tipo I, corroborando sua composição típica (Riemer, T. *et al.*, 2012; Ahmad, T. *et al.*, 2021; Voron'ko, N. G. *et al.*, 2017).

A Figura 32 apresenta o espectro da membrana composta por COL/ERR. No espectro da membrana de COL/ERR, observou-se que os picos específicos do COL se mantiveram, garantindo a preservação da estrutura proteica na membrana após a incorporação do ERR.

Figura 32- Espectro ^1H RMN da membrana de COL/ERR.

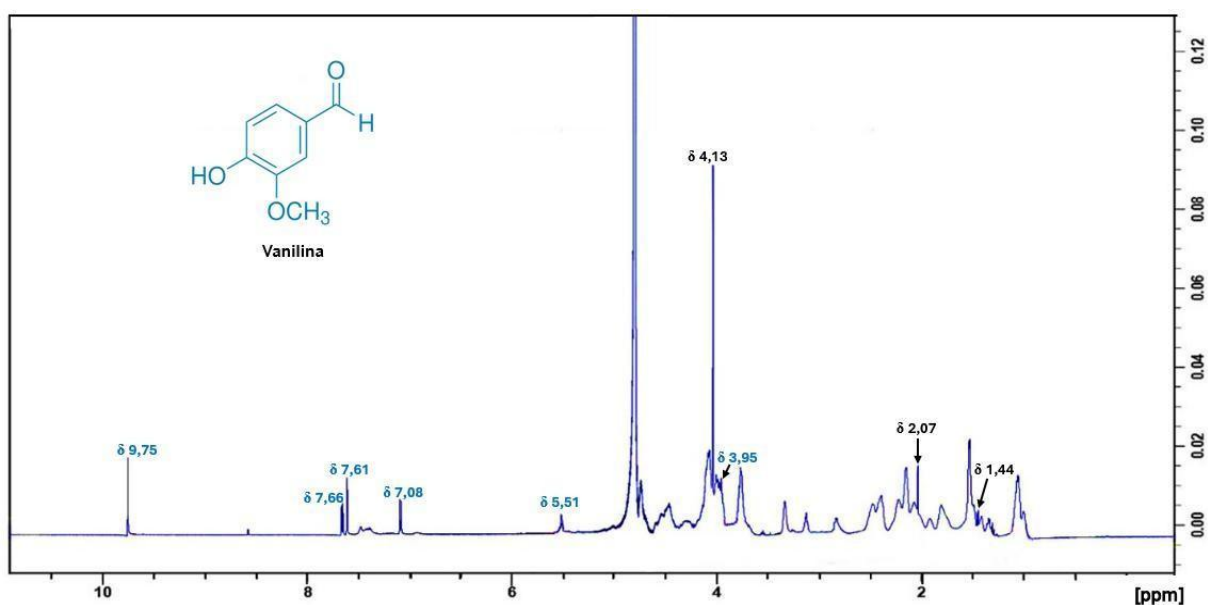


Além disso, picos específicos foram atribuídos ao composto cianidina-3- glicosídeo-5-glicosídeo, principais antocianinas presentes no extrato. Os sinais em δ 3,40 ppm, δ 3,53 ppm e um novo pico em δ 3,70 ppm estão associados aos prótons dos grupos glicosídicos, enquanto os picos em δ 5,09 ppm e δ 5,35 ppm tiveram um aumento na intensidade do pico e estão

associados aos prótons anoméricos do açúcar conjugado à cianidina (Moloney, Micheal *et al.*, 2018). Esses resultados confirmaram a integração do ERR à matriz de COL, preservando os picos espectrais de ambos os componentes. Os picos em δ 3,53 ppm e δ 5,09 ppm característicos da maltodextrina coincidem com os picos de cianidina-3-glicosídeo-5-glicosídeo, presentes no ERR (Gurturz, Z. *et al.*, 2017). Os picos em δ 4,00 ppm e δ 5,51 ppm também tiveram um aumento de intensidade no pico, que está relacionado à interação entre os compostos presentes no ERR e o COL. Essa região no espectro é tipicamente associada a hidrogênios em ligações com grupos hidroxila (-OH) ou duplas ligações em sistemas conjugados, como os encontrados em antocianinas, que são os principais compostos bioativos presentes no ERR (Machado *et al.*, 2022). Essas interações ocorrem por meio de ligações hidrogênio, formação de complexos ou outras alterações químicas que aumentam a densidade eletrônica local, resultando em um aumento na intensidade do pico (Souza, RD de., 2013).

A intensidade do pico em δ 2,07 ppm diminuiu em relação à membrana de COL puro, atribuída a interações químicas e estruturais entre o ERR e o COL. O pico δ 2,07 ppm está associado a prótons do grupo metil (CH_3) e metileno (CH_2) em um ambiente específico da estrutura colágena (Peixoto, Paulo De Sa *et al.*, 2013). Essas interações alteram o ambiente químico dos prótons pelo sinal δ 2,07 ppm, reduzindo assim, a intensidade no pico. Na membrana de COL/6% VAN, o espectro de ^1H RMN também revelou alterações significativas nos sinais característicos do COL, assim como o surgimento de novos picos atribuídos à VAN (Figura 33).

Figura 33- Espectro ^1H RMN da membrana de COL/6% VAN.



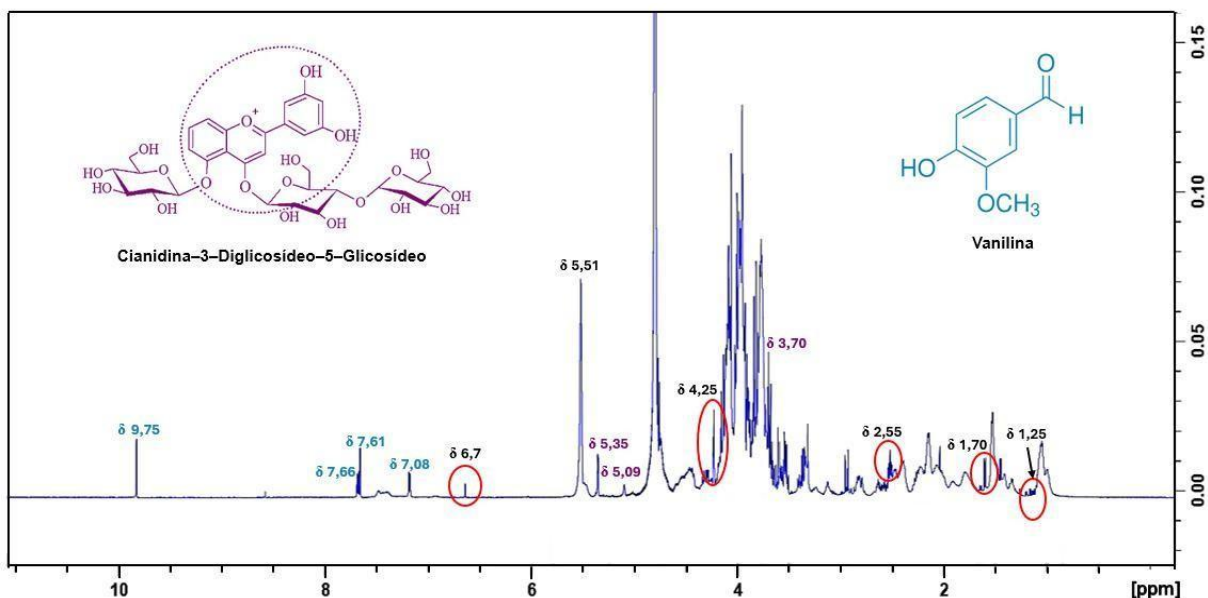
Os picos característicos do COL se mantiveram, mas com intensidades reduzidas em relação ao COL puro para os sinais em δ 1,44 ppm e δ 2,07 ppm, indicando possíveis interações entre a VAN e os aminoácidos da proteína (glicina, prolina e hidroxiprolina) (Bogdan, M.; Floare, C. G.; Pirnau, A., 2009). O pico em δ 2,07 ppm diminuiu devido a formação de ligações covalentes entre o grupo aldeído da VAN e os grupos amina livres do COL (Bogdan, M.; Floare, C. G.; Pirnau, A., 2009).

O sinal em δ 4,13 ppm apresentou maior intensidade do pico em comparação com o COL puro, sugerindo modificações no ambiente químico dos prótons vinculados ao carbono de alguns aminoácidos. O pico em δ 5,51 ppm diminuiu em relação a membrana de COL puro, devido à interação do grupo aldeído da VAN com aminas primárias do COL, formando bases de Schiff (iminas) (Wilharm, N. *et al.*, 2022). Essa reação altera o ambiente químico dos prótons envolvidos, reduzindo o sinal (Hidayati *et al.*, 2021; Al-Shuja'a *et al.*, 2017). Além disso, novos sinais atribuídos à VAN foram observados em δ 3,95 ppm (metóxi), novos picos em δ 7,08 ppm, δ 7,61 ppm, δ 7,66 ppm (prótons aromáticos do anel benzênico) e singlete δ 9,75 ppm correspondendo aos prótons dos grupos aldeídos presentes na VAN (Lu, W.; Jin, Z., 2022).

As mudanças observadas no espectro indicam que a VAN interagiu com a estrutura colágena através de ligações covalentes, como a formação de iminas por meio das quais ocorrem a reticulação, como pode ser verificado também nos resultados de FTIR. Essas alterações reforçam o papel da VAN no melhoramento das propriedades da membrana, conferindo-lhe características diferenciadas e potencial funcional aprimorado.

A Figura 34 apresenta os resultados de ^1H RMN da membrana de COL/ERR/6% VAN. Foram observados sinais em δ 3,70 ppm, δ 5,09 ppm e δ 5,35 ppm atribuídos às antocianinas presentes no ERR. Esses sinais no espectro correspondem aos prótons aromáticos das antocianinas e indicam a presença do ERR na matriz colágena.

Figura 34- Espectro 1H RMN da membrana de COL/ ERR/ 6% VAN.



O gráfico apresenta também novos multipletos em aproximadamente δ 1,25 ppm relacionados tanto à formação de ligações cruzadas covalentes com grupos alifáticos (CH_2 e CH_3) que são formados durante o processo de reticulação (Wilharm, N. *et al.*, 2022; Olde, L. H. H. *et al.*, 1995), quanto à presença de compostos alifáticos de ERR. O ERR contém uma variedade de compostos orgânicos, incluindo os flavonoides, açúcares e outras moléculas alifáticas. Após a reação, os açúcares e compostos relacionados podem sofrer transformações que levam ao aumento de sinais de prótons metílicos ou metilênicos (CH_3 ou CH_2) nesta região (Wilharm, N. *et al.*, 2022; Peixoto, Paulo De Sa *et al.*, 2013). Por sua vez, o surgimento do pico em δ 1,70 ppm foi atribuído a prótons alifáticos, como os de grupos metil e metileno, presentes na prolina do COL (Shoulders & Raines, 2009). Além disso, a presença de antocianinas no ERR, formam interações de ligações cruzadas com o COL, alterando o ambiente químico dos prótons alifáticos e contribuindo para o aumento do sinal (Mondal, Bijoy Kumar; Guha, Falguni; Abser, Md Nurul., 2021). A VAN intensificou essa interação, criando novos ambientes moleculares que deslocam os sinais alifáticos para essa região. Essas alterações refletem a formação de uma matriz mais reticulada.

O pico em δ 2,55 ppm teve uma redução em sua intensidade relacionado à formação de bases de Schiff ($\text{C}=\text{N}$) entre os grupos aldeídos da VAN e os grupos aminos do COL, além de reações de compostos fenólicos do ERR com as cadeias laterais do COL (Wilharm, N. *et al.*, 2022). É visível que a intensidade dos picos em δ 4,25 ppm, δ 5,35 ppm e δ 6,7 ppm aumentaram. No pico em δ 4,25 ppm o aumento da intensidade foi atribuído a formação de ligações cruzadas covalentes entre os aldeídos da VAN e os grupos amina do COL (formando

bases de Schiff) pode deslocar os prótons de cadeias laterais para essa região (Wilharm, N. *et al.*, 2022). Esse aumento também resulta das reações envolvendo os compostos fenólicos do ERR formando éteres e outros derivados oxigenados que contribuem para o desenvolvimento de uma rede densa, que atraem prótons adjacentes para essa região (Issa, Raafat M.; Khedr, Abdalla M.; Rizk, Helen., 2008).

O pico em δ 5,51 ppm teve um aumento na intensidade, atribuída à interação do ERR com o COL que está relacionado a ligações cruzadas insaturadas que deslocam os prótons para essa região, assim como está também relacionado a alterações dos prótons nos resíduos das cadeias laterais da prolina ou hidroxiprolina dos aminoácidos do COL, formando radicais vinílicos (C=C) (Silverstein, Robert M.; Bassler, G., 1962). Já o aumento do pico em δ 6,7 ppm é atribuído à formação do composto aromático 1, 2, 4- trissubstituídos uma vez que essa região é típica de prótons em anéis aromáticos com substituintes (Lima, Daniel Inácio de *et al.*, 2013).

A VAN e compostos fenólicos do ERR podem participar de reações de reticulação que alteram o ambiente químico dos prótons aromáticos, deslocando-os para essa região de δ 6,7 ppm. A reticulação cria novos compostos aromáticos funcionalizados, como fenóis conjugados ou quinonas (Mattioli; Francioso; Mosca; Silva, 2020), além de modificações estruturais no ERR. As antocianinas e compostos fenólicos do ERR durante a reticulação sofrem oxidação e polimerização, gerando espécies aromáticas conjugadas (Frinhani, 1998).

A região em δ 7,08 ppm, δ 7,61 ppm, δ 7,66 ppm e δ 9,75 ppm foram deslocadas em comparação ao espectro do COL. Esse deslocamento dos picos em δ 7,08 ppm, δ 7,61 ppm e δ 7,66 ppm estão relacionadas aos prótons aromáticos substituídos, pois essa região é característica de prótons aromáticos ligados a anéis benzeno, especialmente em compostos substituídos (Lima, Daniel Inácio de *et al.*, 2013; Karakurt *et al.*, 2021; Medeiros, 2014). A região entre δ 7,5 - 9 ppm também é atribuída à formação de base de Schiff que ocorre quando a VAN reage com os grupos amina do COL, Além disso, prótons podem surgir entre δ 7,5 - 8,5 ppm, devido à interação com o ERR (Issa, Y. M.; Hassib, H. B.; Abdelaal, H. E., 2009). Por sua vez, o pico em δ 9,75 ppm refere-se aos prótons aldeídicos da VAN na interação com aminas do COL (base de Schiff) formados durante a reticulação, deslocando o sinal aldeídico para essa região (Issa, Y. M.; Hassib, H. B.; Abdelaal, H. E., 2009; Dos Santos, J. E.; Dockal, E. R.; Cavalheiro, É. T. G., 2005; Wilharm, N. *et al.*, 2022).

Embora houve dúvida na eficiência de reticulação por meio dos resultados do ensaio mecânico de tração, há evidências de reticulação por meio dos resultados de MEV, intumescimento, FTIR, DSC, TG e ^1H RMN. A diminuição das propriedades mecânicas da

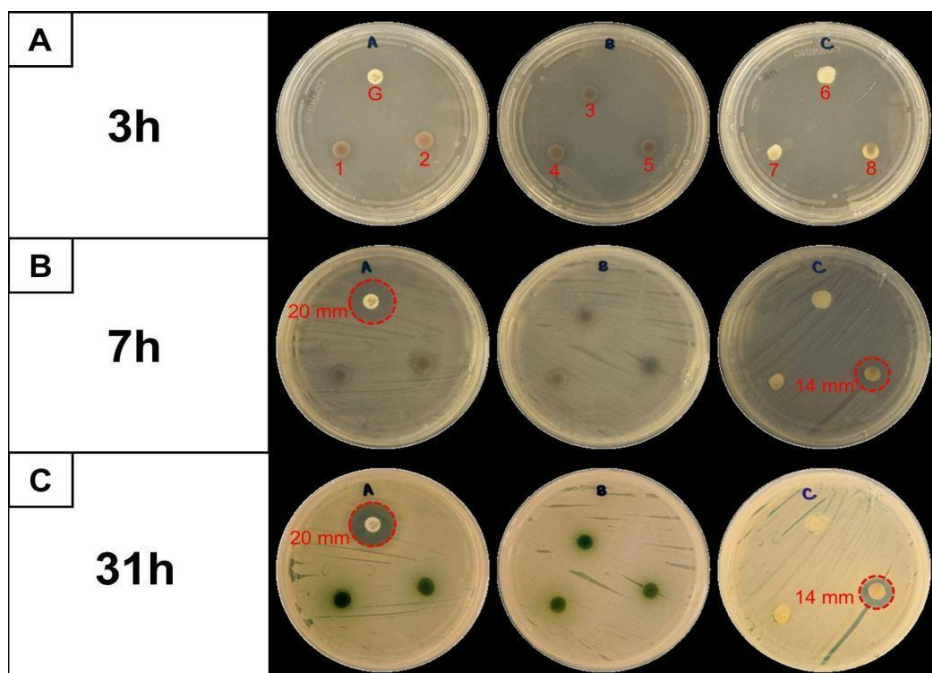
membranas não significa que não houve reticulação, podendo então estar relacionada com a heterogeneidade da reticulação e com a formação de redes densas que enrijecem as fibrilas do COL durante a reticulação e diminuem assim a capacidade do material em se deformar, tornando a membrana mais quebradiça (Martins, Talita., 2017; Kamml, J.; Acevedo, C.; Kammer, D. S., 2024).

O estudo de Martins (2017) investigou o desenvolvimento de matrizes compósitas tridimensionais de quitosana e vidro bioativo, destacando a formação de uma estrutura porosa heterogênea durante o processo de reticulação. No trabalho presente, análise de MEV, conforme observado nas Figuras 17C e 17H, evidenciaram a presença de poros com tamanhos e distribuições variáveis. Essa heterogeneidade, por sua vez, é atribuída a fatores relacionados à metodologia, às condições específicas de reticulação, como a concentração do agente reticulante, temperatura, pH, fatores estes que interferem no modo como ocorre a interação entre os componentes da matriz.

5.12 ANTIBIOGRAMA

Devido ao objetivo do curativo ser uma proteção contra infecção bacteriana é importante avaliar suas propriedades antimicrobianas ou bacteriostáticas. A Figura 35 apresenta o antibiograma das membranas de COL, COL/0,5% VAN, COL/6% VAN, COL/ERR, COL/ERR/0,5% VAN, COL/ERR/1% VAN, COL/ERR/3% VAN e COL/ERR/6% VAN.

Figura 35- Antibiograma das membranas. (A) 3h, (B) 7h e (C) 31h de exposição do disco de gentamicina (G), das membranas COL/ERR (1), COL/ERR/0,5% VAN (2), COL/ERR/1% VAN (3), COL/ERR/3% VAN (4), COL/ERR/6% VAN (5), COL (6), COL/0,5% VAN (7) e COL/6% VAN (8).



Na análise do antibiograma das amostras, foram observados eventos que elucidam o comportamento antimicrobiano da VAN em combinação com COL (COL/VAN) e a influência do ERR no ambiente de cultivo com *Staphylococcus aureus* (Figura 35). Após 3h de contato das membranas com as bactérias não foram observadas alterações importantes. Após 7h, é possível notar que a amostra de COL/6% VAN (Figura 35B - 8) apresentou um halo de inibição de 14 mm, valor próximo ao halo de inibição formado pelo disco controle de gentamicina. Este aparecimento do halo é um indicativo claro da atividade antimicrobiana da VAN. De fato, a VAN, utilizada aqui como reticulante, é um composto fenólico derivado da baunilha e possui propriedades antimicrobianas documentadas contra uma variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Amir *et al.*, 2024).

Após 31h, apesar do maior crescimento bacteriano na placa, é possível notar que o halo em volta da membrana de COL/6% VAN (Figura 35C - 8) manteve-se com 14 mm de diâmetro, confirmando o efeito antimicrobiano da VAN na proporção de 6%.

Com este ensaio não foi possível avaliar com precisão o efeito bacteriostático das membranas, embora nas membranas com ERR (Figura 35B - 1 a 5) é possível notar um fraco halo em sua volta, o que poderia indicar um possível efeito bacteriostático, uma vez que o ERR, utilizado neste estudo como um indicador natural de pH, é composto por bioativos com atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antifúngica, antiviral e, inclusive, antimicrobiano (Arafa *et al.*, 2021).

O efeito antimicrobiano só foi possível ser observado na membrana de COL/6% VAN, atribuído à VAN. No entanto, na membrana de COL/ERR/6% VAN não foi possível observar halo de inibição. O que não significa que a membrana não possua efeito bacteriostático. Desta forma, o potencial bacteriostático do ERR poderá ser avaliado futuramente por MEV.

É interessante ressaltar que na última hora do experimento, todas as membranas com ERR apresentaram uma mudança de cor roxa para verde, o que indica a detecção da alteração no pH do meio. Esta mudança de pH é devido à presença da bactéria, que altera o pH do meio onde ela está para alcalino. Portanto, no antibiograma a membrana com ERR foi eficaz como indicador natural de pH, comprovando a alteração de cor dependente do pH do meio, como foi observado pelo teste de UV-Vis.

5.13 ESTUDO COMPLEMENTAR DA INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ERR

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da variação na concentração de ERR no processo de reticulação do COL, uma vez que as análises anteriores neste trabalho indicaram que o ERR contribui de maneira significativa para a reticulação do COL, justificando a necessidade de aprofundar a investigação sobre o efeito de diferentes concentrações. Para isso, foram utilizadas três quantidades distintas de ERR, sendo 4g, 5g e 8g, a fim de analisar como essa variação pode influenciar nas amostras.

5.13.1 ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO

O ensaio mecânico de tração foi realizado para avaliar as propriedades mecânicas das amostras com diferentes quantidades de ERR (4g e 5g). É importante destacar aqui que a amostra contendo 8g de ERR não foi submetida ao ensaio de tração devido à sua alta fragilidade ainda no manuseio. A Figura 36 e a tabela 7 apresentam os resultados obtidos.

Figura 36- Gráficos do Módulo de Young (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%) por ensaio mecânico de tração das amostras de COL e COL/ERR (4g e 5g de ERR). (*) $p < 0,05$.

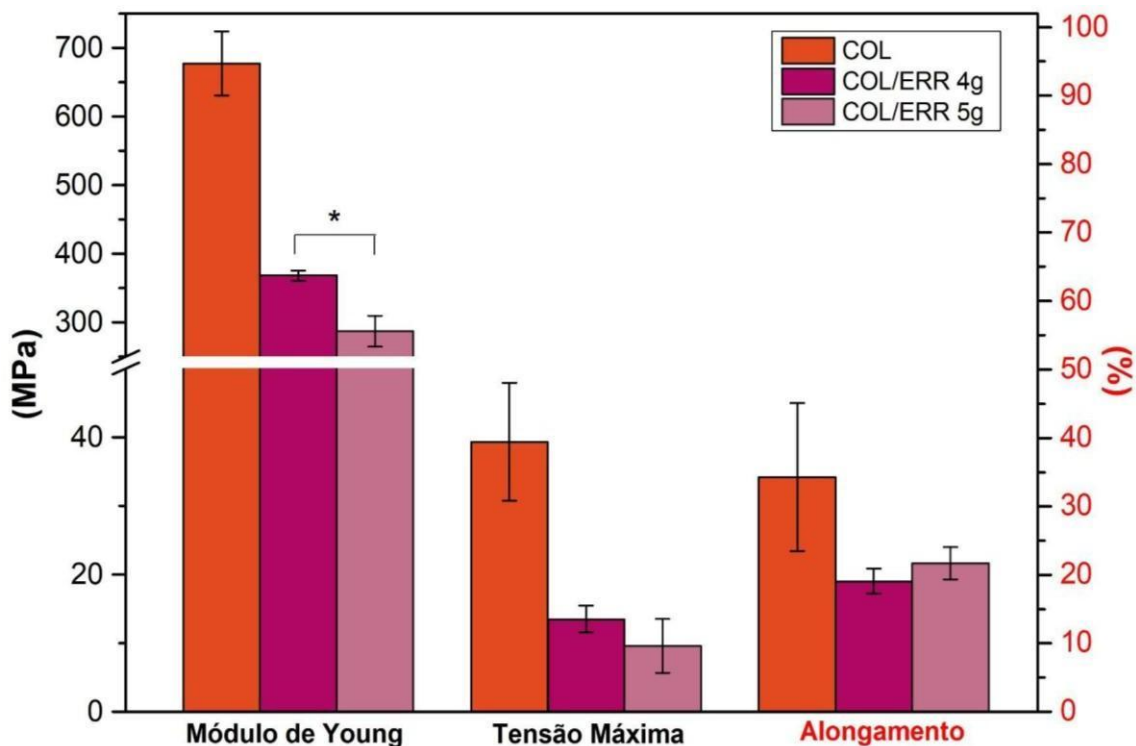


Tabela 7- Valores médios e respectivos desvios padrão do alongamento (%), módulo de Young e tensão máxima de ruptura das membranas de COL/ERR (4g, 5g e 8g de ERR).

Amostras	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)	Tensão Máxima (MPa)
COL/ERR 4g	5,6 ± 0,55	367,99 ± 7,40	13,5 ± 1,95
COL/ERR 5g	6,36 ± 0,70	286,86 ± 22,50	9,55 ± 3,93

Os resultados obtidos no ensaio mecânico de tração apresentaram que a adição de ERR impactou significativamente as propriedades mecânicas do COL. A membrana de COL/ERR 4g apresentou desempenho mecânico superior em termos de módulo de Young em comparação à membrana de COL/ERR 5g. O módulo de Young de $367,99 \pm 7,40$ MPa (Figura 36 e tabela 6) indica maior rigidez na membrana de COL/ERR 4g, enquanto a membrana de COL/ERR 5g, com módulo de $286,86 \pm 22,50$ MPa (Figura 36 e tabela 6), demonstra ser significativamente menos rígida ($p < 0,05$), devido à maior quantidade de ERR, que causou alterações na estrutura do COL.

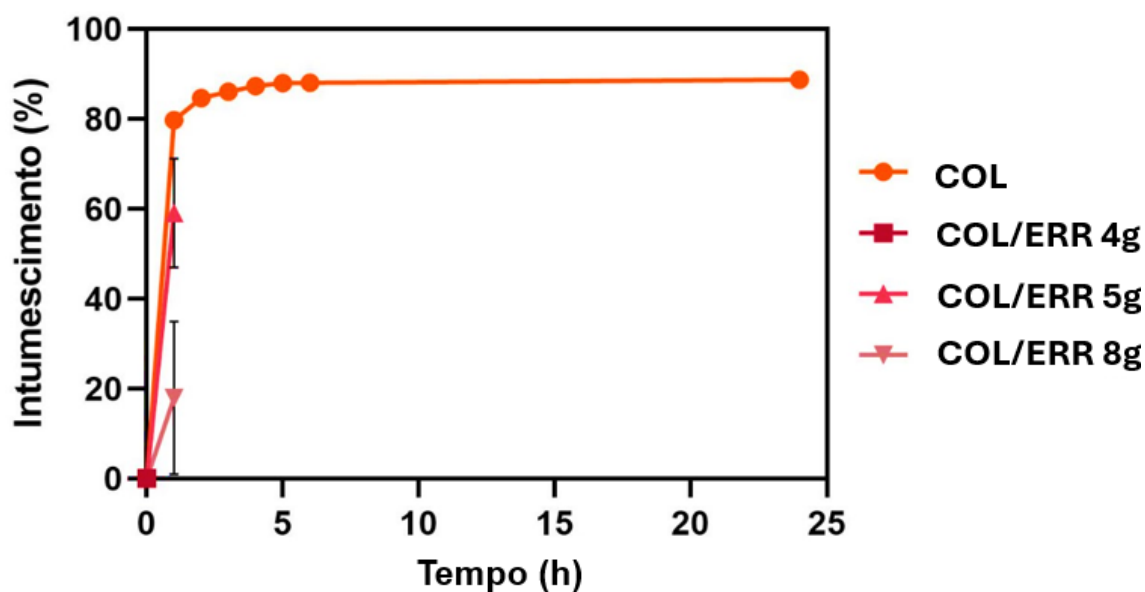
Contudo, tanto a tensão máxima quanto o alongamento na ruptura diminuíram após a incorporação do ERR, independentemente da quantidade utilizada (4g e 5g). A tensão máxima da membrana e o alongamento de COL/ERR 4g foram de $13,5 \pm 1,95$ MPa e $5,6 \pm 0,55\%$, respectivamente, e da membrana de COL/ERR 5g foi de $9,55 \pm 3,93$ MPa e $6,36 \pm 0,70\%$ (Figura 36 e tabela 7). Esses resultados sugerem que a presença de ERR, reduziu a resistência e capacidade de deformação da membrana de COL. Esses resultados comparados ao ensaio mecânico de tração das amostras reticuladas (Figura 19 e Tabela 6) demonstraram que à medida que aumenta a quantidade de ERR, menos resistente é a membrana. Wang (2019) e seus colaboradores, com o estudo de filmes para embalagens formulados com nanocomplexos de gelatina e antocianinas, observaram que as amostras contendo as antocianinas juntamente com quitosana e carboximetil quitosana melhoraram a resistência mecânica e o alongamento dos filmes à base de gelatina.

Com base nesse estudo e nos resultados obtidos no presente trabalho fica evidente que as antocianinas do ERR colaboram para a reticulação por meio de interações e ligações químicas com o COL, no entanto, apenas o ERR não é suficiente se fazendo necessário a associação do ERR com a VAN para que o processo de reticulação seja eficaz.

5.13.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A Figura 37 apresenta o gráfico de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR 4g, COL/ERR 5g e COL/ERR 8 g imersas em PBS.

Figura 37- Dados de intumescimento das membranas de COL, COL/ERR 4g, COL/ERR 5g e COL/ERR 8g.



A membrana de COL, conforme demonstrado aqui anteriormente (Figuras 20 e 21), demonstrou uma capacidade de intumescimento nas primeiras 6h de ensaio, atingindo cerca de 80% de sua capacidade de intumescimento. Após esse período inicial, o comportamento da amostra estabilizou, mantendo essa taxa de absorção de fluido.

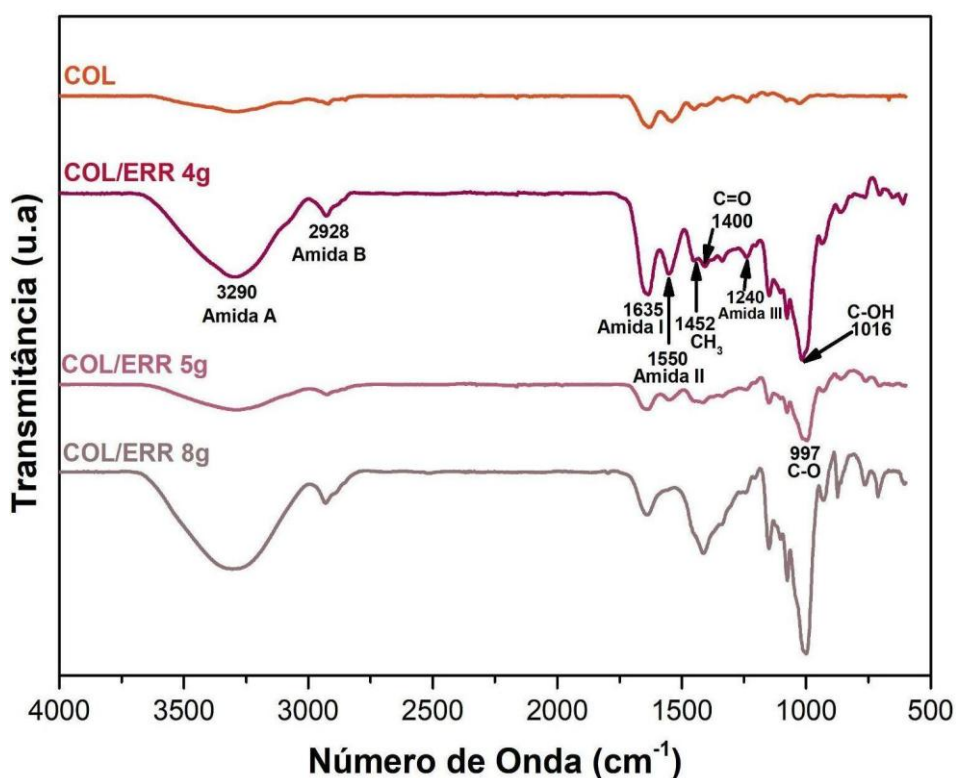
As membranas de COL/ERR (4g, 5g e 8g de ERR), apresentaram comportamentos distintos. A amostra COL/ERR 4g alcançou 0% de intumescimento, enquanto a membrana COL/ERR 5g apresentou 59% e a de COL/ERR 8g alcançou 18% de intumescimento. No entanto, todas as amostras exibiram rápida deterioração. A membrana de COL/ERR 4g não resistiu ao ensaio de intumescimento e as membranas de COL/ERR 5g e 8g não resistiram à primeira hora de ensaio, sugerindo que o ERR compromete a estabilidade estrutural da matriz de COL.

Esses resultados mostram que para o desenvolvimento do *smart wound dressing* utilizando o ERR como indicador de pH, a presença de VAN nas membranas mostrou-se crucial pois confere à membrana estabilidade estrutural e funcional. Atuando como agente reticulador, a VAN promove ligações cruzadas no COL, fortalecendo a matriz, aumentando sua resistência à degradação e garantindo a manutenção de suas propriedades ao longo do tempo.

5.13.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR para este estudo teve como objetivo avaliar os picos tanto do COL quanto do ERR e a associação dos dois componentes. A Figura 38 apresenta os espectros das amostras com diferentes quantidades de ERR, sendo 4g, 5g e 8g.

Figura 38- Espectros de FTIR das membranas de COL com diferentes concentrações de ERR (4g; 5g e 8g de ERR).



A análise de FTIR das amostras contendo COL/ERR (4g, 5g e 8g de ERR demonstrou que as bandas características de COL permaneceram inalteradas em 3290 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , correspondendo à amida A, amida B, amida I, amida II, CH₃ e amida III do COL, respectivamente. O pico em 3290 cm^{-1} está associado tanto à amida A do COL quanto às ligações de hidrogênio (Hidayati *et al.*, 2021), sugerindo novas interações de hidrogênio entre o COL e a cianidina-3- diglicosídeo-5-glicosídeo. O aumento da quantidade de ERR resultou em maior intensidade das bandas observadas.

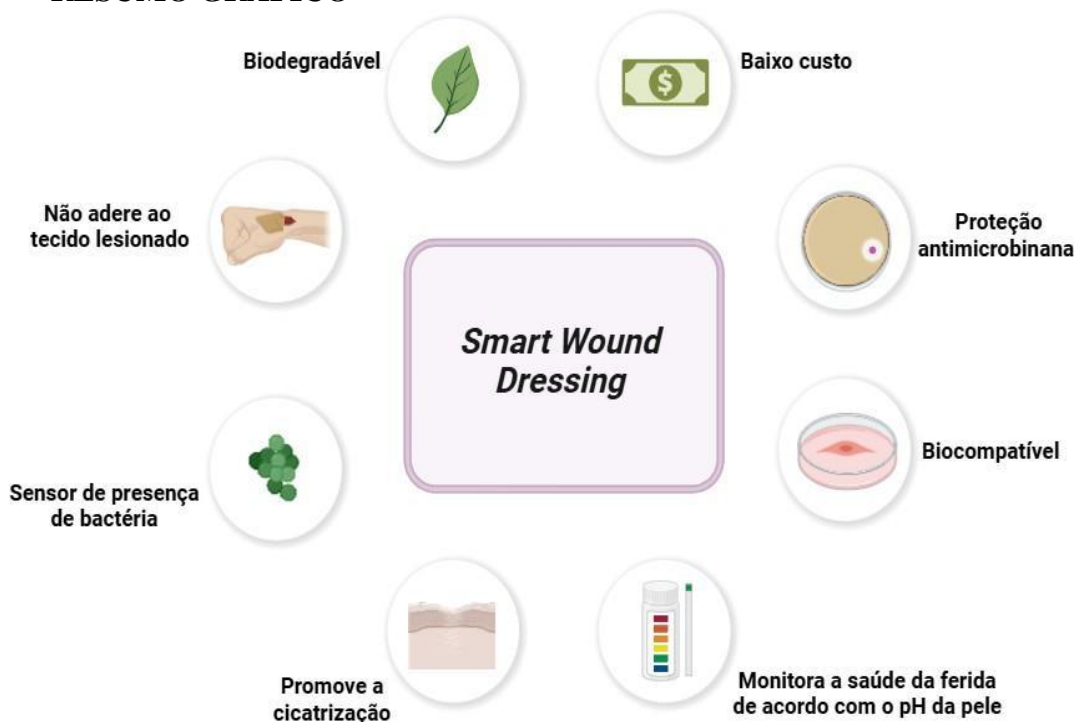
Na amostra COL/ERR 4g, foi identificado um deslocamento da banda em 1024 cm^{-1} (Figura 24) para 1016 cm^{-1} , atribuído à formação de fenol glicosilado (Kim *et al.*, 2023), decorrente da interação entre os açúcares da maltodextrina e a cianidina-3- diglicosídeo-5-glicosídeo presentes no ERR. Houve um deslocamento do pico em 1411 cm^{-1} (Figura 22C) para 1400 cm^{-1} , relacionado à deformação angular C=O de compostos fenólicos (Seke *et al.*, 2022),

sendo este pico mais intenso na membrana COL/ERR 8g. O pico em 997 cm^{-1} nas amostras COL/ERR (5g e 8g) foi associado ao estiramento da ligação C-O dos grupos C-O-C presentes nos anéis de anidroglicose da maltodextrina (Wu *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2022).

Observou-se que, na membrana COL/ERR 8g, a quantidade de ERR excedeu a de COL (2g), resultando em maior conteúdo de glicosídeos e impactando as interações intermoleculares entre as cadeias de COL, consequência disso pode ser observado no manuseio da amostra, a qual se mostrou mais quebradiça. Portanto, a utilização de 3g de ERR em combinação com VAN, mostrou-se mais adequada para preservar a integridade da membrana e suas propriedades mecânicas e funcionais.

O estudo complementar da influência da variação de ERR mostra que para o desenvolvimento do *smart wound dressing* utilizando o ERR como indicador de pH, a presença de VAN nas membranas é fundamental, pois confere à membrana estabilidade estrutural e funcional. Atuando como agente reticulador, a VAN promove ligações cruzadas no COL, fortalecendo a matriz, aumentando sua resistência à degradação e garantindo a manutenção de suas propriedades ao longo do tempo. O ERR, por sua vez, atua na reticulação quando associado à VAN, conforme os resultados aqui apresentados.

6. RESUMO GRÁFICO



7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um *smart wound dressing*, a base de COL/ERR/VAN, capaz de intumescer quando em contato com o exsudato da ferida e indicar o estado desta por meio da mudança de cor pH-dependente. A caracterização do COL por gel de eletroforese por SDS-PAGE revelou ser do tipo 1. Os espectros de UV-Vis confirmaram as bandas de absorção típicas dos componentes do ERR, enquanto a resposta colorimétrica das membranas indicou que o ERR mantém sua capacidade de indicador de pH, mesmo após associado ao COL e à VAN. A reticulação do COL, com formação de uma rede tridimensional, especialmente após a adição de VAN e ERR pode ser observada na análise de MEV e nos histogramas de tamanho e quantidade de poros. A diminuição das propriedades mecânicas observadas por meio do ensaio de tração não reflete ausência de reticulação, mas sim uma reticulação formada por cadeias desorganizadas e densas. A reticulação deve ser otimizada para uma rede mais homogênea. A reticulação do COL teve mais evidências nas análises de FTIR e TGA que mostraram que o ERR e maiores concentrações de VAN resultam em maior reticulação. A análise de DSC evidenciou características térmicas próprias dos materiais utilizados para compor as membranas e, além disso, também evidenciou a reticulação do COL tanto pela VAN quanto pelo ERR, observado pelos deslocamentos das T_g e T_f . O *smart wound dressing* apresentou um menor grau de intumescimento das membranas com ERR, corroborando a reticulação observada no MEV e no FTIR. A análise de ^1H RMN confirmou os sinais característicos estruturais do COL, a integração do ERR e a presença de VAN nas membranas e a reticulação da membrana de COL/ERR/6% VAN. O antibiograma evidenciou que a COL/6% VAN possui efeito antimicrobiano. Além disso, foi possível observar que as membranas são eficazes na detecção de bactérias. O estudo preliminar sobre a variação do ERR mostrou que a presença de VAN é fundamental para a estabilidade estrutural e funcional das membranas, promovendo a reticulação do COL, fortalecendo a matriz e aumentando sua resistência à degradação. O *smart wound dressing* formado por COL/ERR/6%VAN se destacou como a melhor opção para ser utilizada como curativo para monitorar o estado de feridas como queimaduras, sinalizar infecções microbianas e baixo custo.

8. DESAFIOS TÉCNICOS ENFRENTADOS

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, alguns desafios foram enfrentados, como:

- Durante a liofilização do ERR líquido, a presença de antocianinas glicosiladas, compostos com açúcares ligados, comprometeu a formação de um pó manipulável, resultando na obtenção de uma matriz pegajosa e instável. Com base em relatos da literatura, foi identificado o uso da maltodextrina como agente estabilizante, uma estratégia eficaz para superar essa limitação, possibilitando a obtenção de um pó estável e funcional;
- Durante o ensaio de tração, as amostras apresentaram deslizamento, sendo necessário utilizar uma lixa para garantir a fixação adequada;
- No estudo preliminar de concentrações mais elevadas de ERR na membrana de COL comprometem sua integridade, resultando em rachaduras e forte adesão à placa de secagem.

8.1 PERSPECTIVA E SUGESTÃO DE CONTINUIDADE DESSE ESTUDO

- Estudar e otimizar um novo protocolo de reticulação para formação de cadeias organizadas e uma rede de poros homogêneos, melhorando assim, as propriedades mecânicas da membrana;
- Realizar dentre as caracterizações a análise por XPS;
- Realizar ensaio de cicatrização *in vitro*;
- Verificar o potencial bacteriostático do ERR por meio da avaliação de formação de biofilme por MEV e/ou ensaio de cristal violeta visto que a membrana contendo ERR não teve propriedade antimicrobiana;
- Avaliar o efeito analgésico da VAN;
- Avaliar *in vivo* o efeito do *smart wound dressing*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. *et al.* Nano calcium oxide incorporated hydrocolloid dressings for wound care. *Journal of pharmaceutical innovation*, v. 17, n. 1, p. 215–226, 2022.

ADAMIAK, K.; SIONKOWSKA, A. Current methods of collagen cross-linking: Review. *International journal of biological macromolecules*, v. 161, p. 550–560, 2020.

AHMAD, T. *et al.* Recuperação de gelatina de pele bovina com auxílio de pepsina e seus efeitos nas características da gelatina extraída. *Polímeros*, v. 13, n. 10, p. 1554, 2021.

ALAM, M. R. *et al.* Sources, extractions and applications of bio-maker collagen—A review. *Biomedical engineering advances*, v. 4, n. 100064, p. 100064, 2022.

ALAVARSE, A. C. *et al.* Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *International journal of biological macromolecules*, v. 202, p. 558–596, 2022.

ALMEIDA, J. C. *et al.* Obtenção de corante do repolho roxo (*Brassica oleracea*) por dois métodos de extração. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 3, p. 47, 2015.

ALMEIDA, R. G.; DEUTSCH, G.; NOGUEIRA, T. A. Avaliação Dos Curativos Padronizados em um Hospital: Importância Para Dispensação e Manejo em Feridas. *InterSciencePlace*. 2009.

ALMEIDA, R. G.; DEUTSCH, G.; NOGUEIRA, T. A. Avaliação Dos Curativos Padronizados em um Hospital: Importância Para Dispensação e Manejo em Feridas. *InterSciencePlace*. 2021

ALMEIDA, R. G.; GABRIELA THAÍSA, A. Avaliação Dos Curativos Padronizados em um Hospital: Importância Para Dispensação e Manejo em Feridas. *InterSciencePlace*. [s.l: s.n.].

ALMEIDA, R. G.; GABRIELA; THAÍSA, A. Avaliação Dos Curativos Padronizados em um Hospital: Importância Para Dispensação e Manejo em Feridas. *InterSciencePlace*. [s.l: s.n.].

ALMEIDA, R. G.; GABRIELA; THAÍSA, A. Avaliação Dos Curativos Padronizados em um Hospital: Importância Para Dispensação e Manejo em Feridas. *InterSciencePlace*, [s.d.].

ALMEIDA, T. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo: [s.n.].

AL-SHUJA'A, O. *et al.* New strategy for chemically attachment of imine group on multi-walled carbon nanotubes surfaces: Synthesis, characterization and study of DC electrical conductivity. *Journal of materials science and chemical engineering*, v. 05, n. 02, p. 11– 21, 2017.

AMIR, F. *et al.* A multifunctional vanillin-infused chitosan-PVA hydrogel reinforced by nanocellulose and CuO-Ag nanoparticles as antibacterial wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, v. 258, n. Pt 1, p. 128831, 2024.

ARAFI, A. A. *et al.* Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *International journal of biological macromolecules*, v. 182, p. 1820–1831, 2021.

ARAÚJO, A. Obtenção e estabilidade de corante de antocianinas extraídas do repolho roxo (*Brassica oleracea*). 2018.

Assessment of Sorption of Anthocyanins from Red Cabbage onto Bentonites from Patagonia (Argentina). *Minerals*, v. 14. [s.l: s.n.].

AVILA RODRÍGUEZ, M. I.; RODRÍGUEZ BARROSO, L. G.; SÁNCHEZ, M. L.

Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology*, v. 17, n. 1, p. 20–26, 2018.

AZEVEDO, D. E.; CAMPOS, I. Tratamento de feridas: a especificidade das lesões oncológicas. *Saúde e Pesquisa*, 2014.

BARNEA, Y.; WEISS, J.; GUR, E. Uma revisão das aplicações do curativo de hidrofibra com prata (Aquacel Ag®) no tratamento de feridas. *Therapeutics and clinical risk management*, p. 21–27, 2010.

BERNARDO, A. F. *et al.* Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. *Revista Saúde em foco*, p. 1221–1233, 2019.

BEZERRA, C. F. *et al.* Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial pathogenesis*, v. 113, p. 265–268, 2017.

BOGDAN, M.; FLOARE, C. G.; PÎRNAU, A. 1H NMR investigation of self-association of vanillin in aqueous solution. *Journal of physics. Conference series*, v. 182, p. 012002, 2009.

BOIKO, Y. A. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of vanillin derivatives. *Pharmaceutical chemistry journal*, v. 53, n. 7, p. 650–654, 2019.

BORST, R.; MEYAARD, L.; PASCOAL RAMOS, M. I. Understanding the matrix: collagen modifications in tumors and their implications for immunotherapy. *Journal of translational medicine*, v. 22, n. 1, p. 382, 2024.

BREILLY, D. *et al.* Deciphering the enzymatic grafting of vanillin onto lignosulfonate for the production of versatile aldehydes-bearing biomaterials. *International journal of biological macromolecules*, v. 261, n. Pt 2, p. 129814, 2024.

BRETT, D. A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, v. 20, n. 12, p. 347–356, 2008.

BRITO, C. W.; DE, Q. Synthesis and characterization of poly (acrylamide-co-acrylate) and kaolin hydrogel composites: effect of the constitution of different kaolins from northeastern Brazil. *Quimica Nova*, v. 36, p. 40–45, 2013.

BROWN, S. R. Collagen type I: III ratio of the gastroesophageal junction in patients with paraesophageal hernias. *Surgical endoscopy*, v. 25, p. 1390–1394, 2011.

CARVALHO, V. V. L. *et al.* Separation of anthocyanins extracted from red cabbage by adsorption onto chitosan films. *International journal of biological macromolecules*, v. 131, p. 905–911, 2019.

CASTOR, L. R. Propriedades químicas e farmacológica da apocinina, vanilina e ácido vanílico. 2013.

CASTRO, D. E.; FIGUEIREDO, C. Produção de resina trocadora de íons a partir de polietileno reticulado. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, n. 2, p. 71–081, 2017.

CHINH, N. Preparation and characterization of materials based on fish scale collagen and polyphenols extracted from *Camellia chrysantha*. *Vietnam Journal of Science and Technology*, n. 1, p. 72–83, 2023.

COE, H. E.; MACIVOR, V. The stiles dressing: How to protect infants' abdominal dressings from contamination. *The American journal of nursing*, v. 40, n. 3, p. 285, 1940.

COOK, K. A. *et al.* Hydrogels for the management of second-degree burns: currently available options and future promise. *Burns & trauma*, v. 10, 2022.

COUTINHO, M. *et al.* Obtenção de antocianinas presentes no repolho roxo (*Brassica oleracea*). 2002.

CUSSOLIM, P. Mechanisms of resistance of *Staphylococcus aureus* to antibiotics. *Revista faculdades do saber*, p. 831–843, 2021.

DA SILVA, RLCG *et al.* Filmes de quitosana reticulados com vanilina: Os estados da água e o efeito dos carreadores na absorção de curcumina. *Carbohydrate polymers*, v. 292, n. 119725, p. 119725, 2022.

DA TRINDADE, J. L. Envelhecimento da Pele: Revisão Narrativa da Evolução Histológica. [s.l.] PQDT-Global, 2022.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de*. [s.l.] Artmed, 2010.

DAUNTON, C. A history of materials and practices for wound management. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, n. 20, 2012.

DILLER, Robert B.; TABOR, Aaron J. The role of the extracellular matrix (ECM) in wound healing: a review. *Biomimetics*, v. 7, n. 3, p. 87, 2022.

DING, C.; ZHANG, M.; LI, G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. *Carbohydrate polymers*, v. 119, p. 194–201, 2015.

DIOGO; GONÇALVES, L. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, p. 203–206, 2008.

DOS SANTOS, J. E.; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, É. T. G. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives. *Carbohydrate polymers*, v. 60, n. 3, p. 277–282, 2005.

DRISKELL, R. R. *et al.* Defining dermal adipose tissue. *Experimental dermatology*, v. 23, n. 9, p. 629–631, 2014.

ELNAGGAR, Y. S. R. *et al.* Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally

disintegrating tablets and phase transition process. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 2, p. 645–651, 2010.

EYRE, D. R.; WU, J.-J. Collagen cross-links. *Collagen: primer in structure, processing and assembly*. p. 207–229, 2005.

FACHE, M.; BOUTEVIN, B.; CAILLOL, S. Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS sustainable chemistry & engineering*, v. 4, n. 1, p. 35–46, 2016.

FAN, L. *et al.* Deciphering UVA/riboflavin collagen crosslinking: A pathway to improve biomedical materials. *Advanced functional materials*, v. 34, n. 33, 2024.

FIERRI, I. *et al.* Nanoencapsulation of Anthocyanins from Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Capitata f. rubra*) through Coacervation of Whey Protein Isolate and Apple High Methoxyl Pectin. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 9, 2023.

FILHO, C.; DA, S. Potencial terapêutico da vanilina e seus principais metabólitos na regulação da resposta inflamatória e estresse oxidativo. [s.l: s.n.].

FLECK, C. A.; SIMMAN, R. Modern collagen wound dressings: function and purpose. *The journal of the American College of Certified Wound Specialists*, v. 2, n. 3, p. 50–54, 2010.

FRANÇA, L. Avaliação dos custos de um Centro de Tratamento de Queimados. *Rev Bras Queimaduras*, p. 9–16, 2023.

FREITAS, P. A. Desenvolvimento e caracterização de embalagens inteligentes incorporadas com extrato de repolho roxo para indicação colorimétrica. 2018.

FRINHANI, Eduarda de Magalhães Dias. Efeito de antocianinas de uvas roxas (enocianinas) e de antocianinas extraídas de trapoeraba (*Tradescantia pallida*) em ratos normais e diabéticos. 1998.

GAO, J. *et al.* Age-related changes in the ratio of Type I/III collagen and fibril diameter in mouse skin. *Regenerative biomaterials*, v. 10, p. rbac110, 2023.

GELSE, Kolja; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, v. 55, n. 12, p. 1531-1546, 2003.

GHAREAGHAJLOU, N. H.-N.; SOMAYEH; GHASEMPOUR, Z. Sistema nano-

lipossomal baseado na técnica de liofilização de solução monofásica para encapsular extrato rico em antocianina de repolho roxo. *Dyes and Pigments*, v. 202, 2022.

GIL, C. S. *Materiais a base de colágeno com capacidade de autorreparo*. 2013.

GREENHALGH, D. G. Management of burns. *The New England journal of medicine*, v. 380, n. 24, p. 2349–2359, 2019.

GU, L. *et al.* Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends in biotechnology*, v. 37, n. 5, p. 464–491, 2019.

GURTURK, Z. *et al.* Maltodextrin modified liposomes for drug delivery through the blood–brain barrier. *MedChemComm*, v. 8, n. 6, p. 1337–1345, 2017.

HA, H.-J.; 이춘복. Antioxidant and anti-inflammation activity of red cabbage extract. *Culinary science & hospitality research*, v. 20, n. 2, p. 16–26, 2014.

HAVILAND, B. An effective colostomy dressing. *The American journal of nursing*, v. 49, n. 3, p. 154, 1949.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HIDAYATI, D. *et al.* The characteristic of gelatin extracted from the skin of adult and sub-adult striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) using acid-base pretreatment: pH and FTIR. *IOP conference series. Earth and environmental science*, v. 755, n. 1, p. 012018, 2021.

HULMES, D. Construindo moléculas de colágeno, fibrilas e estruturas suprafibrilares. *Journal of structural biology*, p. 2–10, 2002.

HWANG, Y.-J. *et al.* Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels. *ACS applied materials & interfaces*, v. 3, n. 7, p. 2579–2584, 2011.

INBASEKAR, C.; FATHIMA, N. N. Insights into the development of imine-bond- stabilized organic tanning and a heteropolymer for the post-tanning Process—A metal- free sustainable leather process. *ACS sustainable chemistry & engineering*, v. 11, n. 11, p. 4450–4462, 2023.

INDRANI, D. J.; LUKITOWATI, F.; YULIZAR, Y. Preparation of chitosan/collagen blend membranes for wound dressing: A study on FTIR spectroscopy and mechanical properties. IOP conference series. Materials science and engineering, v. 202, n. 1, p. 012020, 2017.

ISSA, Raafat M.; KHEDR, Abdalla M.; RIZK, Helen. ¹H NMR, IR and UV/VIS Spectroscopic Studies of Some Schiff Bases Derived from 2-Aminobenzothiazole and 2- Amino-3-Hydroxypyridine. Journal of the Chinese Chemical Society, v. 55, n. 4, p. 875- 884, 2008.

ISSA, Y. M.; HASSIB, H. B.; ABDELAAL, H. E. ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectral studies of some Schiff bases derived from 3-amino-1, 2, 4-triazole. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 74, n. 4, p. 902-910, 2009.

JUNG, R. E. *et al.* A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. Clinical oral implants research, v. 20, n. 2, p. 162–168, 2009.

JUNIOR, J. A. O.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. Matéria (Rio de Janeiro), v. 19, n. 1, p. 24–32, 2014.

JÚNIOR, Z. S. S. *et al.* Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. Scientific reports, v. 5, n. 1, 2015.

KAJAVE, N. S. *et al.* Dual crosslinking strategy to generate mechanically viable cell- laden printable constructs using methacrylated collagen bioinks. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications, v. 107, n. 110290, p. 110290, 2020.

KAMML, J.; ACEVEDO, C.; KAMMER, D. S. Mineral and cross-linking in collagen fibrils: The mechanical behavior of bone tissue at the nano-scale. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, v. 159, n. 106697, p. 106697, 2024.

KATARZYNA; SIONKOWSKA, A. Current methods of collagen cross-linking. International Journal of Biological Macromolecules, v. 161, p. 550–560, 2020.

KHOO, H. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food & nutrition research. 2017.

KIM, Y.-M. *et al.* Characterization of bioactivity of selective molecules in fruit wines by FTIR and NMR spectroscopies, fluorescence and docking calculations. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 28, n. 16, p. 6036, 2023.

KNÖPKE, L. R. *et al.* Reaction monitoring of heterogeneously catalyzed hydrogenation of imines by coupled ATR-FTIR, UV/Vis, and Raman spectroscopy. *ChemCatChem*, v. 2, n. 3, p. 273–280, 2010.

KONG, H. *et al.* Liquefaction concentration impacts the fine structure of maltodextrin. *Industrial crops and products*, v. 123, p. 687–697, 2018.

KOSSYVAKI, D. *et al.* Colorimetric indicators based on anthocyanin polymer composites: A review. *Polymers*, v. 14, n. 19, p. 4129, 2022.

KUDO, S.; NAKASHIMA, S. Water retention capabilities of collagen, gelatin and peptide as studied by IR/QCM/RH system. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 241, n. 118619, p. 118619, 2020.

KUWAHARA, J. Extraction of type I collagen from *Tilapia* scales using acetic acid and ultrafine bubbles. *Processes* (Basel, Switzerland), v. 9, n. 2, p. 288, 2021.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAKRA, R.; KIRAN, M. S.; SAI, K. P. Fabrication of homobifunctional crosslinker stabilized collagen for biomedical application. *Biomedical materials* (Bristol, England), v. 10, n. 6, p. 065015, 2015.

LEE, C. H.; ANUJ; LEE, Y. Aplicações biomédicas do colágeno. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001.

LIMA, Daniel Inácio de *et al.* Identificação de compostos orgânicos na química de produtos naturais por técnicas de RMN. 2013.

LIZARAZO-FONSECA, L. Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/collagen scaffolds with potential use for skin regeneration. 2019.

LOPES, T. J.; QUADRI, M. B.; QUADRI, M. G. Estudo experimental da Adsorção de

Antocianinas comercial de Repolho-roxo em argilas no processo de batelada. *Brazilian Journal of Food Technology*, n. 9, p. 49–56, 2006.

LU, W.; JIN, Z. Síntese de retardantes de chama intumescentes contendo fósforo/nitrogênio a partir de p-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído para espumas rígidas de poliuretano. *Degradação e estabilidade de polímeros*, v. 195, n. 109768, p. 109768, 2022

MACHADO, M. H. *et al.* Microencapsulation by spray drying of red cabbage anthocyanin-rich extract for the production of a natural food colorant. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 39, n. 102287, p. 102287, 2022.

MANNING, W. R.; FARMER, E. H. Practical cover for wet dressings. *The American journal of nursing*, v. 42, n. 10, p. 1133, 1942.

MARTINS, Talita. Desenvolvimento e caracterização de matrizes compósitas tridimensionais flexíveis de quitosana/vidro bioativo para aplicação potencial no tratamento e regeneração de lesões cutâneas. 2017.

MATHEW-STEINER, Shomita S.; ROY, Sashwati; SEN, Chandan K. Collagen in wound healing. *Bioengineering*, v. 8, n. 5, p. 63, 2021.

MATTIOLI, R. *et al.* Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 25, n. 17, p. 3809, 2020.

MECHAM, R. P. Overview of extracellular matrix. *Current protocols in cell biology*. 2012.

MEDEIROS, W. M. Síntese e caracterização do complexo tetranuclear de cobre com o ligante resorcinareno, 2014.

MEILANG; CHRISTOPHER, J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, p. 119–136, 2015.

MEKONNEN, B. T.; RAGOTHAMAN, M.; PALANISAMY, T. Bifunctional hybrid composites from collagen biowastes for heterogeneous applications. *ACS omega*, v. 2, n. 8, p. 5260–5270, 2017.

MILANOVIC, J. *et al.* Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 1, p. 901–912, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil - 2020/2021. Uma análise da Situação de Saúde e da qualidade da informação. 1ª edição – 2021.

MIOT, L. D. B. *et al.* Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 82, n. 6, p. 529–534, 2007.

MO, X.; ZONGGANG; HANS, J. Electrospun nanofibers of collagen-chitosan and P (LLA-CL) for tissue engineering. *Frontiers of Materials Science in China*, n. 1, p. 20–23, 2007.

MOHAMAD; SIPAUT, C. S.; NN, M. Purification of vanillin by a molecular imprinting polymer technique. *Separation and Purification Technology*, p. 450–456, 2009.

MOLONEY, Micheal *et al.* Red cabbage anthocyanins: The influence of D-glucose acylation by hydroxycinnamic acids on their structural transformations in acidic to mildly alkaline conditions and on the resulting color. *Dyes and Pigments*, v. 158, p. 342–352, 2018.

MONDAL, Bijoy Kumar; GUHA, Falguni; ABSER, Md Nurul. Waste plastics-to-fuel using fly ash catalyst. *Waste Disposal & Sustainable Energy*, v. 3, p. 13–19, 2021.

MOUËS, C. M. *et al.* Five millennia of wound care products--what is new? A literature review. *Ostomy/wound management*, v. 55, n. 3, p. 16–8, 20, 22 *passim*, 2009.

MOURTZINOS, I. *et al.* Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food chemistry*, v. 114, n. 3, p. 791–797, 2009.

MUSSO, Y. S.; SALGADO, P. R.; MAURI, A. N. Filmes de gelatina inteligentes preparados usando extratos de repolho roxo (*Brassica oleracea* L.) como solvente. *Food Hydrocolloids*, v. 89, p. 674–681, 2019.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian journal of science and technology*, v. 4, n. 1, p. 97, 2019.

NASTASHIENKO, N. *et al.* Catalytic pyrolysis of lignin model compounds (pyrocatechol, guaiacol, vanillic and ferulic acids) over nanoceria catalyst for biomass conversion. *Applied sciences* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 16, p. 7205, 2021.

NIERO, E. Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanomas humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta. 2010.

OCAK, B. Development of novel collagen hydrolysate bio-nanocomposite films extracted from hide trimming wastes reinforced with chitosan nanoparticles. *Environmental science and pollution research international*, v. 28, n. 26, p. 35145–35156, 2021.

OCAK, B. Film-forming ability of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes with chitosan. *Environmental science and pollution research international*, v. 25, n. 5, p. 4643–4655, 2018.

OLDE DAMINK, L. H. H. *et al.* Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen- based biomaterials. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 6, n. 8, p. 460– 472, 1995.

OLIVEIRA, J. Géis de colágeno e gelatina do resíduo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para incorporação e liberação controlada in vitro da astaxantina. 2017.

ONO, S. *et al.* Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, v. 41, n. 4, p. 820–824, 2015.

ORTOBOTANICO. *Serre delle piante utili*. 2008.

OUSEY, K. D.; DJOHAN, R.; DOWSETT, C. World Union of Wound Healing Societies consensus document. *Surgical wound dehiscence: improving prevention and outcomes*. February, v. 20, 2018.

PACHECO, M. S. *et al.* A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan, maltodextrin, starch, and others. *International journal of biological macromolecules*, v. 178, p. 504–513, 2021.

PASIYAPPAZHAM; SHANMUGAM, A. Characterization and wound healing property of collagen-chitosan film from *Sepia kobsiensis* (Hoyle, 1885). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 93–102, 2015.

- PATINO, M. G. *et al.* Collagen: an overview. *Implant dentistry*, v. 11, n. 3, p. 280–285, 2002.
- PEIXOTO, Paulo De Sa *et al.* Solid-state NMR study reveals collagen I structural modifications of amino acid side chains upon fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 11, p. 7528-7535, 2013.
- PERCIVAL, S. L. *et al.* The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy: PH and wound repair. *Wound repair and regeneration*, v. 22, n. 2, p. 174–186, 2014.
- PERKASA, D. *et al.* Polymeric biomaterials film based on poly (vinyl alcohol) and fish scale collagen by repetitive freeze-thaw cycles followed by gamma irradiation. *Indonesian Journal of Chemistry*, p. 221–228, 2013.
- PINHEIRO, L. DA S.; BORGES, E. L.; DONOSO, M. T. V. Uso de hidrocolóide e alginato de cálcio no tratamento de lesões cutâneas. *Revista brasileira de enfermagem*, v. 66, n. 5, p. 760–770, 2013.
- POLO, L. *et al.* Antimicrobial activity of commercial calcium phosphate based materials functionalized with vanillin. *Acta biomaterialia*, v. 81, p. 293–303, 2018.
- POTEKAEV, Nikolai N. *et al.* The role of extracellular matrix in skin wound healing. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 5947, 2021.
- PRESTES, R. C. *et al.* CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DE COLÁGENO, GELATINA E COLÁGENO HIDROLISADO. *Revista brasileira de produtos agroindustriais*, v. 15, n. 4, p. 375–382, 2013.
- RAHMAN, M. S. *et al.* Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone. *Progress in biomaterials*, v. 8, n. 3, p. 137–154, 2019.
- RAJU, R. Multifunctional and Smart Wound Dressings - A Review on Recent Research Advancements in Skin Regenerative Medicine. *Pharmaceutics*, v. v. 14, n. 8, 2022.
- REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015.

REKULAPALLY, R. *et al.* Tissue engineering of collagen scaffolds crosslinked with plant based polysaccharides. *Progress in biomaterials*, v. 10, n. 1, p. 29–41, 2021.

RENATA Rea - Natural Lifestyle, 2017.

RIAZ, T. *et al.* FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied spectroscopy reviews*, v. 53, n. 9, p. 703–746, 2018.

RIEMER, T. *et al.* Determination of the glycosaminoglycan and collagen contents in tissue samples by high-resolution ^1H NMR spectroscopy after DCI-induced hydrolysis. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 7, p. 2110–2117, 2012.

RODRIGUES, M. Á. Fibras ultrafinas de colágeno e gelatina: solventes benignos para a produção de potenciais biomateriais biomiméticos por fiação por sopro em solução. 2023.

RODRIGUES, N. Estudo da liberação controlada de fármacos por hidrogel de PVA/Atapulgita. 2023.

RODRÍGUEZ, A, Vanina *et al.* Assessment of Sorption of Anthocyanins from Red Cabbage onto Bentonites from Patagonia (Argentina). *Minerals*, v. 14, n. 2, p. 133, 2024.

ROWAN, M. P. *et al.* Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical care (London, England)*, v. 19, n. 1, p. 243, 2015.

RUONAN; GUO, B. Smart dressings for wound healing. *Nano Hoje*, v. 41, pág. [s.l: s.n.].

RUSSO, A.; VENA, A.; BASSETTI, M. Antibiotic treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. *Current opinion in infectious diseases*, v. 35, n. 2, p. 120–127, 2022.

RYU, I. S. *et al.* Stoichiometric analysis of competing intermolecular hydrogen bonds using infrared spectroscopy. *RSC advances*, v. 8, n. 42, p. 23481–23488, 2018.

SAPUŁA, P.; BIALIK-WĄS, K.; MALARZ, K. Are natural compounds a promising alternative to synthetic cross-linking agents in the preparation of hydrogels? *Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 253, 2023.

SAAVEDRA, Pamela Alejandra Escalante. Perfil epidemiológico e estimativas de custos hospitalares de vítimas de queimaduras. 2021.

SAVESKI, A. Measuring the quantity of anthocyanidins in frozen fruits. 2015.

SCHNEIDER, L. A. *et al.* Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? Archives of dermatological research, v. 298, n. 9, p. 413–420, 2007.

SEKE, F. *et al.* In vitro release of anthocyanins from microencapsulated Natal plum (*Carissa macrocarpa*) phenolic extract in alginate/psyllium mucilage beads. Foods (Basel, Switzerland), v. 11, n. 17, p. 2550, 2022.

SHAH, J. B. The history of wound care. The journal of the American College of Certified Wound Specialists, v. 3, n. 3, p. 65–66, 2011.

SHANMUGASUNDARAM, N. Andaimos poliméricos de colágeno-quitosana para a cultura in vitro de células de carcinoma epidermoide humano. Biomaterials, v. 22, n. 14, p. 1943–1951, 2001.

SHI, S. *et al.* Beeswax coating improves the hydrophobicity of sodium alginate/ anthocyanin/ cellulose nanocrystal indicator film. Food hydrocolloids, v. 144, n. 108930, p. 108930, 2023.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. Collagen structure and stability. Annual review of biochemistry, v. 78, n. 1, p. 929-958, 2009.

SILVA, B. M. Aplicabilidade de curativos de hidrogel com nanopartículas de prata em queimaduras. 2021.

SILVA, D. A.; RAFAEL, L. Vanillin crosslinked chitosan films: The states of water and the effect of carriers on curcumin uptake. Carbohydrate Polymers, v. 292. 2021.

SILVA, T. F. DA; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 71, n. 3, p. 530–539, 2012.

SILVA, W. Biotecnologia da vanilina: Uma revisão sobre suas características e atividades biológicas. Estrabão, p. 112–124, 2023.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, v. 39, n. 11, p. 546, 1962.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; LE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. v. 7, 2007.

SINGER, A. J.; BOYCE, S. T. Burn wound healing and tissue engineering. *Journal of burn care & research: official publication of the American Burn Association*, v. 38, n. 3, p. e605–e613, 2017.

SINGH, D.; VIKRANT; DEVENDRA, K. Regulation of collagen I and collagen III in tissue injury and regeneration. *Cardiology and cardiovascular medicine*. 2023.

SIONKOWSKA, A. Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials*, v. 13, n. 19. 2020.

SOUZA, A. C. Aplicação de membranas de colágeno contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas no processo de cicatrização de queimaduras em áreas especiais. *Revista Brasileira de Queimaduras*, p. 94–99, 2018.

SOUZA, RD de. Estudo dos Pigmentos polares do Extrato das cascas dos Frutos de Manacaru (*Cereus fernambucensis*–Cactaceae). 2013.

SPEAKMAN, J. R. Obesity and thermoregulation. *Handbook of clinical neurology*, v. 156, p. 431–443, 2018.

STANI, C. *et al.* FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 229, n. 118006, p. 118006, 2020.

SUGITA, S. Second harmonic generation light quantifies the ratio of type III to total (I+ III) collagen in a bundle of collagen fiber. *Scientific Reports*, n. 1, 2021.

THONGCHAI, K. *et al.* Integration of collagen into chitosan blend film composites: physicochemical property aspects for pharmaceutical materials. *SN applied sciences*, v. 2, n. 2, 2020.

THYRIYALAKSHMI, P.; RADHA, K. V. Fabrication of chitosan-bis (4-formyl-2 methoxy phenyl carbonate) Schiff base nanoparticles and evaluation of their antioxidant and anticancer properties. *Molecular biology reports*, v. 46, n. 4, p. 4333–4347, 2019.

TRILOKCHANDRAN, B.; VIJAYAKUMAR, G.; THIPPAREDDY, K. S. Formulation and evaluation of cosmetic cream from cabbage extract. *Research journal of pharmacy and technology*, v. 12, n. 8, p. 3589, 2019.

VIEIRAI, R. Primeiros escritos sobre os cuidados de enfermagem em feridas e curativos no Brasil (1916-1947). *Hist*, v. 2017.

VORON'KO, N. G. *et al.* Complexation of κ -carrageenan with gelatin in the aqueous phase analysed by ¹H NMR kinetics and relaxation. *Carbohydrate polymers*, v. 169, p. 117–126, 2017.

VULCANI, V. A. Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona. 2004.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanilina. *Fitoquímica*, 2003.

WANG, Shuo *et al.* Packaging films formulated with gelatin and anthocyanins nanocomplexes: Physical properties, antioxidant activity and its application for olive oil protection. *Food Hydrocolloids*, v. 96, p. 617-624, 2019.

WARBY, R.; CHRISTOPHER, V. Burn classification. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2023.

WARDANA, A. A.; WIDYANINGSIH, T. D. Development of edible films from tapioca starch and agar, enriched with red cabbage (*Brassica oleracea*) as a sausage deterioration bio-indicator. *IOP conference series. Earth and environmental science*, v. 109, p. 012031, 2017.

WILHARM, N. *et al.* Biomimetic crosslinking of collagen gels by energetic electrons: The role of L-lysine. *Acta biomaterialia*, v. 140, p. 219–232, 2022.

WU, D. D. *et al.* Preparation and characterization of maltodextrin-based polyurethane. *Carbohydrate polymers*, v. 194, p. 236–244, 2018a.

- WU, J. *et al.* Thermal behavior of collagen crosslinked with tannic acid under microwave heating. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, v. 135, n. 4, p. 2329–2335, 2019.
- WU, X. *et al.* Improved mechanical properties and thermal-stability of collagen fiber based film by crosslinking with casein, keratin or SPI: Effect of crosslinking process and concentrations of proteins. *International journal of biological macromolecules*, v. 109, p. 1319–1328, 2018b.
- YAN, L.-P. *et al.* Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 95, n. 2, p. 465–475, 2010.
- YOON, S. Production of vanillin from ferulic acid using recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, n. 10, p. 378–384, 2005.
- ZEPON, K. M. *et al.* Smart wound dressing based on κ -carrageenan/locust bean gum/cranberry extract for monitoring bacterial infections. *Carbohydrate polymers*, v. 206, p. 362–370, 2019.
- HANG, X. *et al.* The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell and tissue banking*, v. 15, n. 4, p. 531–541, 2014.
- ZHANG, Z.-H. *et al.* Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. *International journal of biological macromolecules*, v. 81, p. 638–643, 2015.
- ZHANG, Yang *et al.* SEM, FTIR and DSC investigation of collagen hydrolysate treated degraded leather. *Journal of Cultural Heritage*, v. 48, p. 205-210, 2021.
- ZHENG, D. *et al.* A cyclodextrin-based controlled release system in the simulation of in vitro small intestine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 25, n. 5, p. 1212, 2020.