

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**José Filipe Bacalhau Rodrigues**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS  
O-CARBOXIMETILQUITOSANA/PVA/NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)  
PARA TRATAMENTO DE QUEIMADURAS**

Campina Grande – PB

2019

**José Filipe Bacalhau Rodrigues**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS  
O-CARBOXIMETILQUITOSANA/NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) PARA  
TRATAMENTO DE QUEIMADURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renate Maria Ramos Wellen

**Co-orientador:** Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Agência Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Campina Grande – PB

2019

R696s      Rodrigues, José Filipe Bacalhau.  
Síntese e caracterização de Géis O- Carboximetil  
Quitosana/PVA/Nanopartículas de Prata (AgNPS) para tratamento de  
queimaduras / José Filipe Bacalhau Rodrigues. - Campina Grande, 2019.  
145 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -  
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e  
Tecnologia, 2019.

"Orientação: Profa. Dra. Renate Maria Ramos Wellen, Prof. Dr.  
Marcus Vinicius Lia Fook.

Referências.

1. Biomateriais. 2. Biopolímeros. 3. Géis. 4. Formulações  
Semissólidas. 5. Nanopartículas Metálicas. I. Wellen, Renate Maria  
Ramos. II. Lia Fook, Marcus Vinicius. III. Título.

CDU 62:61(043)

## VITAE DO CANDIDATO

- QUÍMICO INDUSTRIAL PELA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - UEPB (2016).

**JOSÉ FILIPE BACALHAU RODRIGUES**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GÉIS O- CARBOXIMETIL  
QUITOSANA/PVA/NANOPARTICULAS DE PRATA (ÁgNPS) PARA  
TRATAMENTO DE QUEIMADURAS**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais como requisito  
parcial à obtenção do título de **Mestre  
em Ciência e Engenharia de  
Materiais.**

Aprovado em: 23/12/2019

*Renate Maria Ramos Wellen*

Dr.<sup>a</sup> Renate Maria Ramos Wellen  
Orientadora  
CGEMAT/UEPB

*Marcus Vinicius Lia Fook*

Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

*Suédina Maria de Lima Silva*

Dr.<sup>a</sup> Suédina Maria de Lima Silva  
Examinadora Interna  
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG

*Maria Roberta de Oliveira Pinto.*

Dr.<sup>a</sup> Maria Roberta de Oliveira Pinto  
Examinadora Externa  
DQ/UEPB

*Paulo César Dantas da Silva.*

Dr. Paulo César Dantas da Silva  
Examinador Externo  
DF/UEPB

**“A *vida* é um instante entre duas eternidades.”**

- Santa Teresinha do Menino Jesus.

## AGRADECIMENTOS

O meu pobre, pequeno e miserável coração agradece:

Ao pequeno e doce menino Jesus, que não me deixou só durante um único instante destes 2 anos e 4 meses, me fazendo entender e viver duas grandes verdades: “A esperança não Engana”. – Rm 5, 5; “Deus não poderia inspirar em mim desejos irrealizáveis”. – Santa Terezinha do Menino Jesus e da Sagrada Face.

A Nossa Senhora, Mãe, Virgem e Rainha, por sempre me reconduzir ao seu filho sendo meu consolo nas horas de dor e sofrimento, *Totus Tuus, Mariae*.

A florzinha branca do Carmelo, Santa Terezinha do Menino Jesus e da Sagrada Face, por sua interceção.

Ao meu santo Anjo, por sua amizade, companhia e proteção.

Ao Grupo de Oração Fonte de Vida, especialmente a Jayme, Kelly, Gian, Flávio, Neide, Padrinho Ricardo, Renata, Juscelino, Rosalia, Ediene, Adriana e Jozirete, pelos momentos e partilhas vividos durante o desenvolvimento deste trabalho e toda minha vida, sem vocês eu não chegaria aqui.

A minha família, em especial a minha mãe Fátima, por seu silencioso apoio e presença durante todo este trabalho, a Senhora sempre sentada do outro lado da mesa, durante toda a escrita deste trabalho foi o maior motivo para ter seguido decididamente. A minha irmã Jussara por acreditar em mim, sempre me incentivando e motivando a dar o meu melhor independente do como eu estivesse. Vos garanto, nossos sonhos não irão parar por aqui, apenas vos peço paciência.

Ao meu orientador: Professor Marcus Vinicius, sua força de vontade, desejo de vencer, palavras de incentivo, correções, conselhos, me inspiram a prosseguir com o desejo de ser um homem melhor, assim como o Senhor uma vez disse: “Erros podemos cometer muitos mas acertar, só precisamos uma vez”.

A minha orientadora, Professora Renate: por ter aceitado orientar um rapaz sonhador que só falava e fala em nanopartículas de prata; pelas reuniões nos sábados; pelas cobranças, sempre perguntando “e como vai o andamento do artigo, Filipe?” ou então, “me envie o *draft* do artigo até data XXX”, espero ter atendido as suas expectativas.

Agradeço a Professora Roberta a qual não tenho adjetivos para expressar suas qualidades, a Senhora é uma pessoa incrível, obrigado por sempre acreditar e confiar em mim.

Agradeço a Wladimir pelo apoio, amizade, preocupação, disposição, cuidado, zelo, carinho e todas as outras formas e maneiras de se manifestar e ser família, queira Deus cada pessoa ter alguém na vida assim como você.

Agradeço ao meu amigo Rosseberg. A sua ausência na minha rotina diária é algo que chega a doer. Agradeço pela amizade, conselhos, conhecimento compartilhado e todos os momentos aos quais você se fez presente durante a construção deste trabalho.

Ao meu grande amigo Marcio Cardoso, hoje, Professor titular. Não conheci ninguém mais humilde e otimista que você. Sempre muito discreto e dedicado aos seus objetivos. Hoje, seu sucesso nos serve de exemplo e motivação. Marcio, obrigado por ser assim, esse é o maior ensinamento que podemos dar.

Ao meu amigo, companheiro, irmão e professor Solomon, palavras não podem expressar o tamanho do meu amor e gratidão que tenho por você, são muitas coisas a agradecer, no entanto irei me reter apenas a uma, o amar. Obrigado por me ensinar todos os dias o que é o amor e o que é ser amor, não sabes tu o tamanho da minha alegria ao ouvir as tuas risadas ao chegar no laboratório. Tens uma capacidade incrível de fazer nascer a esperança em nossos corações, mesmo nos tempos mais difíceis e nebulosos, a você meu companheiro, desejo o céu.

Ao meu querido amigo Pedro Queiroz, sabes bem que o dia só começa com o nosso aperto de mão. Não sei lhe dizer quantas partilhas já fizemos, mas posso dizer-lhe com toda certeza, muitas delas ainda estão por vir, pois, assim como bem dissestes ao fim do mestrado, “eu não vim até aqui pra desistir agora”.

Aos meus amigos e companheiros William e Hermano, agradeço pelas alegrias, medos, angústias, sofrimentos, conquistas e ajudas prestadas na execução deste mestrado, desde as disciplinas até aos ensaios e auxílio na interpretação e discussão dos mesmos, sem vocês esse sonho não seria possível.

Agradeço a Sr Sergio e Antônio, sempre de bom humor com suas brincadeiras e dispostos a auxiliar no que estivesse e não estivesse ao alcance. Bendito seja Deus pela vida de vocês.

Agradeço aos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Cromatografia, Juliana, João Vitor, Lukas, Rafael, David, Bruna, Suelly e Giselly pelo



auxílio, amizade e companheirismo. E especialmente a Rebeca a qual inúmeras vezes que ouviu sobre meu trabalho, corrigiu minhas apresentações e se dispôs a me ajudar. Deus vos conserve.

Agradeço a Raid, Taynah, Antonio, Suellen, Ciro e especialmente a Bianca, Lucas e Eunice por terem sintetizado e fornecido a carboximetilquitosana durante toda a realização desta pesquisa.

Agradeço a André, Prof. Gelmires, Profa. Crislene, Prof. Romualdo, Profa. Lisiane, Prof. Adiles, e todos aqueles professores e servidores que fazem parte do setor de pós-graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais e contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

Agradeço ao Prof Marco Sabino da Universidad Simon Bolivar, pois, através da sua ajuda pude definir o objetivo inicial da pesquisa.

Ao Prof Miguel Ángel Rodríguez do Instituto de Ceramica y Vidrio – CSIC, pelas contribuições a pesquisa por meio da execução das análises de MEV-EC.

A Profa. Simone Simões e Erivan Júnior, responsáveis pelo tratamento, desenvolvimento dos modelos quimiométricos e auxílio nas análises de espectroscopia UV-Vis.

A Profa. Suédina e aos que fazem parte do laboratório Nanopol pelo auxílio nas análises de espectroscopia UV-Vis.

Agradeço à Paula Brandão que me auxiliou nos primeiros passos da pesquisa com grande empenho e dedicação.

A Silvia, Nichollas, João, Klaidson e Valéria pela paciência e auxílio na interpretação e execução dos ensaios.

E agora, agradeço a todos aqueles que fazem parte do CERTBIO: Jaqueline, Dailma, Toninho, Tânia (meus amores), Dayanne, Daniel, Kleilton, André, Rose, Sandra, Igor, Germana, Kylwer, Alanna, Otto, Michelle, Thâmara, Geovanna, Carol, Mairly, Dagoberto, Dayanna, Janette, Ingrid, Davi, Franci, Hugo, André, Maielly, Josué, Maria Eduarda, Raissa, Dona Socorro, Henrique e Paulinha, Deus vos abençoe grandemente.

## RESUMO

A queimadura, termo definido como lesão tecidual provocada pelo calor, é um grande desafio para saúde pública no Brasil e no mundo. Sua ação provoca além da perda tecidual, a possibilidade de infecção gerada pela lesão e por microrganismos, os quais, podem agravar o quadro clínico do paciente caso não sejam devidamente tratados. Portanto, diversos estudos têm sido realizados em busca do desenvolvimento de produtos à base de polímeros que auxiliem no controle da umidade e atividade antimicrobiana da lesão, assim como promovam a cicatrização, reepitelização e prevenção de infecções em pacientes. Dentre estes produtos estão os géis compostos por polímeros sintéticos e/ou naturais. Neste trabalho foi feito o uso de dois polímeros biodegradáveis, um natural (O-carboximetilquitosana) e outro sintético (PVA), associados a nanopartículas de prata (AgNPs). Dessa forma, nanopartículas de prata foram sintetizadas pelo método de redução química de íons de prata com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Em relação aos géis, foram obtidos e estudados géis O-CMQ/PVA/AgNPs através do emprego de soluções PVA/AgNPs em diferentes proporções. As AgNPs foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Potencial Zeta, Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC) e Difração de Raios X (DRX). Propriedades térmicas, químicas e reológicas dos géis O-CMQ/PVA foram estudadas através de ensaios de perda de massa por gravimetria, degradação por Espectroscopia UV-Vis, Análises termogravimétricas (TGA), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e análises reológicas, respectivamente. As propriedades antimicrobianas e citotóxicológicas (Método de difusão em ágar e MTT) das AgNPs, géis O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs foram avaliadas. Como resultados, AgNPs-PVP triangulares com tamanho médio de  $38,17 \pm 1,37$  nm, estáveis e monodispersas (inalteradas durante o período de 1 mês) foram obtidas, não apresentando toxicidade contra células L929 nem atividade antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Géis O-CMQ/PVA apresentaram baixa perda de umidade, tempo de degradação de 1 dia, comportando-se como fluido newtoniano. Os géis e extratos O-CMQ/PVA/AgNPs não apresentaram toxicidade em nenhuma de suas composições, em contrapartida, não foram observadas atividade antimicrobiana dos mesmos contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Isto posto, foram obtidos géis O-CMQ/PVA/AgNPs atóxicos, com propriedades reológicas, físicas e químicas promissoras para o emprego no tratamento de queimaduras e lesões em geral, no entanto, estudos microbiológicos envolvendo a concentração de AgNPs devem continuar sendo realizados para proporcionar o controle microbiológico durante sua aplicação.

**Palavras-chave:** Biomateriais. Biopolímeros. Géis. Formulações semissólidas. Nanopartículas metálicas.

## ABSTRACT

Burns, a term defined as tissue damage caused by heat, is a big public health challenge in Brazil and worldwide. A burn causes besides tissue loss, the possibility of infection generated by lesion and microorganisms, which can aggravate the patient's clinical condition if not properly treated. Therefore, several studies have been conducted in search of the development of products based on polymers that help in the moisture and microbiological activity control of the lesion, as well as to promote the cicatrization, reepithelization and infection prevention in patients. Among these products are gels made of synthetic and/or natural polymers. In this work, we made use of two biodegradable polymers, a natural (O-carboxymethylchitosan – O-CMQ) and synthetic (polyvinyl alcohol - PVA), associated with silver nanoparticles. Thus, silver nanoparticles were synthesized by the chemical reduction method of silver ions with sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ), in the presence of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), polyvinylpyrrolidone (PVP) and sodium citrate (SCT). With regard to the gels, we obtained and studied O-CMQ/PVA/AgNPs gels by using PVA/AgNPs solutions in different proportions. Silver nanoparticles (AgNPs) were characterized by UV-Vis Spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential, Atomic Force Microscopy (AFM), Field Emission Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Diffraction (XRD). Thermal, chemical and rheological properties of O-CMQ/PVA gels were studied by gravimetry mass loss assays, UV-Vis Spectroscopy degradation kinetics, thermogravimetric analysis (TGA), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and rheological analysis, respectively. The antimicrobial and cytotoxicological properties (Agar Diffusion Method and MTT) of AgNPs, O-CMQ/PVA and O-CMQ/PVA/AgNPs gels were evaluated. As results, stable and monodisperse triangular AgNPs-PVP with an average size of  $38,17 \pm 1,37$  nm (unchanged over 1 month) were obtained, showing no toxicity against L929 cells or antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922). O-CMQ/PVA gels showed low moisture loss, degradation time of 1 day, behaving like Newtonian fluid. The O-CMQ/PVA/AgNPs extracts and gels showed no toxicity in any of their compositions, however, was not observed microbiological activity against *S. aureus* and *E. coli* strains. Thus, we obtained non-toxic O-CMQ/PVA/AgNPs gels with promising rheological, physical and chemical properties for use in the treatment of burns and injuries in general. However, microbiological studies involving the required AgNPs concentration for this gel should continue with the aim of providing microbiological control during its application.

**Keywords:** Biomaterials. O-carboxymethylchitosan. PVA. Gels. Silver nanoparticles. Burns.

## PUBLICAÇÕES

RODRIGUES, J. F. B.; BRANDÃO, P. E. D. S.; GUIMARÃES, P. Q.; PINTO, M. R. D. O.; FOOK, M. V. L. **Estatística Aplicada A Química: Síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs)**. In: III Encontro de Educação, Ciência e Tecnologia – ENECT. Campina Grande – PB 2018.

RODRIGUES, J. F. B.; BRANDÃO, P. E. D. S.; GUIMARÃES, P. Q.; PINTO, M. R. D. O.; WELLEN, R. M. R.; FOOK, M. V. L. **Aplicação de método estatístico no estudo da influência do peróxido de hidrogênio e do borohidreto de sódio na síntese de nanopartículas de prata (AGNPS)**. In: X Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomaterias – COLAQB. João Pessoa – PB 2018.

RODRIGUES, J. F. B.; WELLEN, R. M. R.; PINTO, M. R. D. O.; FOOK, M. V. L. **Estudo das propriedades térmicas, físicas e morfológicas de arcabouços de amido/Nanopartículas de prata (AgNPs)**. In: II Simpósio de Biomateriais do Nordeste. Campina Grande – PB 2019.

RODRIGUES, J. F. B.; BRANDÃO, P. E. D. S.; GUIMARÃES, P. Q.; PINTO, M. R. D. O.; WELLEN, R. M. R.; FOOK, M. V. L. Aplicação de método estatístico no estudo da influência do peróxido de hidrogênio e do borohidreto de sódio na síntese de nanopartículas de prata (AGNPS). **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 3, 2019.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Unidades estruturais da quitosana: (a) N-acetilglucosamina; (b) glucosamina (Gu <i>et al.</i> , 2018; Shandil <i>et al.</i> , 2018). .....	27
Figura 2 - Estrutura química da O-CMQ (Wu <i>et al.</i> , 2008).....	28
Figura 3 - Estrutura química do PVA (Bergo <i>et al.</i> , 2009).....	29
Figura 4 – Representação da síntese de AgNPs.....	33
Figura 5 - Esquema de formação do gel O-CMQ/PVA/AgNPs. Adaptado de Gholamali <i>et al.</i> (2019). .....	40
Figura 6 - a) Comportamento do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs em função da variação de NaBH <sub>4</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . b) Linha de tendência do diâmetro hidrodinâmico em função do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . c) Linha de tendência do diâmetro hidrodinâmico em função do NaBH <sub>4</sub> . .....	49
Figura 7 - Polidispersividade versus Diâmetro. a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e b) NaBH <sub>4</sub> . .....	51
Figura 8 - Comportamento do potencial zeta diante das variações de: a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e b) NaBH <sub>4</sub> . .....	51
Figura 9 - Intervalo de confiança do Teste exato de Fisher relativo à diferença das médias de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta para: volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e concentração de NaBH <sub>4</sub> em função dos valores da estatística do Teste exato de Fisher.....	52
Figura 10 - Espectro UV-Vis das amostras de AgNPs padrão e centrifugadas a a) 6000 rpm b) 8000 rpm e c) 10000 rpm. ....	54
Figura 11 - Estabilidade de AgNPs preparadas com solução de PVP 0,33% (m/v) frente a solução simulante a) 0,112 M de NaCl em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v) e b) solução tampão fosfato salino (PBS) a 0,005 M em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v). ..	55
Figura 12 - Espectro UV-Vis de AgNPs estabilizadas com PVP a a) 0,017% (m/v), contaminadas com PBS no tempo de 0D e 7D e b) 0,033% (m/v), contaminadas com PBS no tempo de 0D e 7D. ....	57
Figura 13 - a) Valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2 versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro e b) valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2-JK versus valores medidos pelo método de referência para a polidispersividade.....	58
Figura 14 – Espectro UV-Vis da solução de AgNPs obtida através da condição padrão.....	60
Figura 15 – Espectro UV-Vis das 12 soluções de AgNPs obtidas através da condição padrão de síntese. ....	61

Figura 16 - a) Distribuição da média do tamanho de partículas b) Distribuição da média da polidispersividade c) Distribuição da média dos índices de potencial zeta.	64
Figura 17 - Representação do potencial zeta das AgNPs em função do tempo. Período de análise: 17/09/2018 à 14/12/2018.	65
Figura 18 - Microscopia de força atômica de nanopartículas de prata em vidro; área digitalizada 1 $\mu\text{m}$ x 1 $\mu\text{m}$ : (A) topografia 2-D; (B) topografia em 3-D; (C) perfis de altura ao longo das linhas indicadoras.	66
Figura 19 - Difratoograma de nanopartículas de prata preparadas em porta amostra de mica.	68
Figura 20 - Imagens de MEV-EC e histograma de distribuição de partículas.	69
Figura 21 - Espectro infravermelho da O-CMQ.	72
Figura 22 - Curvas de perda de massa para gel de O-CMC 10% e preparado com 0.1, 0.5 e 1% de PVA.	73
Figura 23 - Análises de TGA dos Géis O-CMQ e O-CMQ/PVA.	76
Figura 24 - Análises de DTG dos Géis O-CMQ e O-CMQ/PVA.	76
Figura 25 – Espectros de FTIR para as amostras de géis úmidos logo após seu preparo.	78
Figura 26 - Esquema das ligações intermoleculares e intramoleculares de hidrogênio entre o PVA e a quitosana (Alhosseini <i>et al.</i> , 2012).	79
Figura 27 - Espectros de FTIR para as amostras de géis secos logo após serem secos em estufa a 37°C.	80
Figura 28 - Espectro FTIR para a amostra O-CMQ/PVA 1% correspondente ao a) gel umedecido durante 05 ciclos e b) gel seco durante 05 ciclos.	81
Figura 29 - Espectro UV-Vis para os géis O-CMQ/PVA a) 0.1%, b) 0.5% e c) 1%. ...	83
Figura 30 - Curvas de absorvância em função do tempo para os géis de O-CMC com 0.1, 0.5 e 1% de PVA.	83
Figura 31 - Evolução da deformação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda " $G''$ ") para as amostras a) O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs 50%. b) Curva de viscoelasticidade dinâmica complexa em função da deformação para as amostras O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs 50%.	88
Figura 32 - Imagens do teste de Atividade antimicrobiana das nanopartículas e do Gel frente à cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 para os meios Mueller Hinton Broth (MH) e Tryptic Soy Broth (TSB) respectivamente.	90

Figura 33 - Imagens do teste de Atividade antimicrobiana das nanopartículas e do Gel frente à cepa de E. coli ATCC 25922 para os meios Mueller Hinton Broth (MH) e Tryptic Soy Broth (TSB) respectivamente. ....	91
Figura 34 - Imagens com 100 vezes de aumento da linhagem celular L929 das zonas de descoloração de materiais experimentais no teste de difusão em ágar: controle positivo (látex tóxico) (A), controle negativo (PEAD) (B), Gel OCMQ/PVA (C), Gel OCMQ/PVA/ AgNPs 1%(D), Gel OCMQ/PVA/ AgNPs 3% (E), Gel OCMQ/PVA/ AgNPs 5% (F), AgNPs (G), molde PLA (H).....	97
Figura 35 - Citotoxicidade via ensaio de MTT das amostras de AgNPs e géis O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs. ....	101
Figura 36 - Fluxograma das etapas para a construção dos modelos de calibração multivariada.....	136
Figura 37 - Faixa de variação de diâmetro em relação as amostras. ....	137
Figura 38 – Faixa de variação de Polidispersividade em relação as amostras. ....	137
Figura 39 - Espectros das amostras de AgNPs, sem pré-tratamentos.....	138
Figura 40 - Espectros das amostras de AgNps com pré-tratamentos (D1-J15-P2). ....	142
Figura 41 - Gráfico de Influência em (a) X, em (b) Y para polidispersividade.....	142
Figura 42 - Gráfico de Influência em (a) X, em (b) Y para diâmetro. ....	143
Figura 43 - Gráfico dos valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2 versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro. ....	146
Figura 44 - Gráfico dos valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2-JK versus valores medidos pelo método de referência para a polidispersividade.....	147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações de concentração e volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e NaBH <sub>4</sub> utilizados na síntese. ....	34
Tabela 2 - Definição das concentrações e volumes padrões de NaBH <sub>4</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para síntese de AgNPs. ....	35
Tabela 3 - Definição das condições de síntese padrões para AgNPs-PVP.....	37
Tabela 4 – Proporção e quantidade dos reagentes utilizados no estudo exploratório do gel. ....	39
Tabela 5 - Informações correspondentes as proporções e códigos das amostras estudadas. ....	40
Tabela 6 - Valores de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta para síntese padrão de AgNPs.....	62
Tabela 7 - Dados de diâmetro de partícula e espessura da da camada de estabilizantes presentes nas AgNPs. ....	70
Tabela 8 - Distribuição das amostras/ Leitura das placas.....	95
Tabela 9 - Variações de volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	132
Tabela 10 - Variação da concentração de NaBH <sub>4</sub> . ....	133
Tabela 11 - Variação do volume de NaBH <sub>4</sub> . ....	133
Tabela 12 - Variação de volume de AgNO <sub>3</sub> . ....	133
Tabela 13 - Variação do volume de Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> . ....	134
Tabela 14 - Variação da concentração de Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .....	134
Tabela 15 - Pré-processamentos espectrais e figuras de mérito para diâmetro.....	140
Tabela 16 - Pré-processamentos espectrais e figuras de mérito para polidispersividade.....	141
Tabela 17 - Figuras de mérito para os modelos destinados a predição de diâmetro. ....	144
Tabela 18 - Figuras de mérito para modelos destinados a predição de polidispersividade.....	145



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AgNPs	Nanopartículas de Prata
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
CMQ	Carboximetilquitosana
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
EMSC	Extensão da Correção do Espalhamento Multiplicativo
UV-Vis	Espectrometria de Ultravioleta e Visível
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
MM	Massa Molecular
MSC	Correção do Espalhamento Multiplicativo
NaBH <sub>4</sub>	Borohidreto de Sódio
O-CMQ	O-Carboximetilquitosana
PEG	Poli(etileno)glicol
PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RMSEC	Raiz dos Erros Quadráticos Médios de Calibração
RMSEP	Raiz dos Erros Quadráticos Médios de Previsão
SCT	Citrato de Sódio
SNV	Varição Normal Padrão
TGA	Termogravimetria
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	Queimaduras.....	23
2.2	Curativos destinados ao tratamento de queimaduras .....	24
2.3	Biomateriais .....	25
2.4	Biopolímeros .....	25
2.4.1	Quitosana .....	26
2.4.2	O-carboximetilquitosana .....	28
2.5	Álcool polivinílico (PVA) .....	29
2.6	Géis .....	30
2.7	Nanopartículas de prata (AgNPs).....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1	Materiais .....	33
3.2	Metodologia.....	33
3.2.1	Síntese das AgNPs.....	33
3.2.2	Preparação da O-CMQ.....	37
3.2.3	Preparação do Gel O-CMQ/PVA .....	37
3.2.4	Preparação do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs.....	39
3.3	Caracterização das AgNPs .....	41
3.3.1	Estudo da Influência do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e NaBH <sub>4</sub> na síntese de AgNPs .....	41
3.3.2	Estudo da aplicação de PVP na síntese de AgNPs.....	41
3.3.3	Modelo de Calibração Multivariada .....	41
3.3.4	Espectroscopia UV-Vis .....	42
3.3.5	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ) .....	42
3.3.6	Repetibilidade – Teste de Tukey.....	42

3.3.7	Teste F .....	43
3.3.8	Estudo de estabilidade.....	43
3.3.9	Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	43
3.3.10	Difração de Raios X (DRX) .....	44
3.3.11	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC) .....	44
3.4	Caracterização da O-CMQ .....	44
3.4.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	44
3.5	Caracterização do Gel O-CMQ/PVA.....	44
3.5.1	Avaliação gravimétrica de perda de umidade.....	44
3.5.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	45
3.5.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	45
3.5.4	Estudo da degradação por espectroscopia UV-Vis .....	45
3.6	Caracterização do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs.....	46
3.6.1	Teste de Espalhabilidade.....	46
3.6.2	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	46
3.6.3	Ensaio de MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) .....	47
3.6.4	Ensaio de citotoxicidade in vitro - Método de difusão em ágar .....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1	Caracterização das AgNPs .....	49
4.1.1	Estudo da Influência do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e NaBH <sub>4</sub> na síntese de AgNPs .....	49
4.1.2	Estudo da aplicação de PVP na síntese de AgNPs.....	53
4.1.3	Modelo de Calibração Multivariada .....	58
4.1.4	Espectroscopia UV-Vis .....	59
4.1.5	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ) .....	61
4.1.6	Repetibilidade – Teste de Tukey.....	63

4.1.7	Estudo de estabilidade.....	64
4.1.8	Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	66
4.1.9	Difração de Raios X (DRX) .....	67
4.1.10	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC) .....	69
4.2	Caracterização da O-CMQ .....	71
4.2.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	71
4.3	Caracterização do Gel O-CMQ/PVA.....	72
4.3.1	Avaliação gravimétrica de perda de umidade.....	72
4.3.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	75
4.3.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	77
4.3.4	Estudo da degradação por espectroscopia UV-Vis .....	82
4.3.5	Correlação entre a perda de umidade e degradação dos géis O-CMQ/PVA segundo a ótica de aplicação como curativo .....	85
4.4	Caracterização do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs.....	87
4.4.1	Teste de Espalhabilidade.....	87
4.4.2	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	90
4.4.3	Ensaio de citotoxicidade in vitro - Método de difusão em ágar .....	94
4.4.4	Ensaio de MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) .....	100
5	CONCLUSÃO .....	103
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	104
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
	APÊNDICE I – Desenvolvimento de modelo de calibração multivariada para determinação de polidispersividade e diâmetro de AgNPs utilizando espectroscopia UV-Vis e quimiometria.....	132

## 1 INTRODUÇÃO

A lesão, termo caracterizado por uma ação anômala no tecido biológico, quando causada por queimadura, é suscetível à infecção, devido ao comprometimento da integridade da pele causando redução da imunidade (Church *et al.*, 2006; Sohrabi *et al.*, 2016). Estudos demonstram que 75% dos principais casos de morte provenientes de queimaduras estão relacionadas a infecções (Sevgi *et al.*, 2013).

Diversos estudos foram realizados em busca do desenvolvimento de produtos à base de polímeros, que promovam o controle microbiológico e a prevenção de infecções em pacientes (Upadhyaya *et al.*, 2013). Dentre estes produtos estão andaimes (*scaffolds*) (Duarte *et al.*, 2010), nanopartículas (Csaba *et al.*, 2009), micropartículas (Lameiro *et al.*, 2006), géis (Rajiv *et al.*, 2017), membranas (Beppu *et al.*, 2007) e nanofibras (Homayoni *et al.*, 2009).

Polímeros biocompatíveis, como o amido, celulose, quitosana e seus derivados são potenciais candidatos para produtos destinados à saúde (Wang *et al.*, 2017). Entre os vários biopolímeros, a quitosana, um polímero natural biodegradável, biocompatível, com ação antimicrobiana obtida através da quitina (Muzzarelli *et al.*, 2012; Saikia e Gogoi, 2015; Djerahov *et al.*, 2016), composto por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose que se liga com  $\beta$ - (1-4) glicosídico (Kadir *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017) tem sido bastante estudada. Todavia, dentre os derivados da quitosana, a o-carboximetilquitosana (O-CMQ), apresenta biocompatibilidade, melhor propriedade antimicrobiana, bem como, superior solubilidade em água, promovendo melhor controle microbiológico e prevenção de infecções em pacientes (Fei Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012).

O-carboximetilquitosana é um derivado da quitosana resultante da substituição do grupo carboximetil (-COOCH<sub>3</sub>) pelo hidrogênio presente nos grupos hidroxilo primários ou secundários e grupos amino ligados à unidade de glucopiranosose (Riva *et al.*, 2011). É solúvel na faixa de pH entre 1,4 e 6,6 (De Abreu e Campana-Filho, 2009), estimula a produção de fibroblastos (Chung *et al.*, 2003), possui capacidade de formação de gel aprimorada (Jayakumar *et al.*, 2010) e afinidade com nanopartículas metálicas (Djerahov *et al.*, 2016).

A O-CMQ quando em estado de gel e em contato com a pele apresenta uma rápida perda de água, abrindo espaço para a preparação de biomateriais à base de O-CMQ com outros polímeros. Nesse contexto, o álcool polivinílico (PVA), um polímero sintético, com transparência, não tóxico, solúvel em água e já bastante utilizado na indústria farmacêutica, surge como uma promissora alternativa para melhorar a retenção de água de géis de O-CMQ.

Pesquisas atuais estão desenvolvendo géis alternativos à base de CMQ aplicados na área médica (Sohrabi *et al.*, 2016; Rajiv *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Trabalhos com hidrogéis de carboximetilquitosana (CMQ) carregados com nanopartículas de prata (AgNPs) (Mohamed e Sabaa, 2014), uso de carboximetilquitosana/Epóxi-etano como agente redutor e estabilizante para obtenção de AgNPs (Fouda *et al.*, 2013), emprego de tecido de algodão antibacteriano a base de carboximetilquitosana/AgNPs (Xu *et al.*, 2017) e hidrogéis a base de carboximetilquitosana/PVA/AgNPs *in situ* (crescimento de nanopartículas no interior dos hidrogéis) voltados a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos (Gholamali *et al.*, 2019). Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que relatem a incorporação de AgNPs com informações sobre morfologia, tamanho e estabilidade já definidas incorporadas em um gel de O-CMQ/PVA caracterizando esta como uma proposta inovadora na aplicação desses materiais para a formulação de um gel destinado ao recobrimento de queimaduras.

A síntese de AgNPs com tamanho, morfologia e estabilidade controladas, incorporadas a um gel O-CMQ/PVA biocompatível, biodegradável, bioabsorvível, que auxilie na redução da dor, estimule a epitelização, atue no controle da umidade, retenção de exsudato de queimaduras e que possua propriedades de barreira frente a microrganismos, se apresenta como uma oportunidade de obtenção de um material com potencial para aplicação na área médica. Neste estudo, nanopartículas de prata, O-CMQ e PVA foram empregados na produção do gel O-CMQ/PVA/AgNPs. O objetivo do trabalho foi preparar e caracterizar um gel a base de O-CMQ/PVA/AgNPs destinado ao uso no tratamento de queimaduras.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Queimaduras

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 180.000 mil mortes por ano estão relacionadas a queimaduras (Pereira *et al.*, 2013) e aproximadamente 11 milhões de casos necessitam de tratamento especializado em todo mundo. No Brasil, dos anos de 2000 a 2014 cerca de 412.541 internações por queimaduras (256.149 homens e 156.391 mulheres) foram registradas, numa média de 27.503 internações por ano (Santos *et al.*, 2017).

A queimadura, definida como uma lesão tecidual provocada pelo calor, é um grande desafio para saúde pública do Brasil e no mundo. Pacientes com queimaduras representam uma população altamente suscetível à infecção por microrganismos, fato este resultado do rompimento da barreira normal da pele e redução da imunidade (Erol *et al.*, 2004). Tratamentos como a excisão de queimaduras e o enxerto de pele resultam em uma melhora significativa de pacientes com queimaduras graves. Não obstante, uma lenta cicatrização, infecção, a dor e a cicatriz hipertrófica se apresentam como um grande desafio a ser vencido pela pesquisa (Wang *et al.*, 2018).

Os organismos patógenos são os principais responsáveis pelas infecções (Issler-Fisher *et al.*, 2016), dividindo-se em gram-positivos e gram-negativos (causa da maioria das infecções) (Azzopardi *et al.*, 2014). *Staphylococcus aureus* é considerado o principal causador de infecções dentre as bactérias gram-positivas e, devido ao emprego inadequado de antibióticos estes organismos se tornaram resistentes a múltiplas drogas, de modo que, atualmente, seu tipo resistente a metilina (MRSA) é considerado um dos maiores desafios nos centros de tratamento para queimaduras. (Norbury *et al.*, 2016).

Como uma possível solução para o tratamento de queimaduras, a engenharia de tecidos fornece uma nova possibilidade, objetivando a redução do tempo de cicatrização (Chua *et al.*, 2016). Para tanto, os polímeros naturais combinados com nanopartículas metálicas tem sido amplamente estudados para aplicação nos mais diversos materiais como esponjas, filmes (Ji *et al.*, 2016), nanocompósitos (Luna-Hernandez *et al.*, 2017) e hidrogéis (Zhai *et al.*, 2018).

## 2.2 Curativos destinados ao tratamento de queimaduras

O método ideal para tratamento de queimaduras é aquele que, ao mesmo tempo, controla o crescimento bacteriano, remove o tecido desvitalizado e estimula o crescimento de queratinóticos (Moncrief *et al.*, 1966; Afshari *et al.*, 2018). No entanto, até o momento nenhuma dessas três exigências foram atingidas em um único material, não existindo assim um material ideal. Dentre os protocolos de tratamento de queimaduras estão os curativos úmidos, películas de proteção, curativos oclusivos, escarotomia, tratamento cirúrgico precoce, tratamento cirúrgico segundo a profundidade e extensão e escarotomia tangencial, sendo cada um selecionado e aplicado de acordo com a gravidade e grau de queimadura do paciente.

Dentre os tipos de tratamento, curativos oclusivos são os mais utilizados em todo mundo, tendo como principal característica o baixo custo (Lima, 2019). O mesmo deve permitir a absorção do exsudado de modo a manter a ferida seca, limpa, evitando a contaminação bacteriana da ferida; fornecer condições de umidade que favoreçam o crescimento das células epiteliais, evitando a penetração de microrganismo; e fornecer uma proteção aos raios ultravioleta (Ubbink *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2018). Este tipo de tratamento é indicado para todas as áreas do corpo, exceto o rosto e genitais visto que as secreções destas regiões exigem trocas frequentes, sendo o curativo úmido mais indicado para tratamento destas áreas (Downie *et al.*, 2010).

Diante da necessidade de atender aos vários tipos de tratamentos de queimaduras, grande é a quantidade de estudos realizados buscando a confecção de biomateriais destinados a este fim, são eles, hidrogéis (Grippaudo *et al.*, 2010; Piatkowski *et al.*, 2011; Hoeksema *et al.*, 2013), pomadas (Hirsch *et al.*, 2008; Mabrouk *et al.*, 2012), membranas amnióticas (Adly *et al.*, 2010; Bujang-Safawi *et al.*, 2010; Singh e Chacharkar, 2011), curativos com sulfadiazina de prata e prata nanoparticulada (Piatkowski *et al.*, 2011; Abedini *et al.*, 2013; Ferreira e Paula, 2013; Verbelen *et al.*, 2014), dentre outros. Muitos destes biomateriais usam prata em sua composição devido a suas propriedades bactericidas, no entanto, nenhum deles faz uso de O-CMQ juntamente com AgNPs para o tratamento de queimaduras.

O curativo proposto nesta pesquisa é do tipo oclusivo e visa controlar o ambiente da ferida, favorecendo seu processo de cicatrização, absorvendo o



exsudato, manter a ferida úmida para proporcionar um microclima para crescimento celular e favorecer o processo de reepitelização.

### **2.3 Biomateriais**

Os biomateriais podem ser conceituados como materiais destinados a interagir com sistemas biológicos para tratar, avaliar, melhorar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Nair e Laurencin, 2005; Kumbhar e Pawar, 2017). Devem ser atóxicos, anticarcinogênicos, antimutagênicos, não desencadear uma resposta imune, e, principalmente, biocompatíveis. (Tomaz, 2017).

A biocompatibilidade é dita como a capacidade que o material possui em executar uma resposta adequada ao hospedeiro diante de uma aplicação específica. Além disso, o biomaterial deve possuir a habilidade de ser suportado pelo corpo e não causar reações adversas em curto e longo prazo. Com o passar dos anos uma grande quantidade de materiais, tais como: cerâmicas (Serre *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2010; Touri *et al.*, 2018), metais (Roddie e Adam, 1992; Verissimo *et al.*, 2015; Bekmurzayeva *et al.*, 2018), polímeros (Chen e Tan, 2006; Jankaew *et al.*, 2015) e compósitos (Li, X. *et al.*, 2012; Wahid *et al.*, 2016) foram avaliados como biomateriais.

Dentre as classes de materiais, os polímeros se destacam para aplicação como biomaterial devido à capacidade de modificar e adequar suas propriedades as características exigidas à aplicação de interesse (Mohan *et al.*, 2016; Roskies *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2018).

### **2.4 Biopolímeros**

Nos últimos anos, polímeros naturais e sintéticos vêm sendo empregados em aplicações biomédicas, incluindo dispositivos médicos biodegradáveis ou descartáveis, como as bombas de sangue, válvulas cardíacas, curativos, entre outros. Dentre estes polímeros, os do tipo natural são cada vez mais utilizados na área da saúde, isto devido ao fato de serem obtidos de recursos renováveis e ecológicos, além da biocompatibilidade (Dash *et al.*, 2011; Bierbrauer *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2018).

Os biopolímeros são definidos como polímeros ou copolímeros produzidos através de matérias-primas de fontes renováveis, como: amido, celulose, quitina e outros (Brito *et al.*, 2011). Devido ao aumento do consumo do combustível fóssil, limitação de recursos, flutuação dos preços e os impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção de polímeros, têm favorecido uma mudança considerável na utilização de materiais biodegradáveis (Ashter, 2016).

Dentre os polímeros biodegradáveis estão a quitosana (Gabriel *et al.*, 2017), o amido (Cano *et al.*, 2016), a celulose (Bhandari *et al.*, 2017) e o ácido hialurônico (Lee *et al.*, 2017). Estes apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades bactericidas, fungicidas e antimicrobianas que permitem a substituição de alguns polímeros obtidos de fontes fósseis. Contudo, apesar de todas as vantagens, estes biopolímeros possuem limitações técnicas. Dessa forma, grupos de pesquisa veem se dedicando na modificação destes biopolímeros para melhorar suas condições de processamento de modo a aumentar sua gama de aplicações.

#### **2.4.1 Quitosana**

A quitosana é um biopolímero biodegradável, biocompatível, com ação antimicrobiana obtido através da quitina (Muzzarelli *et al.*, 2012; Saikia e Gogoi, 2015; Djerahov *et al.*, 2016). É composto por N-acetil-2-desoxi-D-glucosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, os quais, os dois tipos de unidades de repetição estão ligadas por (1-4)- $\beta$ -glicosídica, distribuídas em diferentes graus, dependendo das proporções desacetiladas (Dash *et al.*, 2011).

Dentre as propriedades da quitosana destacam-se: solubilidade em meios ácidos, comportamento de polieletrólitos, capacidade de formar filmes, quelantes de metais, propriedades anti-tumorais, estáticas, espermicidas e hemostáticas, características ópticas e estruturais, além do seu potencial de se ligar com células microbianas e de mamíferos (Shukla *et al.*, 2013; Gadgery e Bahekar, 2017; Valencia-Sullca *et al.*, 2018). A Figura 1 ilustra as estruturas químicas parciais da quitina e quitosana.

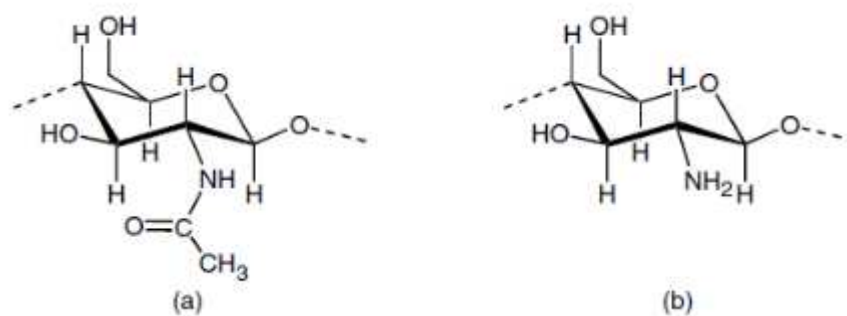


Figura 1 - Unidades estruturais da quitosana: (a) N-acetilglucosamina; (b) glucosamina (Gu *et al.*, 2018; Shandil *et al.*, 2018).

De acordo com a proporção relativa dessas duas unidades é determinado o grau de desacetilação da quitosana que define propriedades de solubilidade, comportamento ácido base, ação bactericida, fungicida, propriedades estruturais deste polímero. Além disso, a quitosana pode ser facilmente biodegradada em resíduos não-tóxicos e sua taxa de degradação está relacionada com a massa molecular (MM) do polímero e com o grau de desacetilação (Bagheri-Khoulenjani *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2013).

A partir da degradação da quitosana tem-se os oligossacarídeos bioativos que possuem propriedades antimicrobianas, e os produtos monoméricos (glucosamina), que são metabolizados pelo corpo. Ainda assim, a quitosana possui uma solubilidade limitada em pH neutro, sendo necessária a sua modificação química para seu melhor processamento (Tan *et al.*, 2016).

Pesquisas reportam que a MM da quitosana afeta diretamente sua atividade bactericida e fúngica (Shukla *et al.*, 2013; Saikia e Gogoi, 2015). No *et al.* (2002) descobriram que a atividade antibacteriana de quitosana com MM de 28-1671kDa aumentou de acordo com o aumento da MM. Chang *et al.* (2015) variaram a MM da quitosana entre 3,3 a 300kDa avaliando os efeitos combinados do MM, temperatura de reação e pH no crescimento bacteriano de cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* reportando um aumento da atividade bactericida em pH neutro com o aumento da MM. Garcia *et al.* (2018) relataram em seus estudos que o aumento da MM da quitosana reduziu o crescimento dos fungos *C. trocipcalis* e *C. parapsilosis*. Li, J. *et al.* (2016) estudaram a atividade bactericida da quitosana de MM ultraelevada frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que o aumento da MM em pH 6,0 tende a um maior efeito

bactericida devido as cadeias ultralongas da quitosana se ligarem a *E. coli* e *S. aureus* rompendo e decompondo suas células.

A modificação química da quitosana que será trabalhada nesta pesquisa é a O-carboximetilquitosana.

#### 2.4.2 O-carboximetilquitosana

A O-carboximetilquitosana é um biopolímero derivado da quitosana resultado da substituição do grupo carboximeto (-COOCH<sub>3</sub>) nos grupos hidroxilo primário e/ou secundários da quitosana. É solúvel em uma ampla faixa de pH (De Abreu e Campana-Filho, 2009; Logithkumar *et al.*, 2016), estimula a produção de fibroblastos (Chung *et al.*, 2003), possui capacidade de formação de gel aprimorada (Jayakumar *et al.*, 2010) e afinidade com nanopartículas metálicas (Djerahov *et al.*, 2016). A Figura 2 ilustra a estrutura química da O-CMQ.

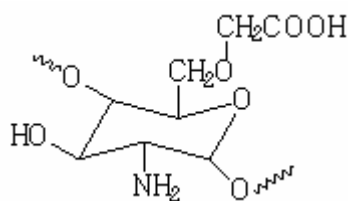


Figura 2 - Estrutura química da O-CMQ (Wu *et al.*, 2008).

A ocorrência de carboximetilação em diferentes sítios das cadeias de quitosana é decorrente das diferentes reatividades dos grupos -OH e NH<sub>2</sub>. O grupo hidroxila é um nucleófilo mais fraco que o grupo amino. Dessa forma, para obter como produto final O-CMQ, a reação deve ser processada em meio fortemente alcalino, para que ocorra a ativação das hidroxilas, pois, do contrário, os grupos amino reagirão preferencialmente formando como produto final a N-CMQ (Muzzarelli *et al.*, 1982).

O interesse em reações de carboximetilação é justificado pela obtenção de derivados solúveis em meio fisiológico, fator este de interesse nas áreas médicas e farmacêuticas (Chen e Park, 2003). Cai *et al.* (2001) aplicaram O-CMQ na modificação de superfície de filmes de poli (ácido D, L-lático)(PDLLA) e em filmes de poli (ácido lático-co-glicolídeo) para avaliar seus efeitos em osteoblastos e condrócitos, respectivamente. Wu *et al.* (2008) estudaram a interação entre a O-

CMQ e albumina de soro bovino de modo a avaliar o potencial da O-CMQ como matriz polimérica para a entrega de fármacos. Como resultados concluíram que a O-CMQ se apresenta como uma boa matriz polimérica confirmando sua boa adequação ao ambiente neutro do corpo humano (Muzzarelli, 1988).

Visando melhor entendimento do sistema investigado, ampla revisão da literatura foi realizada, entretanto, poucos foram os trabalhos encontrados que incorporaram nanopartículas metálicas em materiais preparados com O-CMQ.

## 2.5 Álcool polivinílico (PVA)

O PVA é um polímero semicristalino obtido através da hidrólise do acetato de vinila. É um polímero sintético, solúvel em água, não tóxico, biocompatível, degradável, de baixo preço e fácil processabilidade (Kim *et al.*, 2015). Devido suas propriedades, tem atraído muita atenção nas últimas décadas, sendo bastante utilizado na indústria farmacêutica e na biomedicina, aplicado como matriz na engenharia de tecidos e na liberação controlada de fármacos (Hassan e Peppas, 2000; Kanimozhi, Basha, Kumari e Kaviyarasu, 2018). A Figura 3 ilustra a estrutura química do PVA.

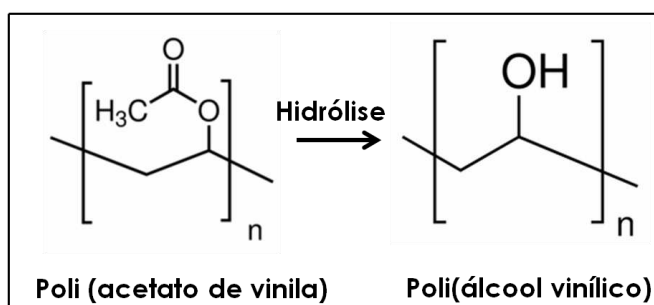


Figura 3 - Estrutura química do PVA (Bergo *et al.*, 2009).

O PVA está constantemente presente como um copolímero de poli (álcool vinílico) e poli acetato de vinila. A relação entre a quantidade de hidroxilas presentes no polímero poli (álcool vinílico) e o número inicial de grupos acetila determinam o grau de hidrólise do PVA. Essa propriedade é importante pois indica total ou parcial hidrólise do PVA. Entre 87-89% o mesmo é considerado parcialmente hidrolisado e, >98%, totalmente hidrolisado (Gaaz *et al.*, 2015).

Estudos relatam que ao incorporar um segundo componente polimérico juntamente com o PVA, como por exemplo, a quitosana, leva uma melhoria da biocompatibilidade do material final (Jalvandi *et al.*, 2017), assim como relatado por Chuang *et al.* (1999) que constataram que a membrana composta por quitosana/PVA foi mais favorável para a cultura de células que a membrana composta de PVA puro. Outros estudos indicam a formação de ligações entre os grupos –OH e –NH da quitosana e os grupos –OH do PVA (Choo *et al.*, 2016; Juvencio, 2017). Considerando que, a O-CMQ possui uma estrutura muito similar a estrutura da quitosana é possível aferir que este tipo de interação também acontece entre a O-CMQ e o PVA.

## 2.6 Géis

De acordo com a definição de Almdal *et al.* (1993) o termo gel se refere a sistemas constituídos por dois ou mais componentes, no qual um deles é majoritariamente um líquido. Outra definição bastante utilizada é a de Dorothy Jordan Lloyd a qual concluiu que “a condição coloidal, o gel, é aquele mais fácil de reconhecer do que definir” (Guenet, 2016). Essa afirmação se dá pela dificuldade de se encontrar definições claras que expressem as características dos géis, logo, o simples manuseio e contato com o gel permitem entender mais claramente o que ele é.

Com relação as suas características sólidas, o gel possui um módulo de armazenamento ( $G'$ ) superior ao módulo de perda ( $G''$ ), definindo seu estado gelatinoso;  $E$ , como o módulo de Young e  $J$  para a fluência. Para diferenciar um estado de gel para um estado líquido são avaliadas as propriedades reológicas (Guenet, 2016; Chai *et al.*, 2017). Dentre os experimentos, parâmetros como  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta = G'' / G'$ ,  $E$  ou  $J$  podem ser derivados. Experiências de relaxação são realizadas por aplicação de uma dada deformação  $\epsilon$  que relaciona a tensão resultante ao módulo de Young enquanto experimentos de fluência são realizados pela aplicação de uma dada tensão  $\sigma$  que relaciona a complacência a deformação.

Atualmente, uma grande variedade de géis compostos por polímeros sintéticos e naturais têm sido empregados na área dos biomateriais (Hayashi, 1994; Mi *et al.*, 2002; Zhang, Q. *et al.*, 2018). Entre eles a quitosana e seus derivados (O-

CMC, N-CMC, N, O-CMC) são comumente usados (Chen *et al.*, 2004; De Abreu e Campana-Filho, 2009; Wahid *et al.*, 2018). Dentre estes a O-CMC se destaca por sua exclusiva capacidade para formação de géis (Jayakumar *et al.*, 2010). Diversos trabalhos empregando géis de O-CMC vêm sendo desenvolvidos, dentre eles, hidrogéis sensíveis ao pH (Zhao *et al.*, 2006; He *et al.*, 2016), destinados à liberação de drogas proteicas (Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2018), fármacos (Guo e Gao, 2007; Rodkate e Rutnakornpituk, 2016), dentre outros (Lin *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2016).

## 2.7 Nanopartículas de prata (AgNPs)

Materiais nanoestruturados têm atraído um crescente interesse devido às suas propriedades únicas que diferem dos materiais massivos e ao seu potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias (Ferreira *et al.*, 2016). Elevada área superficial e baixa citotoxicidade são características que tornam interessante o uso de materiais nanoparticulados. Na literatura, vários trabalhos relatam a síntese de nanopartículas metálicas, tais como: nanopartículas de ouro (Au) (Irfan *et al.*, 2017), prata (Ag) (Rodrigues *et al.*, 2016), cobre (Co) (Jagadeesh *et al.*, 2017) e cádmio (Cd) (Hong *et al.*, 2017).

As AgNPs são nanopartículas obtidas através de rotas de redução físicas, biológicas, fotoquímicas e, principalmente química. Possuem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, dentre elas estão: propriedades ópticas, catalíticas, antimicrobianas (fungicidas e bactericidas) (Chen e Schluesener, 2008; Almeida, 2017). Contudo, é o largo espectro de atividade antimicrobiana da prata e o custo relativamente baixo de obtenção de AgNPs que as torna extremamente populares numa vasta gama de produtos de consumo, tais como: cosméticos (Fabrega *et al.*, 2011), filtros de ar e água (Rosa *et al.*, 2016), cremes (Chaudhri *et al.*, 2015), resinas dentárias (Kassaei *et al.*, 2008), dentre outros.

Trabalhos relatam que existe uma correlação entre a eficiência bactericida das AgNPs com sua estrutura cristalográfica, superfície-volume, tamanho de partícula, presença de estabilizantes e morfologia (Baker *et al.*, 2005). Apesar disso, devido à dificuldade no controle dessas características, as pesquisas se voltam para obtenção dessas NPs através da aplicação de novos agentes redutores (verdes e

biológicos) (He *et al.*, 2017; Ghiuță *et al.*, 2018) e sua incorporação em materiais poliméricos (Wang *et al.*, 2019), cerâmicos (Garai *et al.*, 2018), compósitos e biomateriais (Vijayakumar *et al.*, 2018; Arbab e Mola, 2019).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO.

#### 3.1 Materiais

A O-Carboximetilquitosana (média massa molar, aproximadamente 250 kDa, DS = ~100%) foi fornecida pelo Laboratório de Avaliação e Biomateriais do Nordeste – CERTBIO. Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), Citrato de Sódio Tribásico Dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Peróxido de Hidrogênio (35%,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), álcool polivinílico ( $[-\text{CH}_2\text{CHOH}-]_n$ , GA = 87-89%) e glicerina P.A./ACS ( $\text{HOCH}_2\text{OH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ) foram adquiridos da Neon. Borohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e Gelatina (proveniente de pele de porco) foi adquirido na Sigma-Aldrich. Polivinil Pirrolidona (PVP)(K-90,  $[-\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}-]$ , MM = 360 kDa) foi adquirido na Êxodo Científica. O Polietilenoglicol 400 U.S.P. foi adquirido na Synth. As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida a partir de um Sistema Master System MS2000 GEHAKA.

#### 3.2 Metodologia

##### 3.2.1 Síntese das AgNPs

A síntese das AgNPs seguiu o método de redução química, descrito por Rodrigues *et al.* (2016) adaptado de Zhang, Q. *et al.* (2011). A Figura 4 ilustra as etapas da síntese.

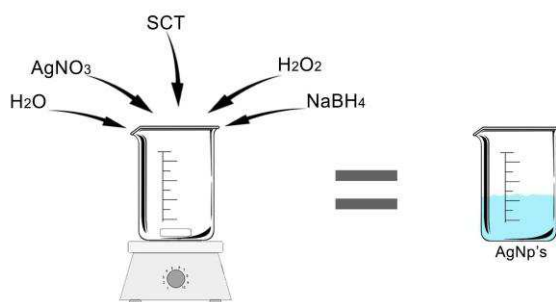


Figura 4 – Representação da síntese de AgNPs.

Inicialmente, foram transferidos 30 ml de água ultrapura para um becker (100 ml). Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , agente precursor), 1,5 ml de Citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $0,03 \text{ mmol.L}^{-1}$ , agente estabilizante), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 35%, agente oxidante) e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ , agente redutor) foram adicionados ao sistema de acordo com os volumes e concentrações descritos na Tabela 1. Após adição do último reagente, elevou-se a agitação a 1150 rpm por 3 minutos.

Tabela 1 - Variações de concentração e volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{NaBH}_4$  utilizados na síntese.

Variável	Amostra	Variação
$\text{H}_2\text{O}_2$ (Volume - $\mu\text{L}$ )	H1	30
	H2	60
	H3	90
	H4	100
	H5	120
	H6	150
$\text{NaBH}_4$ (Concentração – $\text{mmol.L}^{-1}$ )	B1	50
	B2	60
	B3	70
	B4	80
	B5	90
	B6	100

Essas variações foram executadas para compreender melhor a influência causada pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) nas propriedades das AgNPs, além disso, esses intervalos nas concentrações e volumes foram estudados por apresentarem uma variação mais significativa sobre as propriedades estudadas (tamanho, polidispersividade e estabilidade). Variações nas concentrações do  $\text{AgNO}_3$  e citrato de sódio não foram realizadas devido a literatura já estabelecer que o agente precursor e estabilizante não influenciam significativamente nas propriedades das AgNPs (Zhang, Q. *et al.*, 2011). Para cada síntese realizada apenas uma variável foi alterada, mantendo-se fixas as demais.

Para tanto, 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi e 90  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$  foram utilizados como volume e concentração fixas, respectivamente.

Aos resultados foi aplicado um Teste exato de Fisher, com o objetivo de avaliar diferenças significativas entre as médias obtidas para o diâmetro, polidispersividade e estabilidade. Esse estudo foi realizado através dos resultados de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Potencial Zeta (PZ) e polidispersividade.

Após avaliada a influência do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), foi definida a quantidade padrão dos reagentes para síntese das AgNPs. Os valores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Definição das concentrações e volumes padrões de  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  para síntese de AgNPs.

Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ , 0,1 $\text{mol.L}^{-1}$ )	Citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 30 $\text{mmol.L}^{-1}$ )	Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 35%)	Borohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ , 90 $\text{mmol.L}^{-1}$ )
30 $\mu\text{L}$	1,5 ml	60 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

A repetibilidade da síntese das AgNPs foi avaliada por meio do teste de Tukey, aplicado aos resultados de 12 amostras sintetizadas conforme a Tabela 2. Foram avaliadas as propriedades de tamanho, polidispersividade e estabilidade.

No entanto, após ensaios microbiológicos preliminares percebeu-se que as AgNPs não apresentavam atividade. Logo, motivados pelo insucesso das análises, foram procuradas e encontradas pesquisas as quais relatam que AgNPs estabilizadas com citrato de sódio, quando em contato com o meio utilizado em ensaios biológicos passam por uma rápida agregação. Tanvir *et al.* (2017) relataram em seus resultados que AgNPs estabilizadas com citrato de sódio não demonstravam atividade antimicrobiana, levando a geração de agregados os quais, de acordo com Choi *et al.* (2005) gera a perda da atividade antibacteriana das AgNPs no meio de dispersão.

Dessa forma, tornou-se necessário o uso de um agente surfactante que atue na prevenção da formação de agregados, surgindo o PVP como uma opção. Amplamente utilizado como agente estabilizante na preparação de AgNPs, atua proporcionando estabilidade estérica na qual um polímero de cadeia longa se

adsorve na superfície das partículas reduzindo a tensão superficial por meio da formação de uma barreira mecânica entre a partícula e o meio ao qual ela está dispersa (Hotza, 1997; Tejamaya *et al.*, 2012; Kaur e Kumar, 2019). Demonstra-se eficaz no controle de tamanho e morfologia de nanopartículas como observado nos trabalhos de Parnklang *et al.* (2015); Khan *et al.* (2017); Tanvir *et al.* (2017).

Então, foi realizado um estudo para adição do PVP na rota de síntese de AgNPs anteriormente definida, de modo a possibilitar a obtenção de nanopartículas continuamente estáveis quando em contato com meios biológicos. Para tanto, a adição do PVP foi estudada em duas ocasiões. Na primeira, amostras de AgNPs foram sintetizadas pelo método padrão e mantidas sob refrigeração ao abrigo da luz. Após um dia de repouso, soluções de PVP a 0,0033%, 0,033% e 0,33% foram adicionadas as amostras variando o volume de adição de 0,500 a 2,5 ml com intervalos de 0,5 ul. Na segunda ocasião, 0,1 ul das soluções de PVP nas concentrações de 0,017% e 0,033% foram adicionadas durante a síntese, logo após adição do citrato de sódio.

Para remover o excesso de PVP, após um dia acondicionadas sob refrigeração ao abrigo da luz, as amostras foram transferidas para eppendorfs de 2 ml e centrifugadas em uma centrífuga NT835 (Novatécnica, São Paulo). As velocidades de 6000, 8000 e 10000 rpm foram avaliadas. Entre cada ciclo de lavagem, 1,5 ml do sobrenadante era retirado e adicionado um volume igual de água ultrapura. Essa etapa foi repetida 3 vezes. Por fim, AgNPs-PVP preparadas foram contaminadas com dois meios de cultura diferentes. O primeiro preparado com 0,112 M de NaCl em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v) e o segundo a 0,005 M de tampão fosfato salino (PBS) em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v). Após contaminação, o espectro UV-Vis de todas amostras foram coletados.

Após o estudo, a amostra preparada sob condição que não apresentou mudanças no p das AgNPs após contaminação foi definida como padrão. Os valores selecionados estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Definição das condições de síntese padrões para AgNPs-PVP.

Reagentes				
Nitrato de Prata (AgNO <sub>3</sub> , 0,1 mol.L <sup>-1</sup> )	Citrato de Sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .3H <sub>2</sub> O, 30 mmol.L <sup>-1</sup> )	PVP (0,033%)	Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 35%)	Borohidreto de Sódio (NaBH <sub>4</sub> , 90 mmol.L <sup>-1</sup> )
30 µL	1,5 ml	100 µL	60 µL	200 µL
Condições de síntese				
Meio de cultura		Velocidade de centrifugação		
0,005 M de PBS em TSB 1:9 (v/v)		8000 rpm		

### 3.2.2 Preparação da O-CMQ

A preparação da O-CMQ seguiu o método descrito por Chen e Park (2003). Inicialmente, 3 g de quitosana (médio peso molecular, aproximadamente 250kDa, DA = 86,3%) foram adicionadas a 70,8 ml de isopropanol e mantidas sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 ml de uma solução de Hidróxido de Sódio a 10,2 mol/L (solubilizado em solução de isopropanol/água na proporção de 1:1(v/v)), mantendo-se a agitação por 24 horas. Em seguida, foi adicionada lentamente a solução anterior Ácido Monocloroacético (solubilizado em Isopropanol, na concentração de 8,28 mol/L), mantendo a agitação por 24 horas. Após o período, foi adicionado 100 ml de Etanol absoluto, sob agitação magnética, filtrada dez vezes com Etanol 80% para remoção total do sal de carboximetilquitosana e uma lavagem com Etanol absoluto, para ajustar o pH final da carboximetilquitosana e retirar os resíduos restantes. Após a filtração, o produto foi mantido à temperatura ambiente por 12 horas para secagem.

### 3.2.3 Preparação do Gel O-CMQ/PVA

O desenvolvimento dos géis de O-CMQ consistiu de duas etapas, uma etapa exploratória e outra de obtenção dos géis de O-CMQ/PVA. As etapas seguem descritas logo abaixo:

### 1ª Etapa - Fase Exploratória:

Partindo da necessidade de solucionar a rápida perda de água da O-CMQ quando em estado de gel e em contato com a pele, buscou-se na literatura polímeros que, quando adicionados à O-CMQ pudessem solucionar este problema. Após busca na literatura, foram escolhidos o polietilenoglicol (PEG), gelatina, glicerina, polivinil pirrolidona (PVP) e PVA.

Para confecção dos géis, inicialmente foram pesados 0,100g de O-CMQ e adicionada à quantidade do outro polímero de acordo com as proporções descritas na Tabela 4. Em seguida, foi transferido 1 ml de água ultrapura a mistura, agitando-a com auxílio de um bastão de vidro até a formação do gel.

Dentre todas as combinações realizadas apenas o gel O-CMQ/PVA preservou o estado de gel por mais de 3 dias quando exposto a condições ambiente.

### 2ª Etapa – Obtenção do gel O-CMQ/PVA:

Na confecção dos géis de O-CMQ/PVA foram pesados 0,100g de O-CMQ e preparadas soluções hidroalcoólicas de PVA obedecendo a proporção 70:30 água:álcool nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1%(m/v) de PVA. Por fim, foi adicionado 1 ml da solução a O-CMQ, agitando-a com auxílio de um bastão de vidro de maneira lenta e gradual até a formação do gel.

Após avaliada a cinética de degradação do géis de O-CMC/PVA o gel preparado com solução de PVA a 1% foi selecionado para dar continuidade as demais caracterizações. A escolha se justifica devido ao gel ter apresentado um tempo de degradação superior a 1440 minutos (24 horas). Entretanto, apesar de as demais proporções (0,1% e 0,5%) terem se degradado de forma mais rápida, este não é um fator que inviabilize seu uso, pelo contrário, essa característica abre um leque de opções para uso de curativos a base do gel, podendo ser preparadas formulações que atendam diferentes tipos de ferimentos.

Tabela 4 – Proporção e quantidade dos reagentes utilizados no estudo exploratório do gel.

Reagentes	Quantidades/Proporções	Razão
PEG	10 $\mu$ L/(10%)	m/v
	25 $\mu$ L/(25%)	
	50 $\mu$ L/(50%)	
Gelatina	0,0010 mg/(1%)	m/m
	0,0050 mg/(5%)	
	0,0100 mg/(10%)	
PVP	0,0010 mg/(10%)	m/m
	0,0050 mg/(5%)	
	0,0100 mg/(10%)	
Glicerina	10 $\mu$ L/(1%)	m/v
	15 $\mu$ L/(15%)	
	20 $\mu$ L/(20%)	
PVA	0,010 mg/(0,1%)	m/v
	0,050 mg/(0,5%)	
	0,100 mg/(1%)	

### 3.2.4 Preparação do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs

Na confecção dos géis de O-CMQ/PVA/AgNPs foram pesados 0,100 g de O-CMQ e preparada solução hidroalcolica de PVA obedecendo a proporção 70:30 água:álcool na concentração de 1% (m/v) de PVA. Na etapa seguinte, foram preparadas soluções de PVA a 1% (m/v) acrescidas de 1, 3 e 5 ml da solução de AgNPs de modo a obter soluções homogêneas de PVA/AgNPs. Ao fim, 1 ml dessa solução foi adicionada à O-CMQ, agitando-a com auxílio de um bastão de vidro de maneira lenta e gradual até a formação do gel. Na Figura 5 está presente o esquema de formação do gel O-CMQ/PVA/AgNPs.

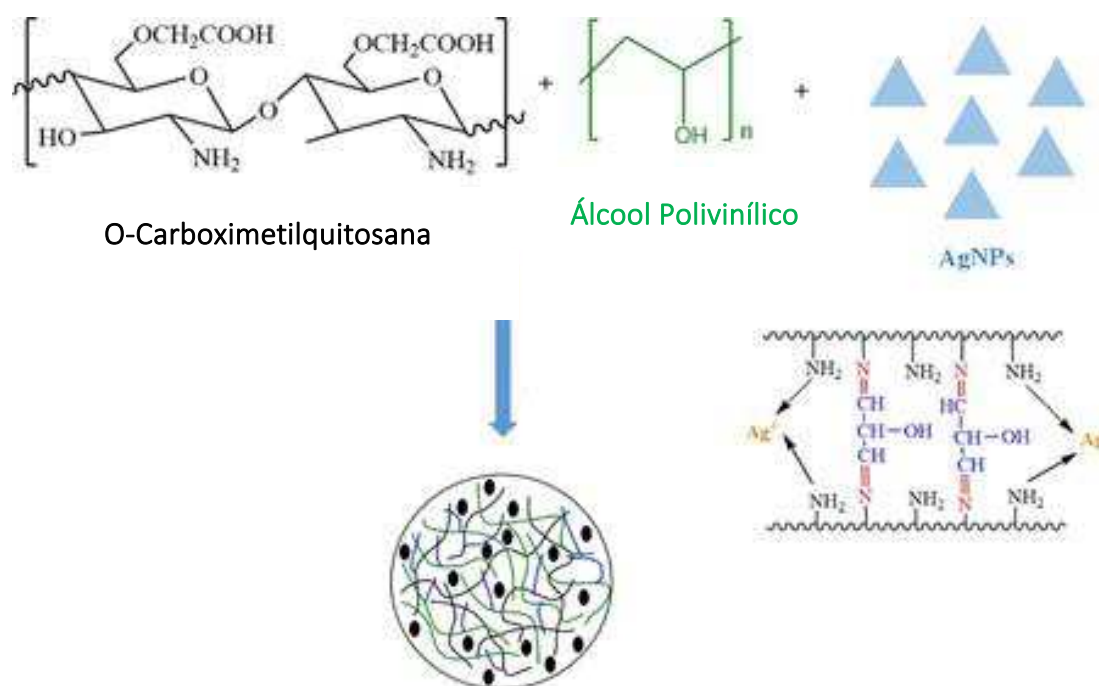


Figura 5 - Esquema de formação do gel O-CMQ/PVA/AgNPs. Adaptado de Gholamali *et al.* (2019).

Na Tabela 05 encontram-se presentes as proporções e códigos das amostras que foram estudadas:

Tabela 5 - Informações correspondentes as proporções e códigos das amostras estudadas.

Códigos	Reagentes		
	O-CMQ (m/v)	PVA (m/v)	AgNPs (ml)
O-CMQ	1:10 (10%)	-	-
O-CMQ/0,1% PVA	1:10 (10%)	1:1000 (0,1%)	-
O-CMQ/0,5% PVA	1:10 (10%)	1:500 (0,5%)	-
O-CMQ/1% PVA	1:10 (10%)	1:100 (1%)	-
O-CMQ/PVA/AgNPs 1	1:10 (10%)	1:100 (1%)	1
O-CMQ/PVA/AgNPs 3	1:10 (10%)	1:100 (1%)	3
O-CMQ/PVA/AgNPs 5	1:10 (10%)	1:100 (1%)	5



### **3.3 Caracterização das AgNPs**

#### **3.3.1 Estudo da Influência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaBH<sub>4</sub> na síntese de AgNPs**

O estudo foi realizado de modo a compreender melhor a influência causada pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) sob o diâmetro, polidispersividade e estabilidade das AgNPs. Para tanto, 12 amostras de AgNPs foram preparadas seguindo as condições descritas na Tabela 1 e caracterizadas por DLS e PZ.

#### **3.3.2 Estudo da aplicação de PVP na síntese de AgNPs**

A adição de PVP à síntese das AgNPs objetivou o preparo de nanopartículas estabilizadas estáveis quando presentes em meio biológico. Logo, 20 amostras de AgNPs foram preparadas variando as condições citadas no tópico 3.2.1. Todas as amostras foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis e apenas a condição definida como ideal foi caracterizada via DLS e PZ de modo a averiguar a repetibilidade e o efeito causado pela centrifugação e adição do PVP ao tamanho e estabilidade das AgNPs.

#### **3.3.3 Modelo de Calibração Multivariada**

Para desenvolvimento do modelo de calibração foram sintetizadas 50 amostras de AgNPs caracterizadas por DLS (método padrão) e espectroscopia UV-Vis (método alternativo). Na etapa de validação, pré-processamento dos espectros e construção dos modelos PLS foi utilizado o software The Unscrambler® versão 9.1. Na seleção das amostras para os conjuntos calibração e predição foi utilizado o algoritmo SPXY executado no software Matlab®, versão 6.5. A faixa espectral para construção do modelo foi de 450 a 250 nm. Os pré-tratamentos utilizados para desenvolvimento do modelo foram: Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC), Extensão da Correção do Espalhamento Multiplicativo (EMSC), Variação Normal Padrão (SNV), derivadas e a combinação dos mesmos. Pré-tratamentos foram avaliados com base nos valores de Raiz dos Erros Quadráticos Médios de

Calibração (RMSEC), Raiz dos Erros Quadráticos Médios de Previsão (RMSEP), Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ), correlação, bias, slope, offset e número de variáveis latentes utilizadas para a construção do modelo. O algoritmo Jack-Knife foi aplicado a fim de melhorar a performance dos modelos construídos. Os dados referentes as modificações realizadas na síntese das AgNPs e etapas de construção do modelo estão presentes no Apêndice I - Desenvolvimento de modelo de calibração multivariada para determinação de polidispersividade e diâmetro de AgNPs utilizando espectroscopia UV-Vis e quimiometria.

### **3.3.4 Espectroscopia UV-Vis**

A espectroscopia UV-Vis foi realizada com objetivo de confirmar a síntese das AgNPs e verificar estabilidade das AgNPs frente ao meio de cultura e tampão salino empregados no ensaio microbiológico. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT-IR, modelo MB-102, na faixa de comprimento de onda de 190-1100 nm, cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)**

O DLS foi usado para determinação do tamanho e dispersão das AgNPs. As análises foram conduzidas em um Instrumento ZetaPals da Brookhaven. As medidas foram coletadas a temperatura ambiente com um ângulo de espalhamento fixo de 90°. Essa técnica foi empregada para verificar mudanças, estimar o tamanho, polidispersividade e potencial zeta das AgNPs. Leituras de 3 amostras preparadas pela rota padrão foram coletadas durante um período 3 meses para o estudo de estabilidade. O equipamento e as condições de análise utilizadas foram idênticas a análise de DLS. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas.

### **3.3.6 Repetibilidade – Teste de Tukey**

A repetibilidade da síntese das AgNPs foi avaliada por meio do teste de Tukey, aplicado aos resultados de 12 amostras sintetizadas nas condições padrão.

Foram avaliadas as propriedades de tamanho, polidispersividade e estabilidade para um nível de significância  $p < 0,05$ .

### **3.3.7 Teste F**

Os dados de tamanho e estabilidade das AgNPs obtidas pela síntese padrão foram avaliados por meio do Teste F, com objetivo de verificar diferenças significativas entre a variância destas propriedades. Foram avaliadas as propriedades de tamanho, polidispersividade e estabilidade para um nível de significância  $p < 0,05$ .

### **3.3.8 Estudo de estabilidade**

O estudo de estabilidade foi realizado de modo a determinar o tempo de prateleira das AgNPs, ou seja, quanto tempo as mesmas permaneceriam sem alterações em suas propriedades. Para tanto, 3 replicatas autênticas foram analisadas durante um período de aproximadamente 3 meses (16/09/2018 à 09/12/2018). As leituras de potencial zeta foram coletadas a cada 7 dias.

### **3.3.9 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Para confirmar o tamanho e morfologia das AgNPs foi usado um Microscópio de Força Atômica XE-BIO Park Systems com cantilever com raio de curvatura da ponteira inferior a 10 nm. Para realização do ensaio, 10  $\mu\text{L}$  da solução de AgNPs foi depositado em uma placa de vidro e mantidas sob dessecação. Após secagem a amostra foi conduzida para análise. As varreduras foram realizadas com a frequência de 1 Hz e com a resolução máxima permitida no equipamento (de 512x 512 pixels). As imagens foram processadas no próprio software do equipamento (XEI 1.8, Park Systems).

### **3.3.10 Difração de Raios X (DRX)**

Com o objetivo de avaliar o perfil cristalográfico das AgNPs análises de difração de raios X foram realizadas em um equipamento XRD-7000 (Shimadzu, Japão), utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  de  $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ , tensão de 40 kVA e corrente de 30 mA. O intervalo de varredura foi de 30 a 85° a uma velocidade de 1°/minuto.

### **3.3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC)**

A análise de MEV foi realizada com o objetivo de confirmar a morfologia e tamanho das AgNPs. Para tanto, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo S4700EI (Hitachi, Japão) operando a uma voltagem de 15 kV. A amostra foi diluída na proporção de 1:10 em água e gotejada sobre porta amostra de vidro, sendo posteriormente submetida a um recobrimento de platina.

## **3.4 Caracterização da O-CMQ**

### **3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer, na faixa de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Esta técnica foi utilizada para confirmar a obtenção da O-CMQ.

## **3.5 Caracterização do Gel O-CMQ/PVA**

### **3.5.1 Avaliação gravimétrica de perda de umidade**

A avaliação de perda de massa foi realizada com o auxílio de uma estufa incubadora Q316M2 (QUIMIS, São Paulo) a uma temperatura de 37 °C (devido a ser esta a temperatura do corpo humano) por 240 minutos, avaliando as 4 composições dos géis: O-CMC 10%, O-CMC /0,1% PVA, CMC/0,5% PVA e CMC /1% PVA. Estes

testes foram realizados com o objetivo de estudar os efeitos causados pelo PVA no tempo de perda de umidade do gel.

### **3.5.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica foi realizada com o objetivo de estudar a degradação térmica do gel e a influência do PVA sobre as propriedades térmicas do mesmo. Os experimentos foram realizados em condições dinâmicas. As amostras foram aquecidas de 25 a 500°C em uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. O gás de arraste utilizado será o ar sintético programado a uma vazão de 50 ml/min.

### **3.5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer, na faixa de 4000-600 $\text{cm}^{-1}$ . O uso desta técnica teve como objetivo confirmar e compreender a interação entre a O-CMQ e o PVA além de relacionar estas interações à perda de umidade e degradação dos géis.

### **3.5.4 Estudo da degradação por espectroscopia UV-Vis**

Com o objetivo de simular o comportamento dos géis quando em contato com o exsudato foram preparados géis de O-CMC/0,1% PVA, CMC/0,5% PVA e CMC/1% PVA e deixados a 37°C em solução de tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,4). Foram coletadas alíquotas de 4 ml de cada um dos géis nos tempos de 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 420, 600 e 1440 minutos e registrados seus respectivos espectros UV-Vis. A banda de absorção de 209 nm foi utilizada para aplicação da lei de Lambert-Bee, devido a ser sensível a concentração de O-CMQ. O volume de PBS foi repostado em quantidade igual a cada alíquota retirada para todos os tempos medidos.

## 3.6 Caracterização do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs

### 3.6.1 Teste de Espalhabilidade

O ensaio de espalhabilidade foi realizado em um reômetro HAAKE™ MARS™ (ThermoFisher Scientific, Massachusetts), equipado com rotor P35Til e geometria placa-placa. Foi empregada uma varredura na taxa de cisalhamento de 0,001 a 0,1 com frequência fixa de 1,592 Hz por um tempo de 60 segundos a temperatura ambiente e gap de 0,5 mm. As amostras de gel O-CMC/1% PVA e O-CMC/PVA/AgNPs 5 foram analisadas com o objetivo de caracterizar seu perfil reológico e identificar as diferenças causadas pela adição das AgNPs nas propriedades reológicas do gel.

### 3.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

As amostras de AgNPs, O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs 5 foram avaliadas frente as cepas microbianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), que de acordo com a literatura são as bactérias mais comumente encontradas em feridas. Para tanto, o método de Difusão em Ágar descrito por Pelissari et al, 2009; ANDREWS et al, 2005, foi aplicado com algumas modificações.

Inicialmente, uma suspensão das bactérias foi preparada na concentração de 0,5 na escala de McFarland, usando PBS a 0,005 M para bactérias. Então, com a ajuda de um suabe, a suspensão foi espalhada em placas de ágar com Tryptic Soy Broth (TSB) e Ágar Milan Hinton (MH), 10 µL de AgNPs e 0,800 g dos géis O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs foram colocados diretamente nas placas de TSB e MH com o inóculo bacteriano. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 35 °C durante um período de 48 horas. Os resultados foram mensurados pela média das duas zonas de inibição medidas (24 e 48 horas) sem subtrair o diâmetro dos discos. As amostras que apresentaram halos de inibição de crescimento abaixo de 10 mm foram classificadas como inativas, ativas quando apresentaram halos entre 10 e 15 mm e muito ativas para valores acima de 15 mm.

Para o ensaio foi utilizado o meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) (caldo Kasvi-Itália) e Ágar Milan Hinton (MH) adicionados com meio solidificante (Ágar Bacto). Todas as cepas utilizadas tiveram um crescimento de 24 horas.

### **3.6.3 Ensaio de MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio)**

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* da amostra de AgNPs e dos extratos dos géis O-CMQ/PVA, O-CMQ/PVA/AgNPs 1, 3 e 5 foi realizada de acordo com a ISO 10993-5:2009 – Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity (Organization, 2009). Foi utilizado o método de contato direto entre o extrato e as células. A linha celular foi L929 fibroblastos adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro, o cálculo da viabilidade foi por meio do Teste de Grubbs para Outliers. O Espectrofotômetro Victor X3 (Perkin Elmer, Massachussetts) foi utilizado para leitura da viabilidade.

### **3.6.4 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* - Método de difusão em ágar**

O método de difusão em ágar é empregado na avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros, empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano.

Logo, as amostras de gel foram colocadas em moldes de 100 mm<sup>2</sup> os quais foram confeccionados com ácido polilático (PLA) na impressora 3D Cloner DH PLUS (Paraná, Brasil). O filamento de PLA foi selecionado, pois, segundo Konta *et al.* (2017) e Besko *et al.* (2017) trata-se de um polímero de baixa toxicidade, ademais, como medida de segurança a toxicidade do molde de PLA também foi avaliada como uma das amostras.

Amostras de AgNPs também foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, para tanto, um papel filtro nas dimensões de 100 mm<sup>2</sup> foi embebido com a amostra e empregado no ensaio.

Após preenchimento dos moldes com as amostras, o conjunto foi esterilizado por 1h por radiação ultravioleta em cabine de fluxo laminar BIOGREEN, em ciclos de

30 min para cada lado da amostra. Em seguida, foram preparados os controles positivos (Látex para garrote) e negativos (Papel de filtro Whatman Número 1).

Foi utilizada para o ensaio uma suspensão de células L929 com concentração na faixa de  $1,1$  a  $1,3 \times 10^5$  células viáveis por ml em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Foram colocados 4 ml da suspensão celular obtida em cada orifício da microplaca plástica de cultura (3,5 cm de diâmetro). Então, foram preparadas culturas em duplicata para a amostra, controle negativo, controle positivo e branco. As culturas foram incubadas em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  com  $5\% \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ .

Aproximadamente 48 horas após o estabelecimento das culturas, utilizou-se para o ensaio aquelas que apresentaram uma monocamada celular uniforme e próxima à confluência (superior a 80%). Dessa forma, o meio de cultura das microplacas foi aspirado, a monocamada de cada orifício da placa foi lavada com 2 ml de solução PBS que em seguida também foi aspirado. Logo após, foi adicionado 1 ml do meio de cobertura em cada poço, este meio é composto pelo ágar a 1,8%, adicionado do corante vermelho neutro a 0,01% e MEM 2 vezes concentrado, em quantidades iguais. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 10 minutos, aguardando a solidificação do ágar à temperatura ambiente.

Dessa maneira, foram colocados em contato com a superfície solidificada do ágar, no centro de cada placa, as amostras, o controle negativo e o controle positivo, em culturas em duplicata. Assim, as placas foram encubadas na posição invertida, embrulhadas em folha de papel de alumínio para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro (ISO 10993-5), por pelo menos 24 horas em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , umidificada e com  $5\% \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$  para avaliação da citotoxicidade.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das AgNPs

#### 4.1.1 Estudo da Influência do $H_2O_2$ e $NaBH_4$ na síntese de AgNPs

Um fator importante na síntese de nanopartículas metálicas é a compreensão da influência e ação dos reagentes empregados no preparo desses materiais. A Figura 6 ilustra a evolução do diâmetro de NPs de acordo com a variação do  $H_2O_2$  e  $NaBH_4$ . Linhas de tendência foram utilizadas para melhor visualização dos resultados.

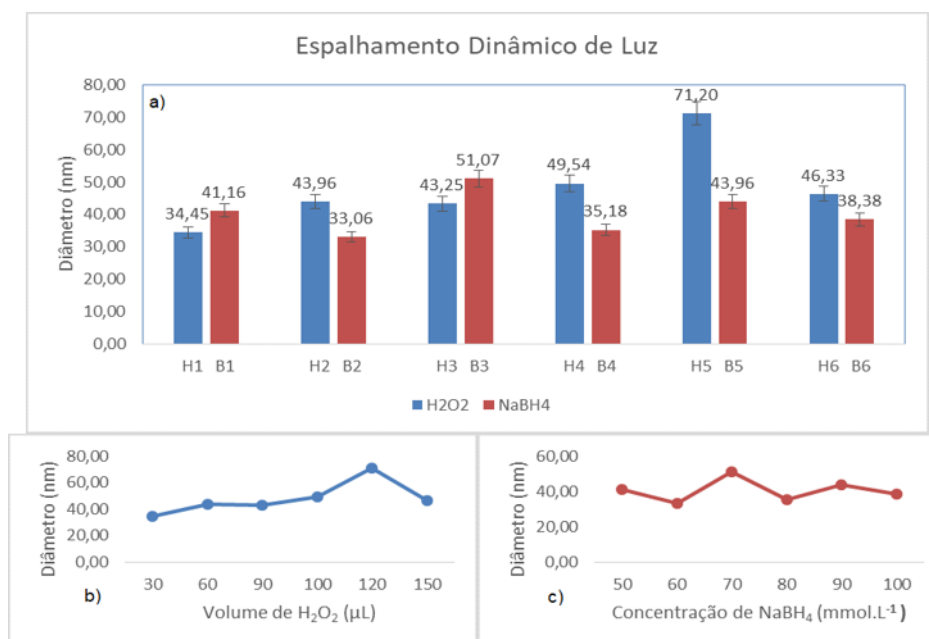


Figura 6 - a) Comportamento do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs em função da variação de  $NaBH_4$  e  $H_2O_2$ . b) Linha de tendência do diâmetro hidrodinâmico em função do  $H_2O_2$ . c) Linha de tendência do diâmetro hidrodinâmico em função do  $NaBH_4$ .

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6 b), observou-se que o acréscimo de  $H_2O_2$  até o volume de 120  $\mu L$  proporcionou um aumento do diâmetro das NPs, possivelmente devido a sua ação no crescimento das NPs, como também diminuiu o efeito retardante de crescimento gerado pelo  $NaBH_4$ , devido a não existência de um equilíbrio dinâmico entre a redução dos íons de  $Ag^+$  e a dissolução oxidativa da prata metálica assim como observado por Zhang, Q. *et al.* (2011). Dessa

forma, uma maior quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até 120  $\mu\text{L}$  proporciona um aumento do diâmetro.

A Figura 6 c) mostra a evolução do diâmetro de NPs em função da variação de  $\text{NaBH}_4$ . Observa-se que o aumento da concentração de  $\text{NaBH}_4$  pouco contribuiu com a alteração do diâmetro das AgNPs visto que, este aumento conduziu a uma produção mais lenta de AgNPs, reduzindo apenas o tempo de inicialização na formação dos núcleos de NPs, não afetando seu diâmetro final. Zhang *et al.* (2010) relataram em seus estudos que o aumento da concentração de  $\text{NaBH}_4$  proporcionou uma redução da espessura das AgNPs, grandeza a qual não influencia o diâmetro corroborando com nossos resultados.

O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é conhecido em seu uso como agente oxidante, promovendo a formação de estruturas anisotrópicas (Mulvihill *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2010) em seus estudos relataram que, inicialmente, com a adição de  $\text{NaBH}_4$ , os íons de prata são parcialmente reduzidos para formar AgNPs, que são temporariamente estabilizadas. Simultaneamente, o crescimento de NPs é inibido devido ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como resultado do equilíbrio dinâmico entre a redução e a oxidação, a prata permanece na forma de nanopartículas de cor amarela clara. Com o consumo do  $\text{NaBH}_4$  durante a reação, a proteção dos íons borohidreto é enfraquecida, permitindo a produção de núcleos de prata e crescimento das NPs (Zhang, Q. *et al.*, 2011).

Quanto a polidispersividade mensurada via DLS, pesquisas recentes elucidam a forma de crescimento de AgNPs semeadas e nucleadas, obtendo NPs com espessuras de 4 nm para AgNPs ainda em fase de crescimento (sementes) e de até 10nm para AgNPs já nucleadas, todavia, não correlacionam a influência dos reagentes com a polidispersividade das AgNPs (Zhang *et al.*, 2010; Li, N. *et al.*, 2012).

Nota-se que existe uma tendência no comportamento do diâmetro *versus* polidispersividade diante da variação do  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Analogamente aos efeitos causados no diâmetro de partícula, o acréscimo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{NaBH}_4$  causou aumento na distribuição dos tamanhos, favorecendo a formação de uma solução polidispersa, fora da idealidade  $>0,300$ , fator considerado negativo para NPs, visto que NPs monodispersas permitem generalizar as propriedades do coloide obtido com as propriedades das NPs individuais (Sugimoto, 1987; Martinez-Castanon *et al.*, 2008;

Mahl *et al.*, 2011a; Kumar *et al.*, 2017). A correlação entre diâmetro de partículas e polidispersividade é mostrada na Figura 7.

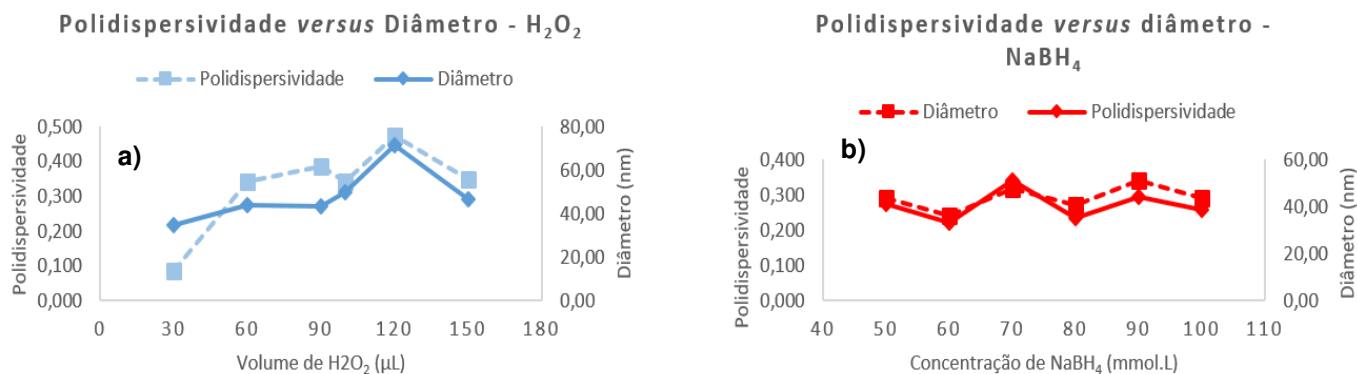


Figura 7 - Polidispersividade versus Diâmetro. a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e b) NaBH<sub>4</sub>.

O potencial zeta é uma técnica que permite avaliar a estabilidade de dispersões coloidais através da medição do seu potencial eletro cinético. A Figura 8 ilustra o comportamento da estabilidade das NPs em função do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaBH<sub>4</sub>.

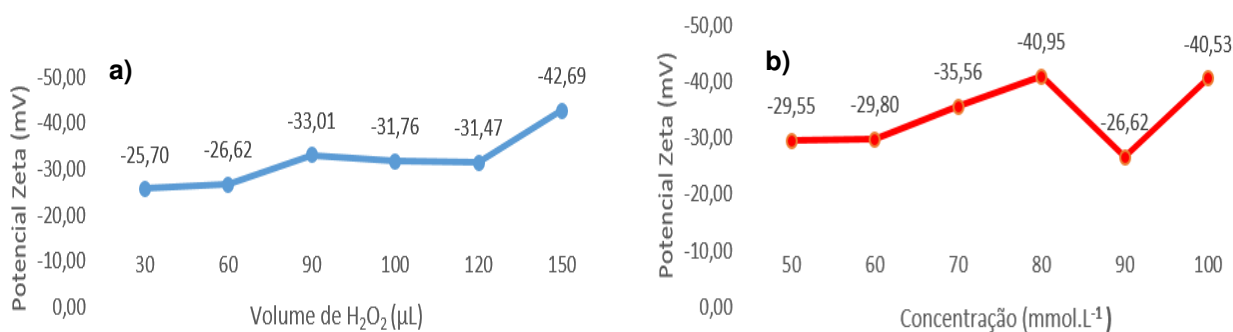


Figura 8 - Comportamento do potencial zeta diante das variações de: a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e b) NaBH<sub>4</sub>.

Para todas as variações de concentração do NaBH<sub>4</sub> e volume do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os resultados demonstram que as superfícies das partículas estão carregadas negativamente. Valores de potencial zeta abaixo de <-0,30mV indicam a estabilidade do coloide devido à repulsão causada por cargas superficiais, impedindo sua aglomeração (Doane *et al.*, 2012). O aumento do volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreceu a estabilidade das partículas, demonstrando um aumento progressivo, fator este já esperado diante da atuação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na remoção das partículas instáveis. O aumento das concentrações de NaBH<sub>4</sub>, analogamente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionou uma melhoria na estabilidade das NPs. Isso se explica através de um possível efeito estabilizador sinérgico entre íons de citrato e íons de borohidreto, onde uma concentração maior

de íons de borohidreto aumenta a ligação preferencial do citrato à faceta (111), levando à formação de nanopartículas mais estáveis (Zhang, Q. *et al.*, 2011).

O método de Fisher é utilizado para comparar todos os pares de médias controlando a taxa de erro ao nível de significância  $\alpha$  para cada comparação. A Figura 9 ilustra o intervalo de confiança do Teste exato de Fisher em função da comparação das médias de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta.

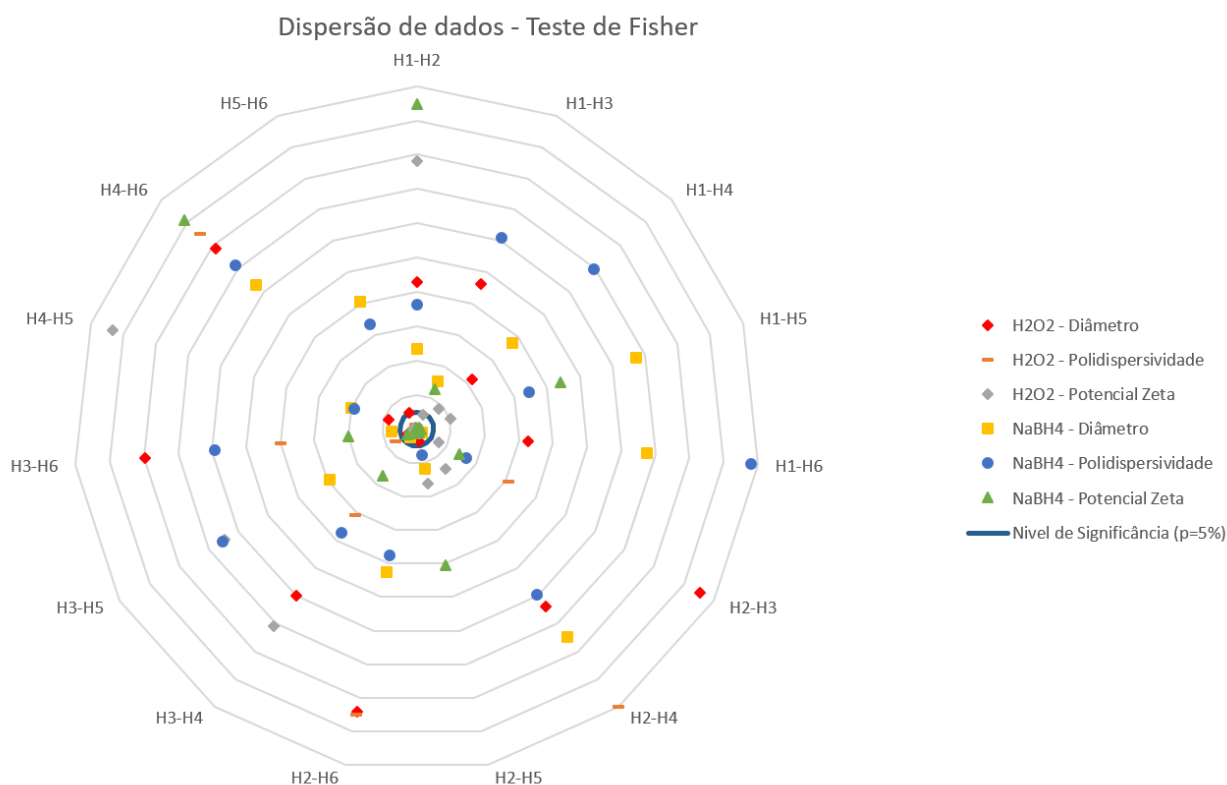


Figura 9 - Intervalo de confiança do Teste exato de Fisher relativo à diferença das médias de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta para: volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e concentração de  $\text{NaBH}_4$  em função dos valores da estatística do Teste exato de Fisher.

Observando os valores na Figura 9: diâmetro - combinações  $H_n-H_n$  com exceção das interações  $H_1-H_5$ ,  $H_2-H_5$  e  $H_3-H_5$  (valores médios de diâmetro significativamente diferentes) estão acima do intervalo de confiança, contribuindo no crescimento das NPs; quanto ao potencial zeta e polidispersividade, todas as médias comparadas com a variação  $H_6$  (150  $\mu\text{L}$ ) e  $H_1$  (30  $\mu\text{L}$ ), respectivamente, demonstraram-se estatisticamente diferentes ( $p < 5\%$ ) confirmando a forte influência do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nestas propriedades.

Na Figura 9: diâmetro - valores do teste Fisher em comparação das médias H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub> e H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub> demonstraram-se estatisticamente diferentes, contrário ao observado na avaliação dos resultados químicos onde a variação da concentração de NaBH<sub>4</sub> pouco contribuiu para o aumento e/ou variação do diâmetro de NPs; potencial zeta - variações na concentração de NaBH<sub>4</sub> na faixa de 50 – 100 mmol.L<sup>-1</sup> (B<sub>1</sub> à B<sub>6</sub>) foram estatisticamente iguais; Polidispersividade – variáveis correspondentes a variações de concentração mais altas (H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> e H<sub>6</sub> *versus* H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) demonstraram-se estatisticamente diferentes, devido ao efeito causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o crescimento das AgNPs.

Compreendida a influência causada pelo NaBH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram definidas as condições mais adequadas para as AgNPs empregadas neste trabalho. À vista disso, todos os resultados subsequentes referem-se as AgNPs obtidas em condições ideais (Tabela 3).

#### 4.1.2 Estudo da aplicação de PVP na síntese de AgNPs

O preparo de nanopartículas metálicas estáveis sempre foi um desafio. Fatores como: tamanho, morfologia e atividade antimicrobiana são diretamente afetados pela sua estabilidade (Teegarden *et al.*, 2006; Shrivastava *et al.*, 2007; Kvitek *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2015). Resultados preliminares apontaram que, AgNPs com formato triangular estabilizadas com citrato de sódio não possuíam atividade antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O mesmo resultado foi alcançado por metodologia de disco-difusão em ágar e por microdiluição, justificado pela formação de aglomerados de AgNPs (redução de atividade antimicrobiana) devido a não estabilidade das nanopartículas quando em contato com o meio de cultura. Estes resultados também foram observados por Tanvir *et al.* (2017).

Logo, motivados pelo insucesso dos resultados preliminares, foi realizado estudo para adição do agente surfactante, o PVP. Neste estudo, fatores como: velocidade de centrifugação, meio de cultura, método de adição e concentração utilizada do PVP foram avaliados, respectivamente. Os espectros UV-Vis das amostras de AgNPs para as velocidades de centrifugação de 6000, 8000 e 10000 rpm estão presentes na Figura 10.

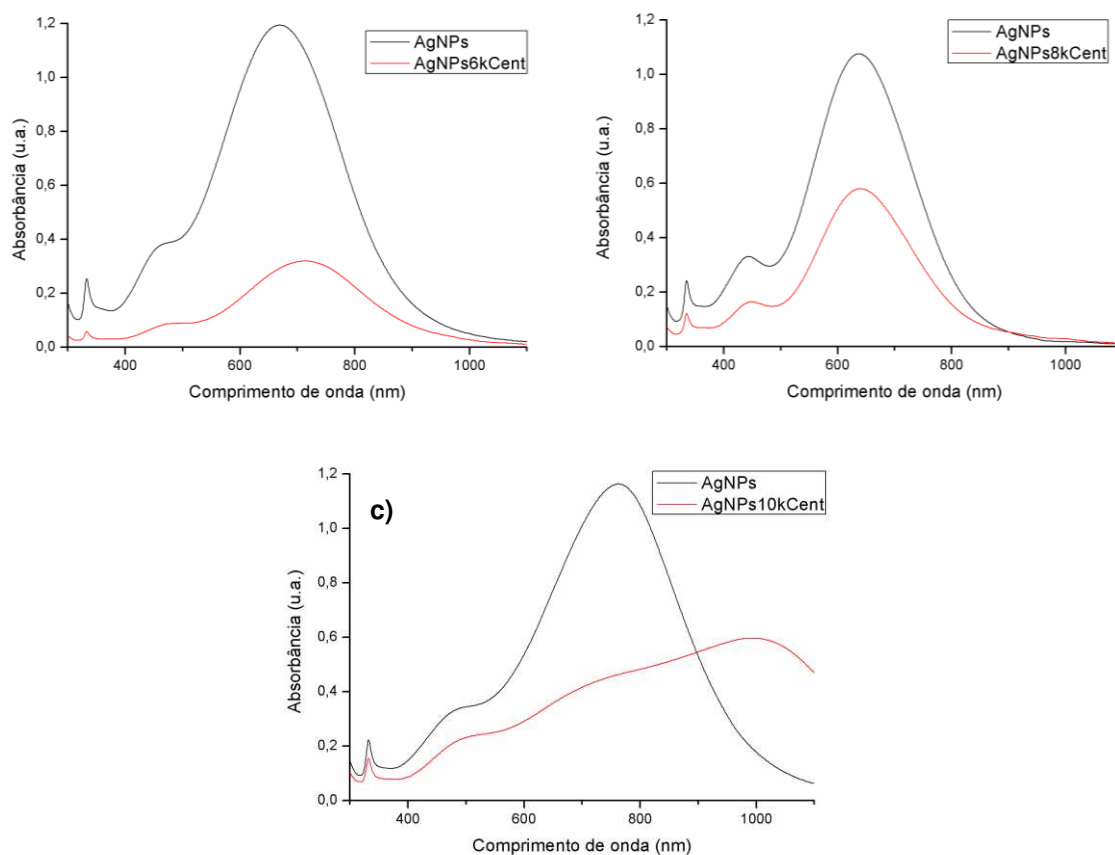


Figura 10 - Espectro UV-Vis das amostras de AgNPs padrão e centrifugadas a a) 6000 rpm b) 8000 rpm e c) 10000 rpm.

De acordo com os resultados da Figura 10, pode-se observar dois efeitos causados pela velocidade de centrifugação: efeito na concentração das AgNPs (observado para as 3 velocidades de centrifugação, por meio da variação da intensidade da banda principal de absorção  $>700$  nm) e efeito de agregação (observado através de deslocamentos das bandas, Figura 10 c).

O efeito na concentração é explicado pela lei de Lambert-Bee, a qual diz que: “A intensidade de um feixe de luz decresce exponencialmente ao passo que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente.” Desse modo, é observado um aumento na absorção da banda correspondente a ressonância plasmônica dipolo no plano em aproximadamente 700 nm (Chen e Carroll, 2002; Cheng *et al.*, 2018), com absorvância de 0.319, 0.580 e 0.596 nm para AgNPs centrifugadas com 6000, 8000 e 10000 rpm, proporcional ao aumento da velocidade de centrifugação. De acordo com o trabalho de Sousa (2016), que propôs um modelo do perfil de concentração de AgNPs em função do tempo e velocidade de centrifugação, a variação da concentração frente a velocidade de centrifugação se

explica pelo efeito da difusão associada ao movimento Browniano das nanopartículas. Assim, o decréscimo da concentração de AgNPs é consistente com o aumento da velocidade de rotação à medida que a centrifugação progride.

Já o efeito de agregação está atrelado ao aumento da velocidade de centrifugação e a estabilidade das AgNPs. Durante o processo de centrifugação, a solução é submetida a um campo gravitacional que sedimenta as partículas de acordo com seus coeficientes de sedimentação, o qual varia em função do formato e tamanho das partículas (Ma *et al.*, 2016). Dessa forma, quanto mais alta a velocidade de rotação, maior é o intervalo de tamanho de partículas sedimentadas (Stafford e Braswell, 2004).

No entanto, após a sedimentação das partículas, o que determina a formação definitiva de precipitados (*pellets*) ou possibilidade de ressuspensão das AgNPs é a capacidade de proteção do agente estabilizante (F. Gonçalves *et al.*, 2017). Para que ocorra a formação de aglomerados é necessário que as colisões proporcionadas entre as partículas durante a centrifugação tenham sido suficientemente fortes a ponto de superar a força de repulsão colombiana partícula-partícula, gerada pelas cargas superficiais das AgNPs recobertas com citrato de sódio (Ivrigh *et al.*, 2017; Ghasemi *et al.*, 2018).

Zhang, Qiao *et al.* (2011) em seus estudos monitoraram o crescimento de AgNPs por espectroscopia UV-Vis observando o deslocamento do comprimento de onda para comprimentos maiores durante a formação e crescimento das AgNPs análogo aos resultados observados no espectro da Figura 10 c), o qual nota-se um deslocamento da banda de absorção. Dessa forma, a velocidade de 10000 rpm foi descartada devido a formação de aglomerados.

Então, considerando que nanopartículas centrifugadas a 8000 rpm (Figura 10 b) apresentaram maior intensidade da banda de absorção e não deslocamento da mesma quando em comparação com nanopartículas centrifugadas a 6000 rpm (Figura 10 a) e 10000 rpm (Figura 10 c), a velocidade de 8000 rpm foi selecionada para dar continuidade do estudo.

Definida a velocidade de centrifugação, foi avaliada a estabilidade de AgNPs preparadas com PVP a 0,0033%, 0,033% e 0,33% (m/v) frente a duas soluções empregadas no cultivo microbiológico: 0,112 M de NaCl em caldo nutriente TSB 1:9

(v/v) e solução tampão fosfato salino (PBS) a 0,005 M em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v). Os resultados estão presentes na Figura 11.

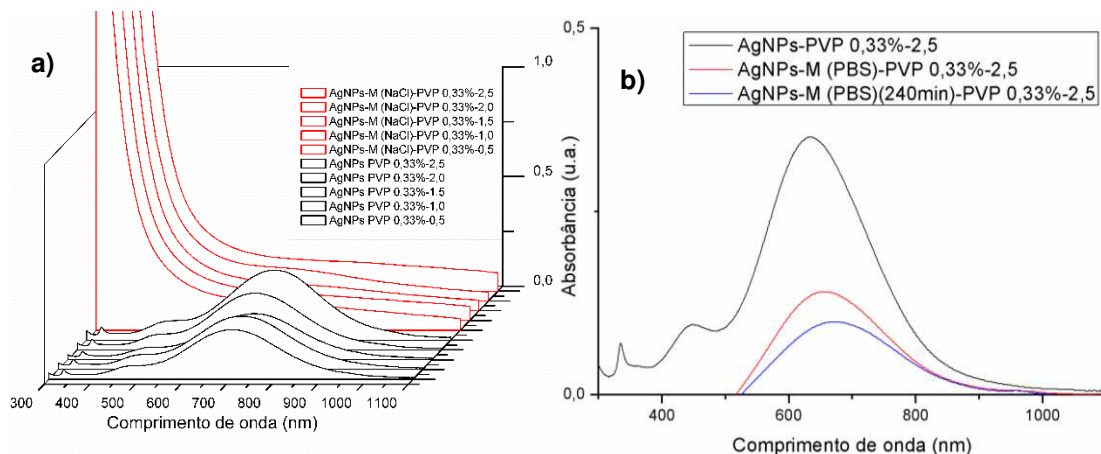


Figura 11 - Estabilidade de AgNPs preparadas com solução de PVP 0,33% (m/v) frente a solução simulante a) 0,112 M de NaCl em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v) e b) solução tampão fosfato salino (PBS) a 0,005 M em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v).

Observando os dados da Figura 11 a), nota-se que, com a adição da solução de 0,112 M de NaCl em caldo nutriente TSB 1:9 (v/v) todas as amostras de AgNPs PVP 0,33%-M (NaCl) em todas as variações de volume sofreram deslocamento das bandas de absorção, sugerindo forte agregação de partículas. Logo, a agregação da margem a duas possibilidades: concentração insuficiente de PVP adicionada; ou a não reação do PVP com as AgNPs. De acordo com o trabalho de Mulfinger *et al.* (2007) uma solução de 0,01% de PVP foi suficiente para estabilizar AgNPs contra a contaminação de 100  $\mu$ l de NaCl a 1,5 M. Logo, considerando que a concentração aqui empregada é aproximadamente 300x maior que a sugerida pela literatura é possível considerar a não reação do PVP.

Quanto as AgNPs-PVP 0,33%-M (PBS)(Figura 11 b)) não sofreram deslocamento imediato das bandas de absorção. No entanto, após o tempo de 240 minutos notou-se redução de intensidade, leve deslocamento e alargamento da banda de absorção relacionada a vibrações dipolo no plano ( $\sim$ 700 nm), o qual está diretamente relacionado à concentração e dispersão do tamanho de partículas. De acordo com Velgosová *et al.* (2016) o aumento da polidispersividade pode ser observado por meio do alargamento da banda de vibração de 700 nm o qual também implica na agregação e precipitação das AgNPs. Adicionalmente, nos estudos de



Antônio *et al.* (2015) a redução desta banda também estava relacionada à formação de agregados e, conseqüentemente, redução da concentração de AgNPs em solução. Assim sendo, considerando que a solução de NaCl em caldo nutriente proporcionou um crescimento mais acelerado das AgNPs, os estudos se voltaram a mudança da rota de síntese utilizando como contaminante a solução de PBS em caldo nutriente.

Resultados referentes a AgNPs estabilizadas com PVP nas concentrações de 0,0033% e 0,033% foram semelhantes aos aqui expostos (Figura 11), indicando que, independente da concentração de PVP adicionada, para esta rota de síntese, as AgNPs não foram recobertas. Esta afirmação pôde ser confirmada através de análises de DLS de AgNPs antes e após adição do PVP, as quais não apresentaram um aumento no tamanho das AgNPs após adição, resultado este contraditório, pois a ação surfactante do PVP se dá através do recobrimento das partículas pelo polímero em questão aumentando assim seu diâmetro (Tanvir *et al.*, 2017; Zhang, L. *et al.*, 2018). Dessa forma, o não aumento do diâmetro das partículas após adição do PVP foi mais um indício da não efetividade da rota de síntese em questão.

Por fim, tomando como base a metodologia de Zhang, Qiao *et al.* (2011) "Supporting Information" foi alterado o método de adição do PVP sendo este adicionado durante a síntese, de modo a permitir o crescimento das AgNPs já envoltas com o agente surfactante. Os espectros UV-Vis de nanopartículas estabilizadas com soluções de PVP a 0,017% e 0,033% ausentes e contaminadas com PBS 0,005 M com 0 e 7 dias estão presentes na Figura 12.

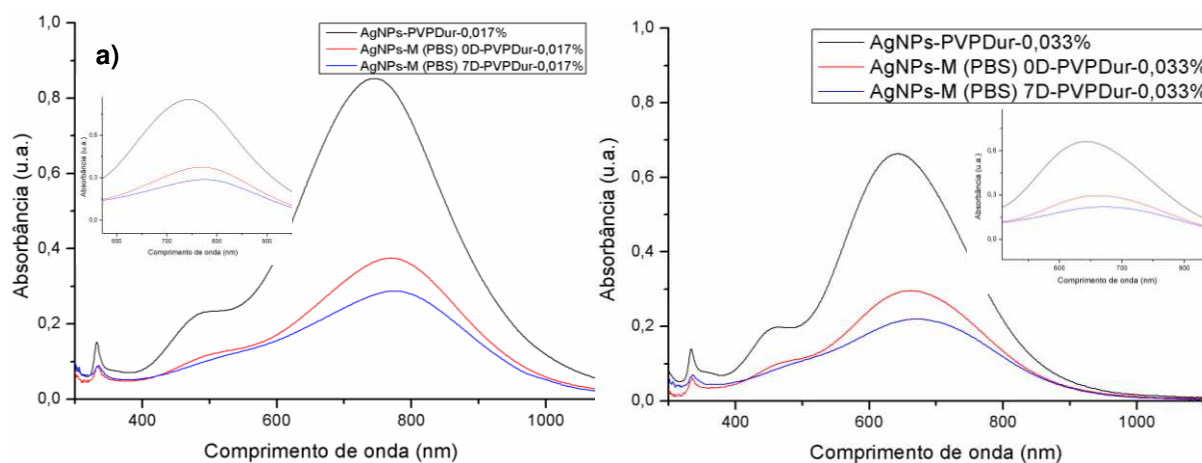


Figura 12 - Espectro UV-Vis de AgNPs estabilizadas com PVP a a) 0,017% (m/v), contaminadas com PBS no tempo de 0D e 7D e b) 0,033% (m/v), contaminadas com PBS no tempo de 0D e 7D.

Conforme os resultados presentes na Figura 12, os espectros das AgNPs não sofreram alterações aparentes após adição do contaminante para as duas concentrações estudadas. Já, para o tempo de 7 dias foi possível observar uma pequena redução de intensidade e alargamento da banda, indicando formação de aglomerados e crescimento das partículas. Todavia, a vista que mesmo em condições superestimadas de tempo as AgNPs permaneceram estáveis e, considerando que o teste microbiológico possui duração de 48h a rota de síntese empregando as concentrações de 0,017 e 0,033% de PVP demonstrou-se adequada para o preparo de AgNPs.

#### 4.1.3 Modelo de Calibração Multivariada

Os métodos de calibração multivariada têm como finalidade desenvolver, a partir de dados instrumentais, modelos que possam prever com precisão as propriedades ou características das amostras. A Figura 13 ilustra os valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2-JK (modelo de predição selecionado) versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro e polidispersividade, respectivamente.

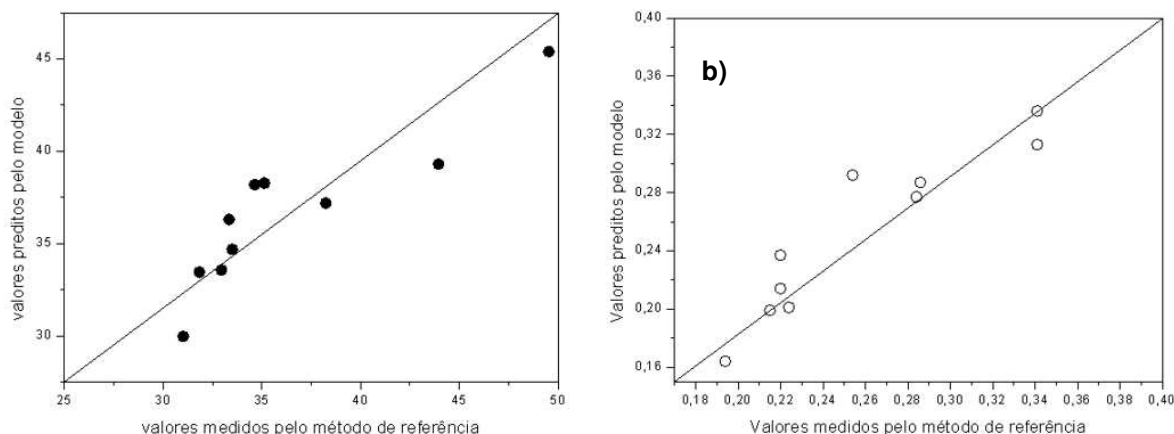


Figura 13 - a) Valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2 versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro e b) valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2-JK versus valores medidos pelo método de referência para a polidispersividade.

Valores preditos pelo modelo encontram-se próximos à reta, logo, quanto mais próximos da mesma melhor é o modelo. O erro obtido para a predição de diâmetro foi de 5,31% e 4,43% para polidispersividade, valores de erro aceitáveis em

relação à variação destas propriedades. A distribuição aleatória das amostras em torno da bissetriz indicou não existência de tendências nos resultados.

Rabbani *et al.* (2013) construíram um modelo quimiométrico baseado nos mínimos quadrados parciais (PLS) para determinar o tamanho de nanopartículas de ouro (AuNPs) com base na relação entre o comportamento cinético de agregação de L-cisteína (L-Cys) em diferentes tamanhos de AuNPs com cobertura de citrato. Seus resultados mostraram que os tamanhos previstos de amostras desconhecidas, obtidos pelo método introduzido, estão de acordo com os tamanhos medidos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) com erro médio de 3,76%.

Moreno-Martin *et al.* (2018) aplicaram espectroscopia UV-Vis com PLS para desenvolvimento de um método analítico multivariado que estima a concentração e tamanho de AgNPs baseado nas alterações da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPRB) de AgNPs quando formam estruturas agregadas com L-Cys. Seus resultados apresentaram boa correspondência entre os valores previstos e a concentração total de AgNPs com valores de recuperação variando entre 80-160%. Para determinação de tamanho o modelo não forneceu dados, sendo assim não considerado confiável.

Não foram encontrados trabalhos que determinassem simultaneamente tamanho e polidispersividade de AgNPs por meio do uso de UV-Vis associado a PLS. Adicionalmente, todos os trabalhos encontrados correlacionaram o comportamento cinético de agregação da L-cys com o tamanho de partícula. Para desenvolvimento do modelo a faixa de trabalho selecionada no espectro UV-Vis foi a de 250–450 nm, região a qual se localizam bandas de ressonâncias dipolo características de nanopartículas triangulares e bandas de absorção de nanopartículas com variadas morfologias (Chalmers e Griffiths, 2002; Moreno-Martin *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018).

#### **4.1.4 Espectroscopia UV-Vis**

É conhecido que a espectroscopia UV-Vis pode ser utilizada como indicativo de tamanho e forma de AgNPs. A Figura 14 apresenta o espectro UV-Vis correspondente a solução de AgNPs obtida através da condição de síntese padrão.

De acordo com a teoria de Mie, partículas anisotrópicas exibem duas ou três bandas de absorção de acordo com sua forma (Mie, 1908; Jin *et al.*, 2001). Pode-se observar uma banda máxima de absorção de 742 nm, característico de nanopartículas de prata com formato triangular quase perfeito (Jin *et al.*, 2001). Resultados similares foram obtidos por Chen e Carroll (2002).

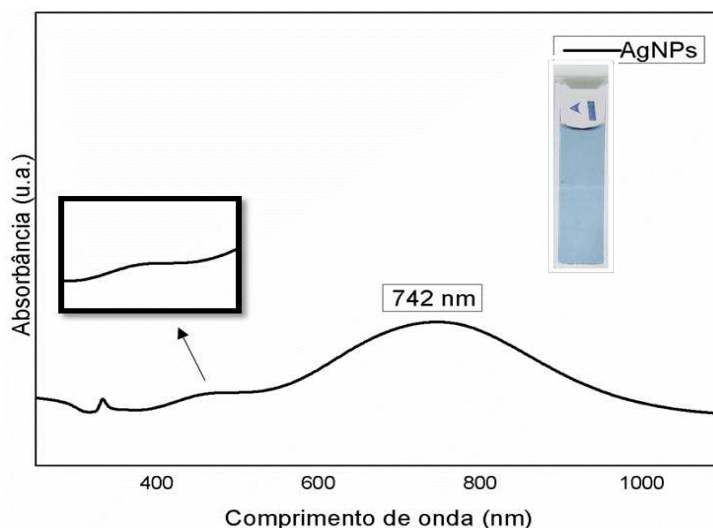


Figura 14 – Espectro UV-Vis da solução de AgNPs obtida através da condição padrão.

A segunda banda de absorção do espectro apresenta-se no formato de um ombro com absorção em 465nm, valor este que, de acordo com o cálculo de Schatz indica ressonâncias dipolo características de nanopartículas triangulares (Chalmers e Griffiths, 2002; Farooq *et al.*, 2018). Outro fator que corrobora essa afirmação é a cor da solução, azul escura (devido à excitação dos plasmons de superfície), a qual de acordo com Pacioni *et al.* (2015) trata-se de nanopartículas com formato triangular (nanoplacas). A terceira banda de absorção em 333 nm está associada à ressonância quadrupolo fora do plano (Jin *et al.*, 2001; Chen e Carroll, 2002; Farooq *et al.*, 2018).

Na Figura 15 tem-se o espectro UV-Vis das 12 repetições da solução de AgNPs preparadas em condições de síntese padrão. Todos os espectros apresentam os mesmos picos de absorção característicos de nanoplacas de prata. Deslocamentos do pico máximo de absorção são observados em todos os espectros, fator este resultante da excitação dos plasmons de superfície, propriedade sensível a morfologia das partículas, definida como a frequência em que elétrons de condução oscilam em resposta a um campo de radiação eletromagnética incidente (Mock *et al.*,

2002). Este efeito ocorre quando as dimensões do material são reduzidas e existem elétrons livres em sua banda de condução (Barnes *et al.*, 2003). Essas diferenças nas bandas de absorção das AgNPs nos permitem identificar as características importantes no espectro dos nanoprismas como também a relação sutil entre a forma da partícula e a frequência das bandas que compõem seus espectros.

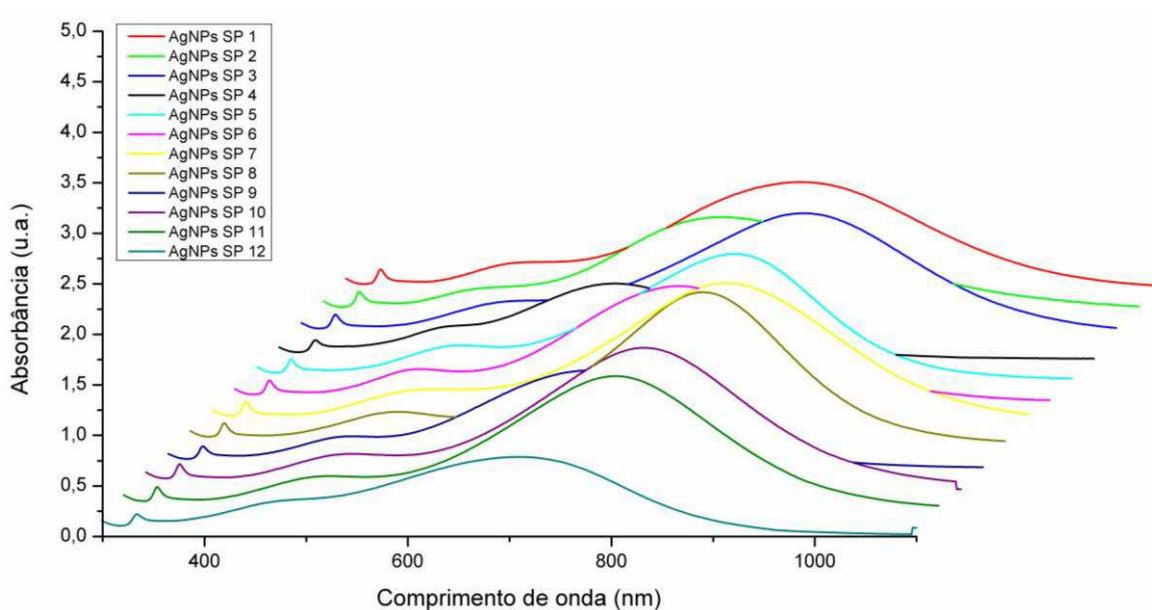


Figura 15 – Espectro UV-Vis das 12 soluções de AgNPs obtidas através da condição padrão de síntese.

#### 4.1.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (PZ)

O espalhamento Dinâmico de Luz é uma técnica amplamente utilizada para avaliação das dimensões, dispersão ou estabilidade de partículas em suspensão. Na Tabela 5 estão os dados de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta das AgNPs (01 – 12) e AgNPs-PVP (13 – 15).

Tabela 6 - Valores de diâmetro, polidispersividade e potencial zeta para síntese padrão de AgNPs.

Síntese	Diâmetro (nm)	Polidispersividade	Potencial zeta (mV)
1.	32,72	0,220	-32,20
2.	33,76	0,277	-44,34
3.	33,67	0,242	-31,92
4.	33,47	0,219	-34,58
5.	33,37	0,209	-41,32
6.	32,82	0,191	-40,06
7.	33,14	0,193	-24,52
8.	35,31	0,181	-40,16
9.	32,29	0,169	-33,39
10.	31,68	0,196	-39,73
11.	31,35	0,188	-32,93
12.	32,26	0,190	-35,79
13.	38,40	0,251	-31,66
14.	36,69	0,243	-31,29
15.	39,41	0,211	-34,14

Os resultados presentes na Tabela 6 indicam um valor médio de diâmetro de  $32,99 \pm 1,06$  nm quanto a AgNPs ausentes de PVP e  $38,17 \pm 1,37$  nm, valores satisfatórios para a aplicação desejada, visto que, em comparativo com estudos anteriores é observado nanopartículas maiores (menor área superficial e, conseqüentemente, redução de ação bactericida) (Feng *et al.*, 2000) e de mesma morfologia com poder bactericida satisfatório. Pal *et al.* (2007) avaliaram a atividade bactericida da prata contra *Escherichia coli* comparando nanopartículas de prata com diferentes formas. Em seus resultados, nanoplaquetas de prata de 40nm e concentração de 6,25ppm foram eficazes contra o crescimento de *Escherichia coli*, apresentando a menor concentração inibitória mínima em comparação com nanobastões de prata, nanoesferas de prata e nitrato de prata. Complementarmente, é notado um

crescimento das AgNPs-PVP, resultado esperado devido ao recobrimento com o PVP.

Para nanopartículas metálicas, valores de potencial zeta abaixo de  $X < -0,30$  mV ou acima de  $X > 0,30$  mV são sinônimos de estabilidade (Taşkıran *et al.*, 2017). Com exceção da amostra 7 todas as demais satisfazem ao intervalo  $X > -0,30$  mV, fator este indicativo de que as cargas presentes na superfície das AgNPs são suficientes para evitar formação de clusters (aglomeração de NPs). No que diz respeito ao índice de polidispersividade, o mesmo varia de 0 a 1, onde, quanto menor, mais monodispersa estará a solução (Mahl *et al.*, 2011b). Todos os valores estiveram localizados abaixo de  $< 0,300$ , indicando que, a solução como um todo encontra-se monodispersa, sinal da não aglomeração de partículas.

#### **4.1.6 Repetibilidade – Teste de Tukey**

O teste Tukey é um teste comparativo entre médias utilizado para testar toda e qualquer diferença entre duas médias de tratamento. A Figura 16 expressa as médias das amostras (representado pela linha horizontal em destaque) e os respectivos intervalos de confiança para os pares de amostras. Observando a Figura 16 a), a maioria das médias atendem ao intervalo de confiança ( $p < 0,5$ ), sendo assim, significativas. Para a Figura 16 b) e c), tem-se um maior número de médias não significativas. Contudo, como os resultados de polidispersividade e potencial zeta atendem aos critérios de aceitação presentes na literatura (valores abaixo de  $< 0,300$  e  $< -0,30$ mV) pode-se dizer que todas as amostras foram significativas.

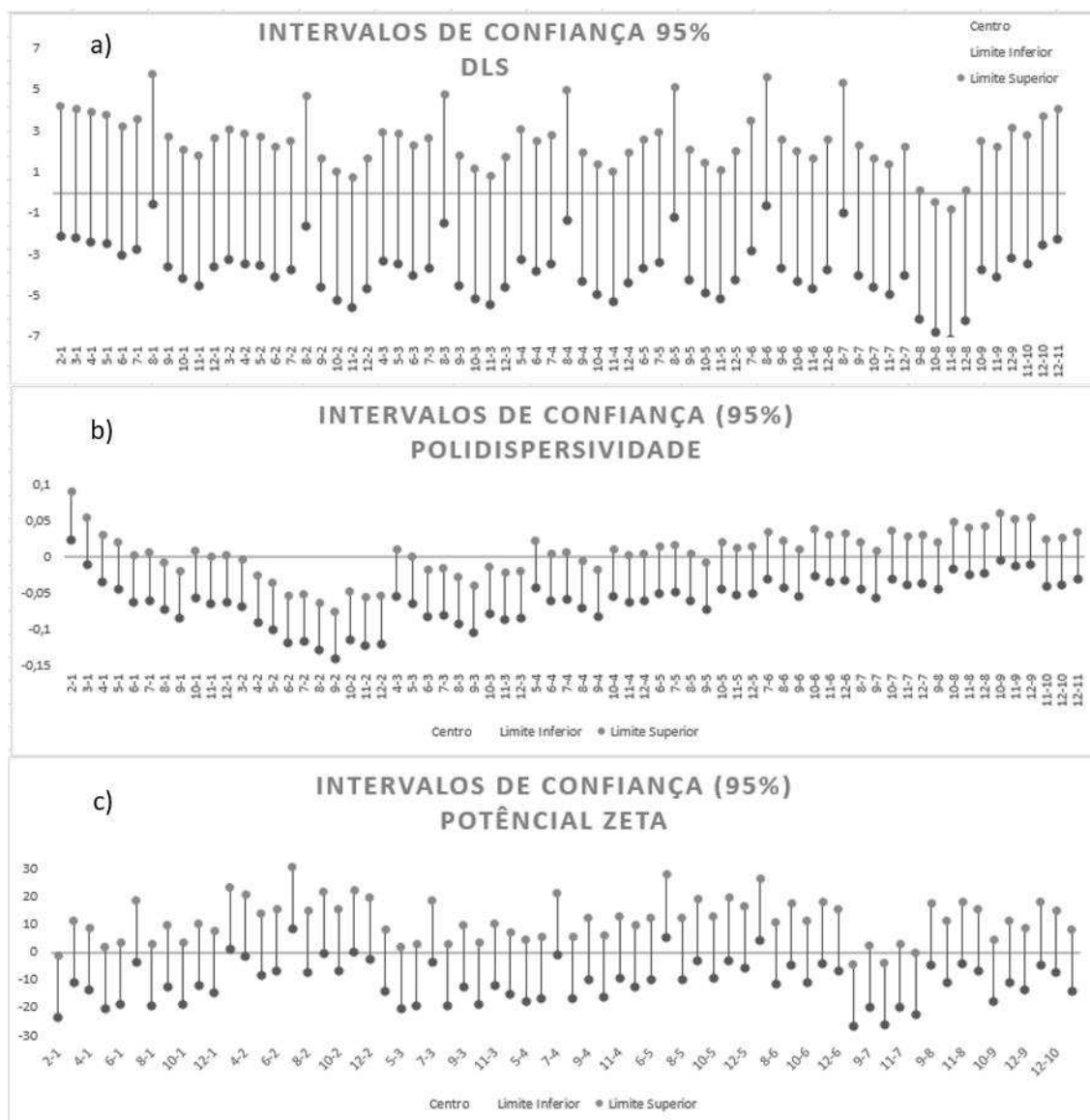


Figura 16 - a) Distribuição da média do tamanho de partículas b) Distribuição da média da polidispersividade c) Distribuição da média dos índices de potencial zeta.

#### 4.1.7 Estudo de estabilidade

A estabilidade de AgNPs é um parâmetro fundamental para sua eficiência e reprodutibilidade de suas propriedades em função do tempo de aplicação. A Figura 17 ilustra a estabilidade de 3 amostras de AgNPs em função do tempo.



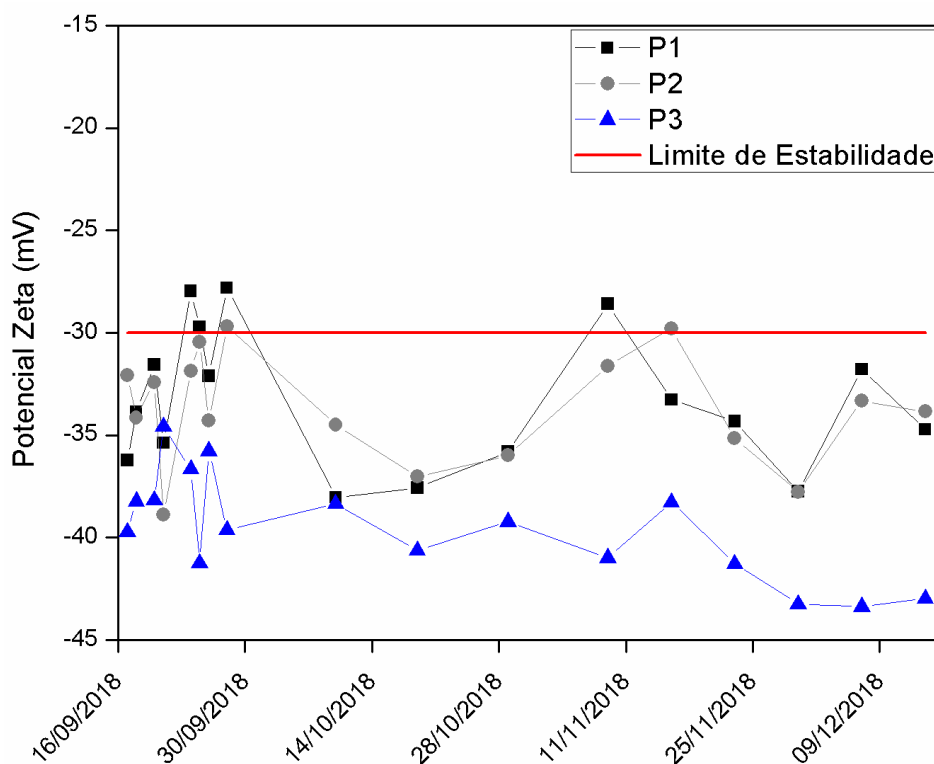


Figura 17 - Representação do potencial zeta das AgNPs em função do tempo. Período de análise: 17/09/2018 à 14/12/2018.

Avaliando os resultados, pequenas variações na estabilidade das AgNPs puderam ser notadas. As amostras P1 e P2 apresentaram valores acima do limite de estabilidade (-30 mV), chegando à -27,80 mV e -29,78 mV, respectivamente. Uma possível explicação para a oscilação dos valores de potencial zeta está ligada a formação de clusters. Foi percebido a formação de pequenos depósitos de coloração azul nas amostras após o período de 3 meses. Por consequência, é provável que, os valores de PZ acima do limite de estabilidade tenham sido coletados em períodos os quais os clusters estavam sendo formados. Passada sua formação e precipitação valores de PZ tendem a se estabilizar. Todavia, esses valores encontram-se muito próximos do limite de estabilidade, não sendo indicativo de grandes variações das AgNPs que ainda se encontram em solução.

Jaiswal e Mishra (2018) avaliaram a estabilidade de AgNPs estabilizadas com curcumina citrato de sódio. Como resultados, após o tempo de 1 mês as AgNPs preparadas com citrato apresentaram aumento de diâmetro de 35 para 55 nm e variação do PZ de -40 mV para -15 mV indicando formação de clusters. O tempo

para formação de clusters e variação dos valores de PZ encontram-se em concordância com os resultados aqui expostos.

#### 4.1.8 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A AFM é uma técnica bastante utilizada na análise de nanoestruturas. A Figura 18 de ilustra as microscopias de força atômica das AgNPs.

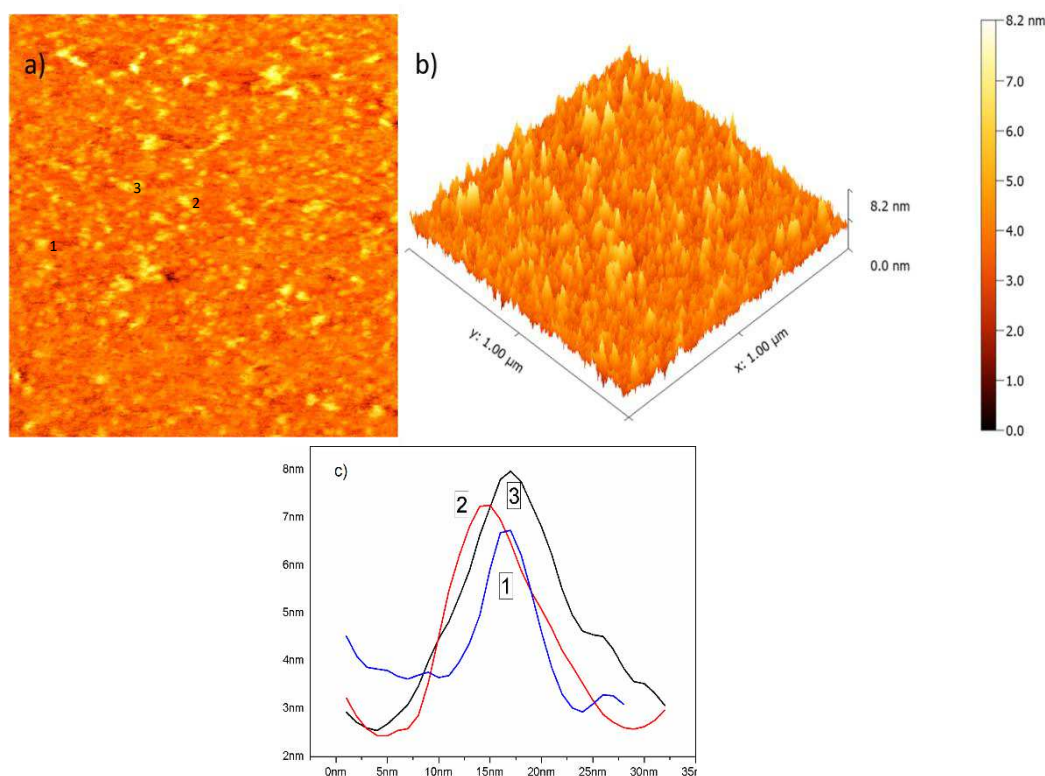


Figura 18 - Microscopia de força atômica de nanopartículas de prata em vidro; área digitalizada 1 µm x 1 µm: (A) topografia 2-D; (B) topografia em 3-D; (C) perfis de altura ao longo das linhas indicadoras.

A princípio, o objetivo principal da análise de AFM era confirmar o tamanho e morfologia das AgNPs como prismas (ou placas), assim como indicado pelo DLS e espectroscopia UV-Vis, respectivamente. No entanto, a AFM possui uma limitação na determinação de morfologias. O tamanho da ponta do cantilever em alguns casos pode ser muitas vezes maior do que as partículas que estão sendo analisadas, levando a erros no deslocamento da topografia da partícula que resultam em superestimações da dimensão lateral das nanopartículas (Pacioni *et al.*, 2015).

Diante do exposto, a AFM foi aplicada apenas para confirmação da formação e determinação da espessura média das AgNPs.

Na Figura 18 a) nota-se a existência de AgNPs com espessura média de 8,25nm e a presença de agregados gerados possivelmente pela secagem da amostra sobre o vidro e/ou efeitos de superfície (Chandran *et al.*, 2006; Mocanu *et al.*, 2013; Mohapatra *et al.*, 2015). Pletikapić *et al.* (2012) estudaram a interação do polímero extra celular (EPS) de diatomáceas marinhas (*Cylindrotheca fusiformis* e *Cylindrotheca closterium*) com AgNPs. Em seus estudos foram obtidas AgNPs com 10, 20, 30 e 40 nm de espessura que penetraram na parede celular causando danos a célula, mas sem desintegração da parede celular.

Tamilselvan *et al.* (2017) avaliaram as interações de AgNPs com o vírus Poliedrose Nuclear Bombyx mori (BmNPV). Em seus resultados amostras de BmNPV tratadas com AgNPs mostraram alterações em sua superfície, ruptura da membrana celular e no capsídeo, acarretando na perda da estabilidade do BmNPV. Essa ruptura se dá devido a interação das AgNPs com as glicoproteínas presentes na membrana viral das BmNPV. Saravanan *et al.* (2018) sintetizaram AgNPs com tamanho variando entre 22-60 nm e espessura de 1,8 nm e avaliaram sua atividade bacteriana contra *Samonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, patógenos resistentes a múltiplas drogas. Em seus resultados as AgNPs demonstraram ação bactericida efetiva contra as bactérias em questão, desde a concentração mais baixa testada (5 µL) até a mais alta (20 µL).

Logo, de acordo com os resultados encontrados na literatura, AgNPs com espessuras de partícula variando entre 1,8 – 40 nm apresentaram atividade contra diferentes microrganismos e não citotóxicas. As AgNPs sintetizadas nesta pesquisa se enquadram nesse intervalo.

#### **4.1.9 Difração de Raios X (DRX)**

A técnica de Difração de Raios X tem sido bastante utilizada para caracterização de materiais cerâmicos. No entanto, suas aplicações não se restringem apenas a este tipo de material. Para materiais nanoparticulados sua contribuição possibilita avaliar desde a estrutura cristalina até o tamanho de partícula, densidade e parâmetros de rede através de métodos sofisticados de

refinamento, tal como o Refinamento de Rietveld. A Figura 19 mostra o DRX para as AgNPs.

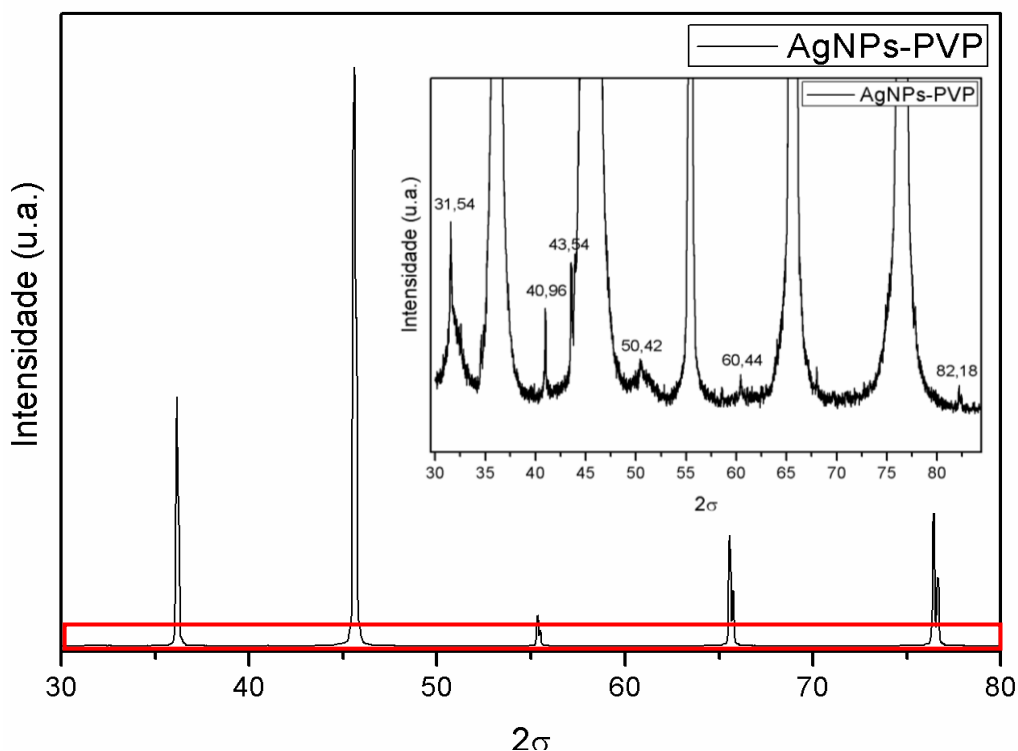


Figura 19 - Difratoograma de nanopartículas de prata preparadas em porta amostra de mica.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19 são observados picos localizados em  $36,16^\circ$ ,  $45,58^\circ$ ,  $55,36^\circ$ ,  $65,58^\circ$  e  $76,42^\circ$ , os quais correspondem a mica, material do porta amostra utilizado na análise (Liu *et al.*, 2017). Quanto as AgNPs, após realizar um recorte próximo a linha de base do difratograma, pôde-se observar picos localizados em  $31,54^\circ$ ,  $40,96^\circ$ ,  $43,54^\circ$ ,  $50,42^\circ$ ,  $60,44^\circ$  e  $82,18^\circ$  os quais correspondem aos planos (101), (200), (220), (222) e (420), onde, de acordo com o Internacional Center Diffraction Data correspondem a estrutura cúbica de face centrada da prata metálica (arquivo JCPDS No. 03-0921)(Siddiqui *et al.*, 2013; El-Faham *et al.*, 2014; Gregory *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2017).

#### 4.1.10 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC)

A técnica de MEV é bastante empregada na caracterização morfológica e estrutural dos materiais. No mundo das nanopartículas essa técnica tem um papel essencial: a comprovação da formação e morfologia das nanopartículas. Na Figura 20 estão presentes as micrografias das AgNPs. Vale ressaltar que, estes resultados correspondem a AgNPs não recobertas com PVP.

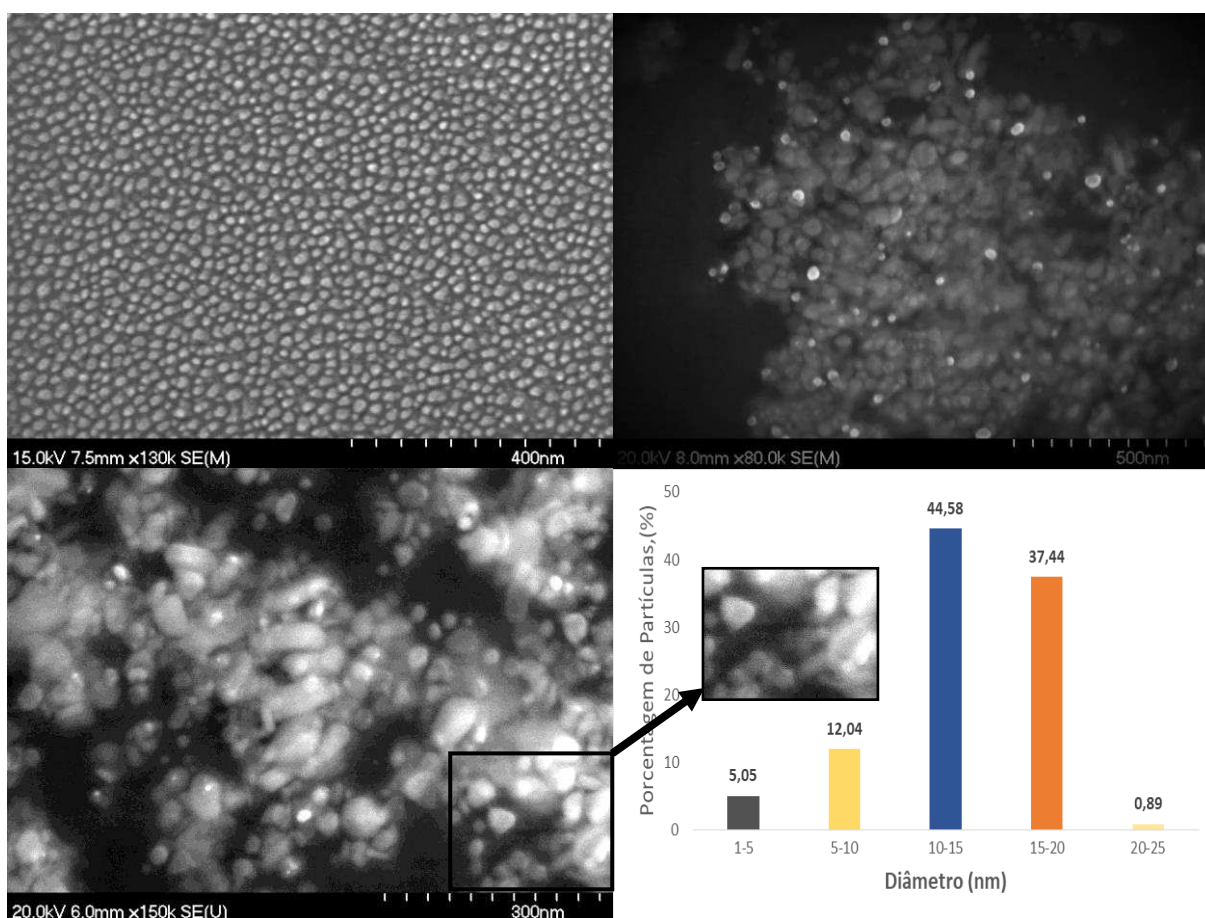


Figura 20 - Imagens de MEV-EC e histograma de distribuição de partículas.

Pela Figura 20, pode-se observar a presença de partículas em escala nano (abaixo de 100 nm)(Ferreira e Rangel, 2009), bem dispersas e com distribuição de tamanho homogênea, confirmando a obtenção de nanopartículas metálicas como também já observado nas análises de DLS, que indicaram a obtenção de AgNPs monodispersas (polidispersividade < 0,300 (Shah *et al.*, 2018)). Há presença majoritária de nanopartículas com formato de placa-triangular (nanoplacas), corroborando com os resultados de espectroscopia UV-Vis (Chalmers e Griffiths,

2002; Farooq *et al.*, 2018). Com o auxílio do software ImageJ version 1.8.0 foi possível realizar a obtenção do tamanho de 500 nanopartículas, onde, de acordo com os resultados do histograma, as nanopartículas apresentaram intervalo de tamanho entre 1 a 25 nm com quantidade majoritária de 10-15 nm (44,58%) e tamanho médio de  $13,25 \pm 3,84$  nm.

No entanto, existe uma diferença de aproximadamente 15 nm quanto ao tamanho das partículas obtidos por DLS e por MEV. Isso é explicado pelo princípio das técnicas. O DLS mede a luz espalhada por um laser que passa pelo coloide, medindo o diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio da relação entre a intensidade da luz difusa em função do tempo (Berne e Pecora, 2000). Este diâmetro refere-se não apenas ao núcleo metálico das nanopartículas (como é no caso das técnicas microscópicas), mas também a todas as substâncias adsorvidas na superfície das nanopartículas (por exemplo, surfactantes e estabilizadores em geral), justificando assim a diferença entre os diâmetros observados (Tomaszewska *et al.*, 2013).

Dessa forma, DLS e MEV atuam como técnicas complementares entre si, de tal maneira que, realizando um comparativo entre os diâmetros obtidos por DLS para as nanopartículas AgNPs, AgNPs-PVP e por MEV para as AgNPs pôde-se estimar a espessura da camada formada por cada agente estabilizante em volta das AgNPs. Para estes cálculos foi considerado o tamanho médio das AgNPs obtido por MEV. Na Tabela 7 estão presentes os tamanhos das AgNPs e espessuras da camada de citrato de sódio e PVP.

Tabela 7 - Dados de diâmetro de partícula e espessura da da camada de estabilizantes presentes nas AgNPs.

Síntese	Técnica	Diâmetro (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Espessura da camada (PVP)	Espessura da camada (Citrato de sódio)
AgNPs	MEV	$13,25 \pm 3,84$	-	-	-
AgNPs	DLS	-	$32,99 \pm 1,06$	-	19,74
AgNPs-PVP	DLS	-	$38,17 \pm 1,37$	-	5,18

Andrade (2013) investigou a influência do PVP no processo de estabilização de AgNPs, no tocante a distribuição de tamanho e formação da camada de PVP em torno das nanopartículas. Para tanto, foram preparadas AgNPs-PVP com diferentes razões molares, fixando-se a concentração de  $\text{AgNO}_3$  em  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  alterando a razão mássica do PVP em 1.5, 3.0 e 6.0 e imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram coletadas. Em seus resultados, as micrografias mostraram uma camada cinza envolvendo as partículas, camada está correspondente ao PVP. Valores de espessura de  $3,6 \pm 0,4 \text{ nm}$ ,  $4,6 \pm 0,7 \text{ nm}$  e  $4,2 \pm 0,2 \text{ nm}$ , para as razões mássicas PVP/ $\text{AgNO}_3$  de 1,5, 3,0 e 6,0, respectivamente, foram obtidos. Em nossa pesquisa foi definida uma razão mássica de 3,3 ( $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  e  $0,033 \text{ mol.L}^{-1}$  de solução aquosa de PVP) e obtida uma camada de PVP com espessura de  $5,18 \text{ nm}$ , resultado este condizente com a literatura. Adicionalmente, foi possível empregar eficientemente a técnica de DLS no cálculo da camada de PVP, demonstrando-se está como uma via alternativa ao MET para obtenção desta propriedade.

## **4.2 Caracterização da O-CMQ**

### **4.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de infravermelho foi realizada com o intuito de confirmar se a carboximetilquitosana utilizada nesta pesquisa era a O-CMQ. A Figura 21 ilustra o espectro infravermelho da O-CMQ.

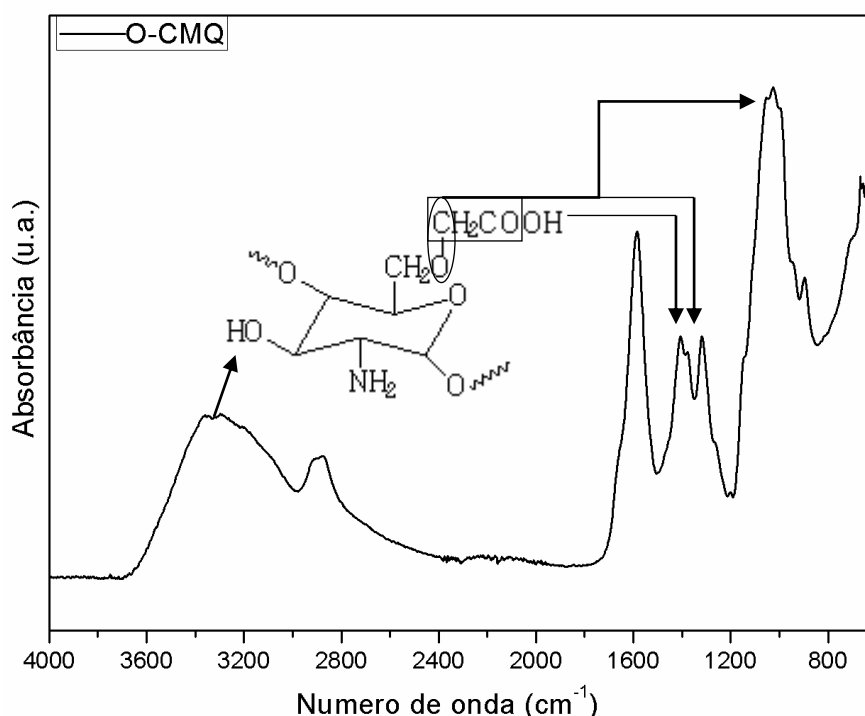


Figura 21 - Espectro infravermelho da O-CMQ.

Bandas referentes à ligação de  $\text{-OH}$  e  $\text{-CH}$  podem ser encontradas em  $3360$  e  $2883 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Chen e Park, 2003; Anitha *et al.*, 2009). A vibração localizada em  $1406 \text{ cm}^{-1}$  é referente ao grupo  $\text{-CH}_2\text{CO-}$  em éter (Fei Liu *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2007). A vibração de  $1052 \text{ cm}^{-1}$  e estiramento com formação de pico intenso em  $1320 \text{ cm}^{-1}$  são referentes as vibrações  $\text{-C-O-}$  e  $\text{C-O}$ , respectivamente, e vibração em  $1584 \text{ cm}^{-1}$  correspondem ao grupo  $\text{-NH}_3^+$  e são características da O-CMQ (Zhao *et al.*, 2001; Anitha *et al.*, 2011).

### 4.3 Caracterização do Gel O-CMQ/PVA

#### 4.3.1 Avaliação gravimétrica de perda de umidade

Devido a simplicidade e facilidade de aplicação, estudos gravimétricos de perda de umidade (PU) vem sendo empregados como uma importante técnica para avaliação preliminar da capacidade de retenção de água dos materiais. Outro ponto importante que destaca a necessidade de estudos térmicos para géis é a temperatura, a qual influencia diretamente em sua estabilidade, logo, se torna um parâmetro que deve ser avaliado para qualquer formulação desenvolvida (Corrêa *et*



*al.*, 2005). Na Figura 22 estão presentes as curvas de perdas de massa para os géis de O-CMQ e O-CMQ/PVA em suas três composições de PVA (0.1, 0.5 e 1%).

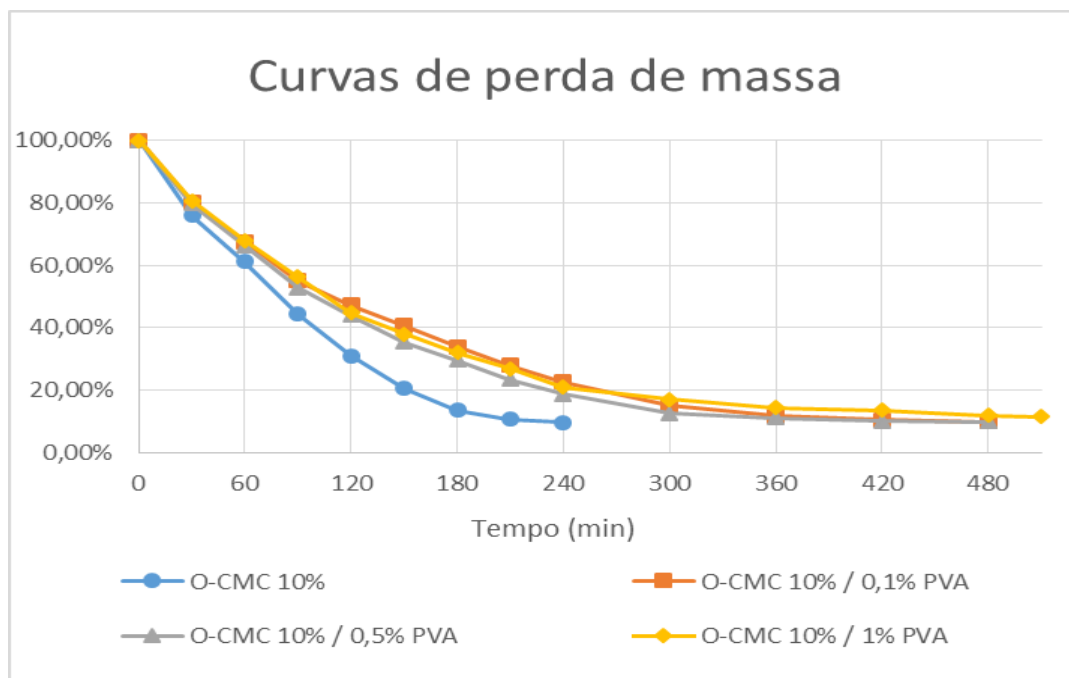


Figura 22 - Curvas de perda de massa para gel de O-CMC 10% e preparado com 0.1, 0.5 e 1% de PVA.

Observando os resultados presentes na Figura 22 as curvas correspondentes as formulações O-CMQ 0.1, 0.5 e 1% de PVA possuem um comportamento de PU similar. No intervalo de tempo de 0 a 240 minutos é registrada uma PU de ~80% para as três composições e após 480 minutos perda superior a 95%. Para o gel de composição O-CMQ 10% ausente de PVA é registrada uma PU de 80% no tempo de 150 minutos, perda está 1,6 vezes mais rápida quando em comparação com os géis de PVA. No tempo de 240 minutos foi registrada uma perda superior a 95%, cerca de 2 vezes mais rápida quando comparado aos géis de PVA.

Nas pesquisas de Samal *et al.* (2009) foram preparados hidrogéis a base de quitosana/PVA/Nanotubos de carbono e suas propriedades morfológicas, térmicas e físicas foram avaliadas. Para as análises térmicas foram registradas curvas de aquecimento isotérmicas para hidrogéis PV10 (hidrogel preparado com PVA a 10% m/v), PVCHIO10 (hidrogel preparado a 10% de PVA e 1% de quitosana (m/v)) e PVCHIONT10 (hidrogel preparado a 10% de PVA, 1% de quitosana e 0,25% de nanotubos de carbono(m/v)). Em seus resultados a composição PVCHIO10 exibiu uma PU de ~80% nos primeiros 90 minutos, enquanto isso, as composições PV10 e

PVCHIONT10 apresentaram perdas máximas de 46% e 61%, respectivamente, para o intervalo de tempo de 250 minutos de análise. De acordo com os autores, um maior teor de poros presentes na amostra de PVCHIO10 foi considerada como a principal razão pela qual a água se difundiu com mais facilidade da rede do hidrogel.

Chen *et al.* (2018) em suas pesquisas desenvolveram hidrogéis a base de carboximetilquitosana/óxido de grafeno (GO)/Poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) objetivando o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Em seus resultados, foi observado que, maiores concentrações de carboximetilquitosana proporcionam uma maior retenção de água na massa final do hidrogel, fator este diretamente relacionado ao aumento da densidade de reticulação que dificulta a difusão de água.

Gholamali *et al.* (2019) prepararam hidrogéis a base de carboximetilquitosana/PVA/AgNPs pela metodologia *in situ* (crescimento de nanopartículas no interior dos hidrogéis) com o objetivo de aplicá-lo como um sistema de liberação controlada de fármacos. Em seus estudos foram desenvolvidos hidrogéis com as proporções em peso de 3:1, 1:1 e 1:3 O-CMQ/PVA (m/m) contendo AgNPs (m/v) sendo observado que com o aumento da quantidade de AgNPs, não houve alteração significativa na capacidade de retenção de água dos hidrogéis. No entanto, houve um aumento da retenção de água com o aumento da concentração de PVA na estrutura de hidrogel, fator este relacionado à maior ligação das cadeias poliméricas.

Logo, de acordo com a literatura, maiores concentrações de O-CMQ e PVA auxiliam no aumento da retenção de água, justificando assim as reduções de PU aqui observadas quando comparados os géis a base de O-CMQ e O-CMQ/PVA (Chen *et al.*, 2018; Gholamali *et al.*, 2019). Outro ponto a ser destacado é que a presença de AgNPs na estrutura dos géis não influencia na sua capacidade de PU, logo, não é necessária a realização deste estudo para os géis O-CMQ/PVA/AgNPs. Quanto as variações de PVA aqui realizadas, não foram observadas mudanças significativas quando comparadas entre si, efeito diferente do observado no trabalho de (Gholamali *et al.*, 2019), fator este que pode estar relacionado as pequenas quantidades de PVA empregadas nas formulações dos géis aqui preparados. Os géis O-CMQ/PVA 0.1, 0.5 e 1% demonstraram PU 2,6 vezes inferior quando comparado aos resultados apresentados por Samal *et al.* (2009).

Dessa maneira, os géis dotados de PVA apresentaram PU inferior ao gel composto apenas por O-CMQ, fator este que pode estar relacionado a formação de ligações cruzadas proporcionadas pelo PVA, aumentando assim a retenção de água das formulações com PVA. Dessa forma, apenas as composições O-CMQ/PVA 0.1, 0.5 e 1% foram selecionadas para demais caracterizações.

#### **4.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A termogravimetria segundo a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) e definida como: “Um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura” (Haines, 2012). Fazendo uso da TGA e possível, por exemplo: avaliar a corrosão de metais em condições de alta pressão; estudar condições de calcinação de minerais; estudar a decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos e de substâncias poliméricas; estudos de evaporação de líquidos; degradação térmica oxidativa de polímeros; estudos de cinética de reação, dentre outros. Além disso, aplicando a derivada primeira da TGA (DTG) os eventos correspondentes às variações de massa da curva TGA são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, tornando as informações visualmente mais acessíveis e com melhor resolução.

Logo, as técnicas TGA e DTG foram aplicadas em conjunto para avaliação da estabilidade térmica dos géis O-CMQ e O-CMQ/PVA. As Figuras 23 e 24 apresentam os resultados da TGA e DTG, respectivamente.

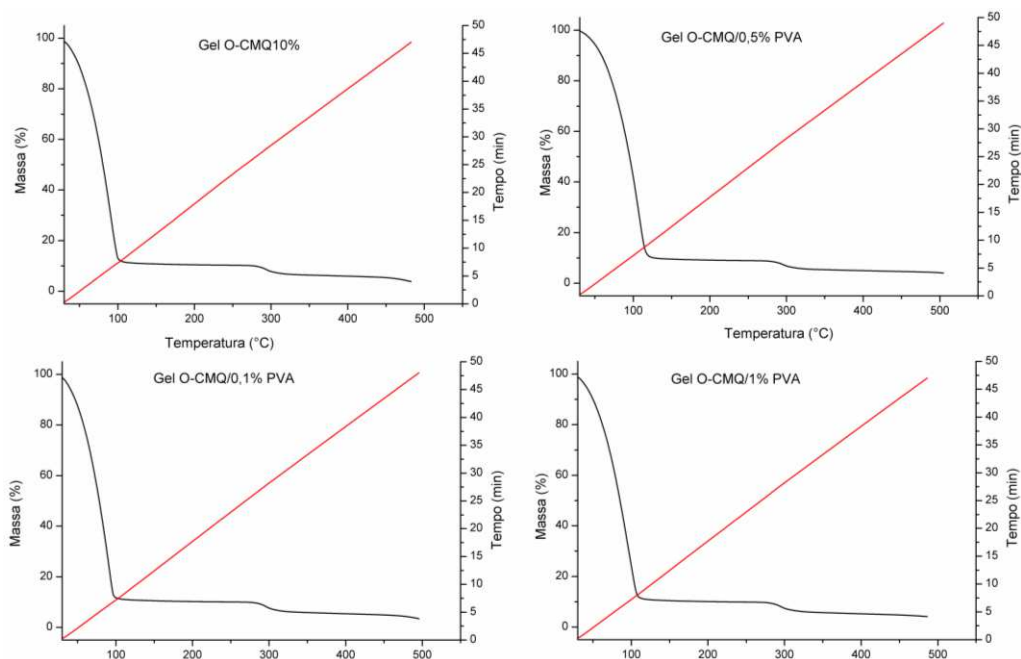


Figura 23 - Análises de TGA dos Géis O-CMQ e O-CMQ/PVA.

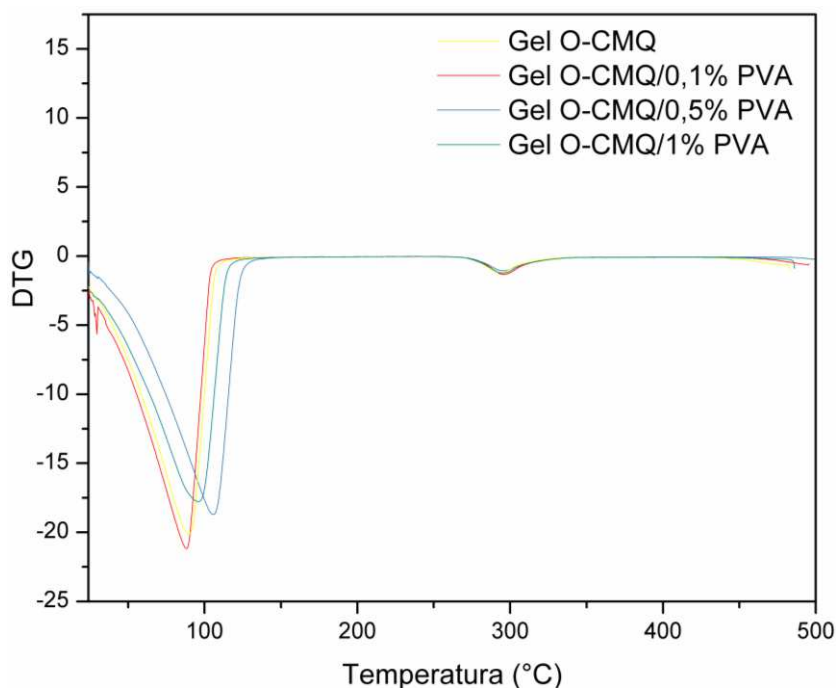


Figura 24 - Análises de DTG dos Géis O-CMQ e O-CMQ/PVA.

De acordo com os resultados, observa-se a presença de dois eventos de degradação, o primeiro entre 30 – 137 °C associado a evaporação de água presente nos géis (Gholamali *et al.*, 2019) representando uma perda de massa média de  $88,24 \pm 0,97\%$ . A segunda perda de massa (270 – 330 °C) apresentou um valor médio de

3,60 ± 0,17% e está relacionada a degradação térmica da carboximetilquitosana por meio da clivagem da cadeia principal da quitosana por meio da quebra da ligação glicosídica (C–O–C) e dos seus grupos substituintes (CH<sub>2</sub>COOH) (Kittur *et al.*, 2002; De Abreu e Campana-Filho, 2009; Xu *et al.*, 2010; Albu *et al.*, 2016).

Observando as curvas de perda de massa dos géis O-CMQ/PVA e O-CMQ não são notadas diferenças entre elas, apresentando o mesmo número de eventos de degradação, assim como evidenciado na DTG, a qual apresenta variações na intensidade do primeiro evento de perda de massa, ao qual está relacionado as variações de umidade presente nos géis. A inexistência de variações da estabilidade térmica com a adição de PVA anda em consonância com os trabalhos de (Saba *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2019).

#### **4.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite identificar as bandas de vibração presentes nos compostos. Devido a seu potencial, é bastante empregada no estudo dos materiais, principalmente em sua identificação, caracterização e na investigação de estruturas químicas, principalmente quando se emprega mais de um composto atrelado a sua matriz (Lin *et al.*, 2005; Jankaew *et al.*, 2015), como a exemplo do gel aqui desenvolvido. Logo, buscando confirmar e compreender as interações entre a O-CMQ e o PVA após formação do gel e correlacionar tais mudanças as perdas de massa e degradação dos géis foram, coletados os espectros de infravermelho dos géis secos e úmidos recém preparados. A Figura 25 mostra os espectros correspondentes aos géis úmidos em todas as composições.

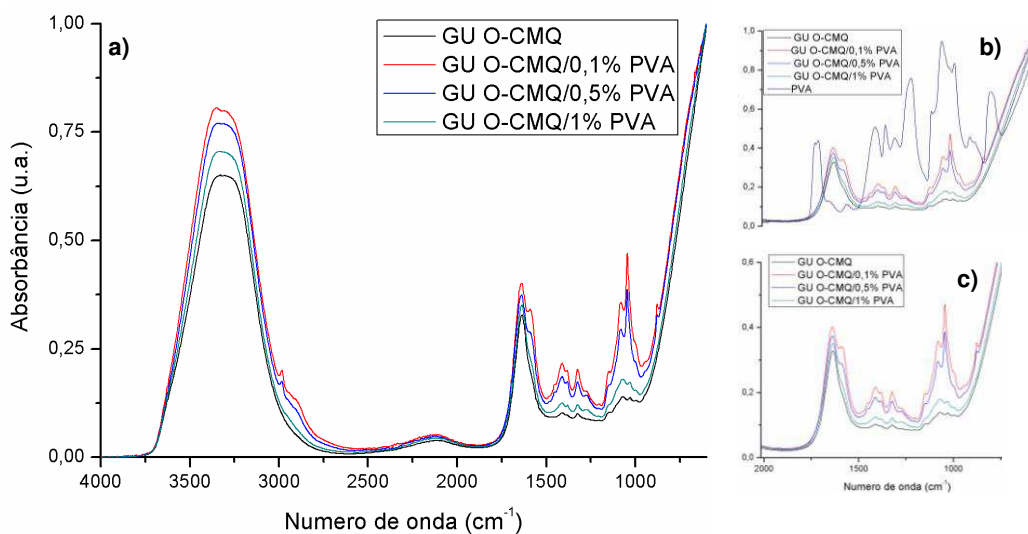


Figura 25 – Espectros de FTIR para as amostras de géis úmidos logo após seu preparo.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 25 a) inicialmente se observa o desaparecimento da banda de vibração  $2983\text{ cm}^{-1}$  correspondente a ligação  $-\text{CH}$ . Isso confirma a ligação entre o PVA e a O-CMC assim como descrito nos estudos de Alhosseini *et al.* (2012) os quais prepararam nanofibras de PVA/quitosana e relataram o desaparecimento desta banda quando ligações inter e intramoleculares de  $-\text{OH}$  foram formadas entre as cadeias quitosana e PVA. Logo, a redução das bandas de  $-\text{OH}$  localizadas em  $3440\text{ cm}^{-1}$  também está relacionada a formação de ligações cruzadas. Bandas de  $-\text{OH}$  também estão presentes na estrutura molecular do PVA (Lin *et al.*, 2015), dessa forma, nota-se o aumento da intensidade desta banda quando observado os géis de O-CMC e O-CMC/0,1% PVA, com o aumento da concentração de PVA mais ligações inter e intramoleculares são formadas e a redução da banda de  $-\text{OH}$  é observada proporcionalmente. O aparecimento de novas bandas correspondentes ao PVA não foi observado durante o espectro, como pode ser visto no recorte b).

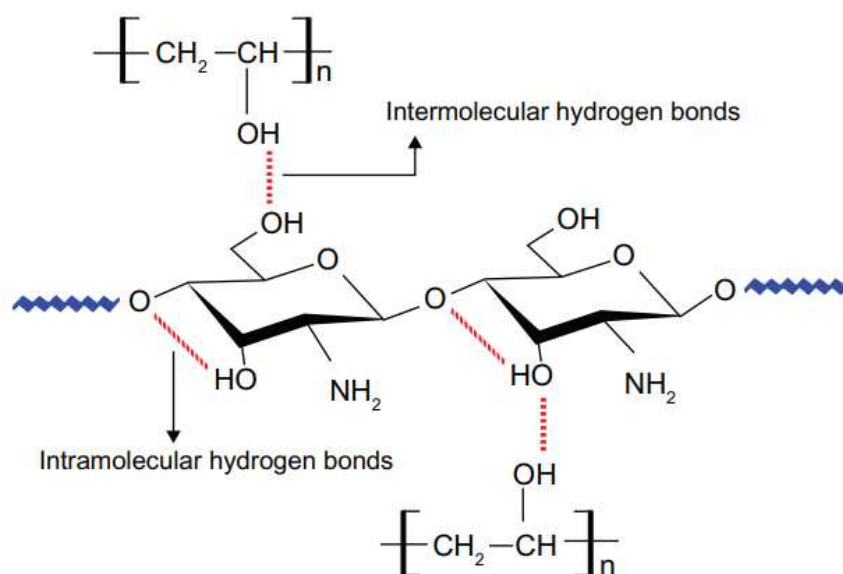


Figura 26 - Esquema das ligações intermoleculares e intramoleculares de hidrogênio entre o PVA e a quitosana (Alhosseini *et al.*, 2012).

Observando o recorte c) bandas de vibração de localizadas em  $3360\text{ cm}^{-1}$  ( $-OH$ ),  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $C=O$ ),  $1591\text{ cm}^{-1}$  ( $-NH_3^+$ ),  $1410\text{ cm}^{-1}$  ( $-CH_2CO-$  em éter),  $1378\text{ cm}^{-1}$  ( $-CH_3$ ),  $1324\text{ cm}^{-1}$  ( $C-O$ ),  $1080\text{ cm}^{-1}$  ( $C-O$ ) e  $1045\text{ cm}^{-1}$  ( $-C-O-$ ) sofreram pequenos deslocamentos ( $\sim 4$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ ) o que pode ser atribuído a formação das ligações intermoleculares assim como afirmado por Yin *et al.* (2007) os quais identificaram em seus estudos a reticulação da O-CMC com PVA em hidrogéis de O-CMC/PVA. Além disso, as demais bandas foram preservadas para todas as composições (Fei Liu *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2007; Anitha *et al.*, 2009; Signini *et al.*, 2019).

Os principais picos de PVA foram observados em  $1718$ ,  $1427$ ,  $1378$ ,  $1324$ ,  $1240$ ,  $1085$  e  $839\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas são atribuídas à vibração  $C=O$  em carbonila, vibração de flexão  $C-H$  de  $CH_2$ , deformação angular em  $-CH_3$ , estiramento de grupos acetila  $C-O$  grupos acetato e provenientes do monômero de acetato de polivinila), vibração de alongamento  $C-H$  e ligação  $C-C$  (Omkaram *et al.*, 2007; Kharazmi *et al.*, 2015). As bandas de  $1378$ ,  $1324$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$  são comuns entre a O-CMC e o PVA de tal modo que apresentaram aumento da intensidade para os géis de O-CMC/0,1% PVA sugerindo mais modos de vibração. Com o aumento da concentração de PVA estas bandas apresentaram redução de intensidade proporcional, sugerindo a formação de ligações intramoleculares reduzindo os sítios de vibração  $C-H$  em  $-CH_3$ ,  $C-O$  e alongamento  $C-H$ .

Quanto aos espectros correspondentes ao gel seco de O-CMQ e O-CMQ/PVA, os mesmos podem ser observados na Figura 27.

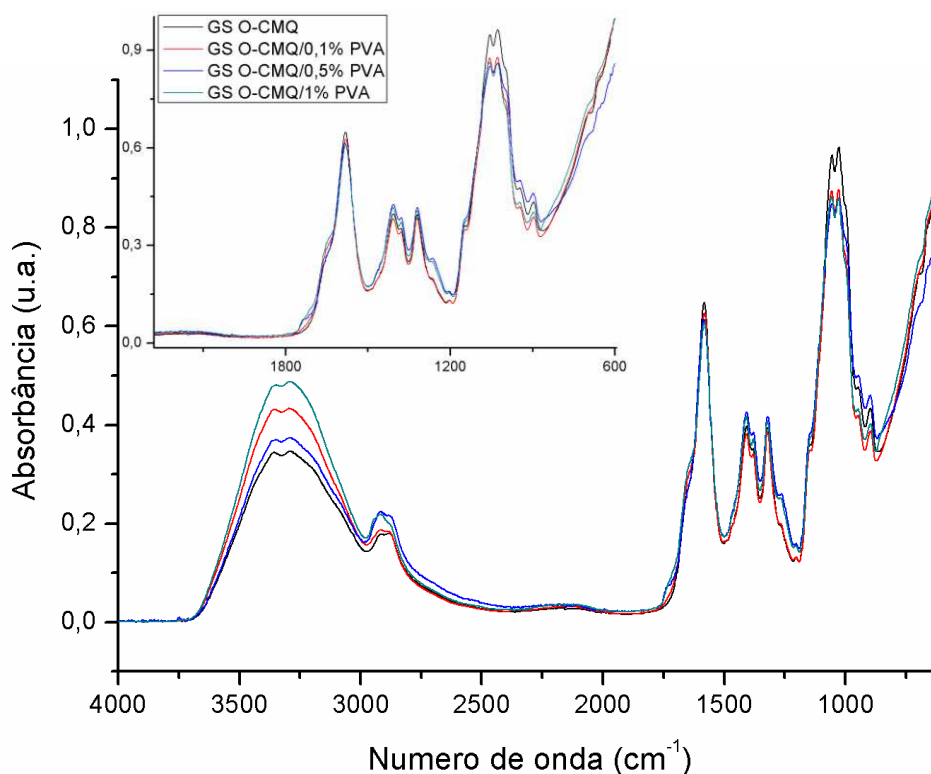


Figura 27 - Espectros de FTIR para as amostras de géis secos logo após serem secos em estufa a 37°C.

Para os resultados presentes na Figura 27, pode-se observar uma correlação entre os efeitos descritos para os géis úmidos, os quais em partes repetem-se nos espectros dos géis secos. As bandas presentes na faixa de 2000 – 800  $\text{cm}^{-1}$  sofreram redução de intensidades proporcionais ao aumento da concentração de PVA adicionado a composição do gel indicando que as ligações intramoleculares C–H em  $-\text{CH}_3$ , C–O e alongamento C–H anteriormente observadas nos géis úmidos continuam presentes nos géis secos.

Quanto a faixa espectral entre 400 – 2500  $\text{cm}^{-1}$ , após a secagem do gel ocorre o reaparecimento das bandas de vibração  $-\text{CH}$  (2983  $\text{cm}^{-1}$ ), o qual pode ser um indicativo que, com a saída da água em excesso (devido ao gel estar úmido) as ligações inter e intramoleculares de  $-\text{OH}$  são desfeitas. Esta afirmação se embasa na teoria que a energia de ligação C–OH é fraca, ainda mais quando estão presentes na cadeia efeitos de repulsão elétron-elétron responsáveis pelo aumento do comprimento da ligação e demais ligações presentes que contribuem para a distorção do ângulo da ligação (Atkins *et al.*, 2018). No entanto, as bandas de  $-\text{OH}$



correspondentes a estrutura do PVA ( $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ ) continuam presentes na estrutura do gel e aumentam de intensidade proporcionalmente com a concentração de PVA. Logo, propõe-se que as ligações de  $-\text{OH}$  presentes na composição do gel quando em presença de água ( $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ ) auxiliam na formação das ligações inter e intramoleculares de  $-\text{OH}$ . Este fenômeno pode ser comprovado pela capacidade do gel secar e umedecer por vários ciclos sem perder suas propriedades químicas, como observado nos espectros da Figura 28 para o gel seco e úmido O-CMQ/PVA 1% após 5 ciclos de umedecimento e secagem.

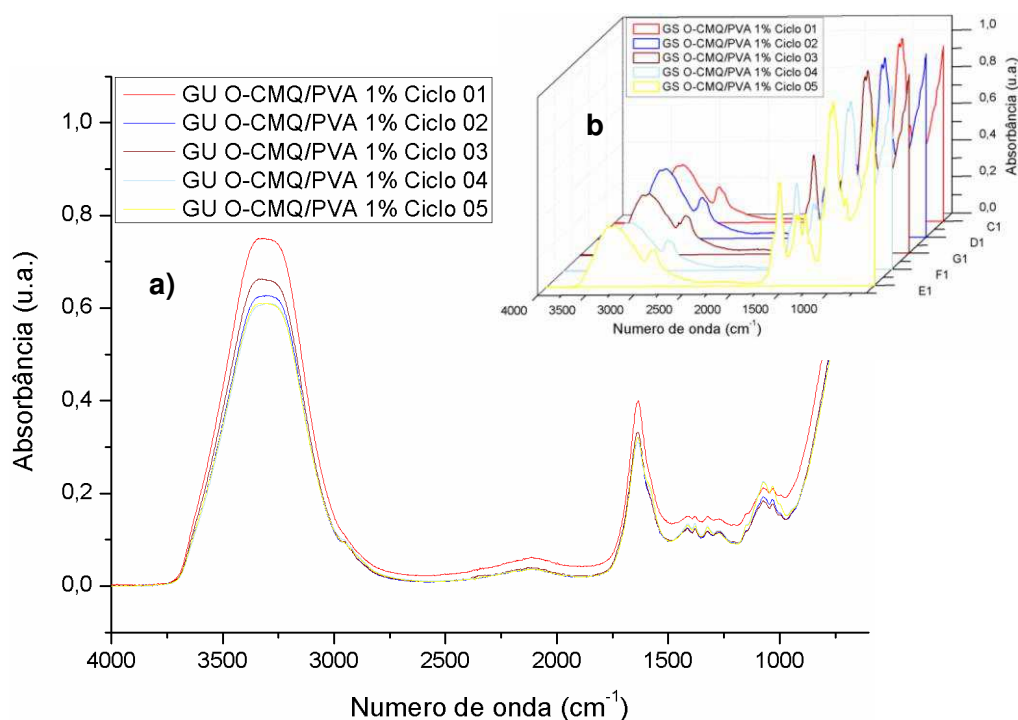


Figura 28 - Espectro FTIR para a amostra O-CMQ/PVA 1% correspondente ao a) gel umedecido durante 05 ciclos e b) gel seco durante 05 ciclos.

Neste sentido, conforme os resultados expostos na Figura 28, é constatado a preservação da estrutura química do gel após os ciclos de secagem, fato este evidenciado pela *fingerprint* (impressão digital) dos géis, não sendo observado deslocamentos, surgimento e/ou desaparecimento de bandas nos espectros tanto para o gel úmido (Figura 28 a)) quanto para o gel seco (Figura 28 b)).

#### 4.3.4 Estudo da degradação por espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis além de ser empregada na avaliação de AgNPs também possui uma vasta gama de aplicações nos estudos de moléculas, compostos orgânicos e inorgânicos e materiais em geral, que sejam formados por substâncias químicas dotadas de grupos cromóforos (Galo e Colombo, 2009). Embasado nesta afirmação e na teoria de Lambert-Bee, a qual correlaciona a intensidade de bandas de absorção com a concentração das substâncias, foram realizados estudos de degradação associando o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) presente nos espectros UV-Vis à sua intensidade ( $I_0$ ), nos espectros registrados em diferentes tempos de incubação dos géis. Para tanto, para condução dos estudos da degradação, inicialmente foram coletados os espectros UV-Vis dos géis O-CMQ/PVA 0.1, 0.5 e 1% de modo a investigar a presença de bandas de absorção correspondentes a O-CMQ. Na Figura 26 estão presentes os espectros correspondentes aos géis O-CMQ/PVA.

De acordo com os espectros presentes na Figura 29 pôde-se observar uma banda de absorção localizada no comprimento de onda de 209 nm, a qual é característica da quitosana e carboximetilquitosana (Tan *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2010; Borsagli *et al.*, 2015). Logo, esta banda foi selecionada para os estudos de degradação, visto que esteve presente em todos os tempos de degradação e amostras estudadas. A Figura 29 ilustra as curvas de degradação para os géis de O-CMQ/PVA.

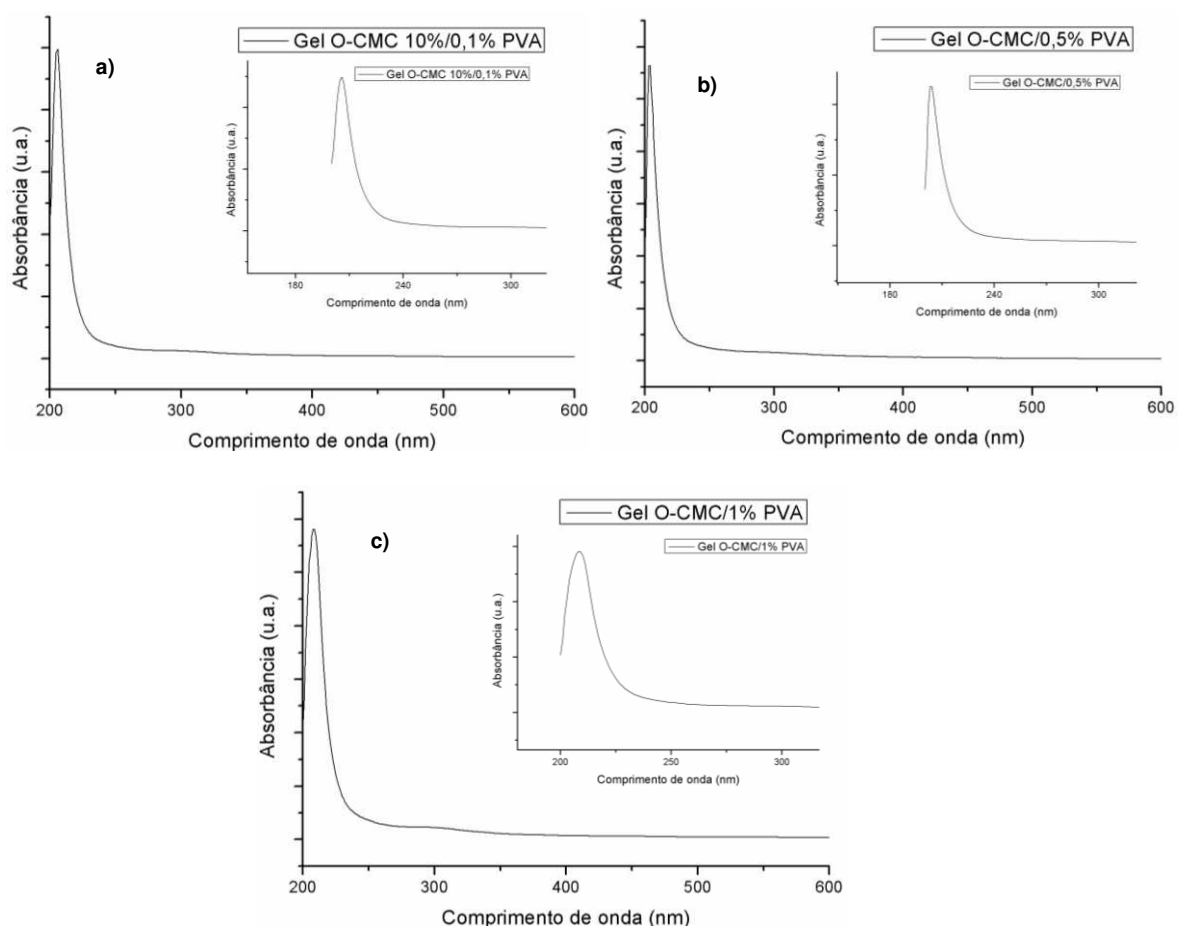


Figura 29 - Espectro UV-Vis para os géis O-CMQ/PVA a) 0.1%, b) 0.5% e c)1%.

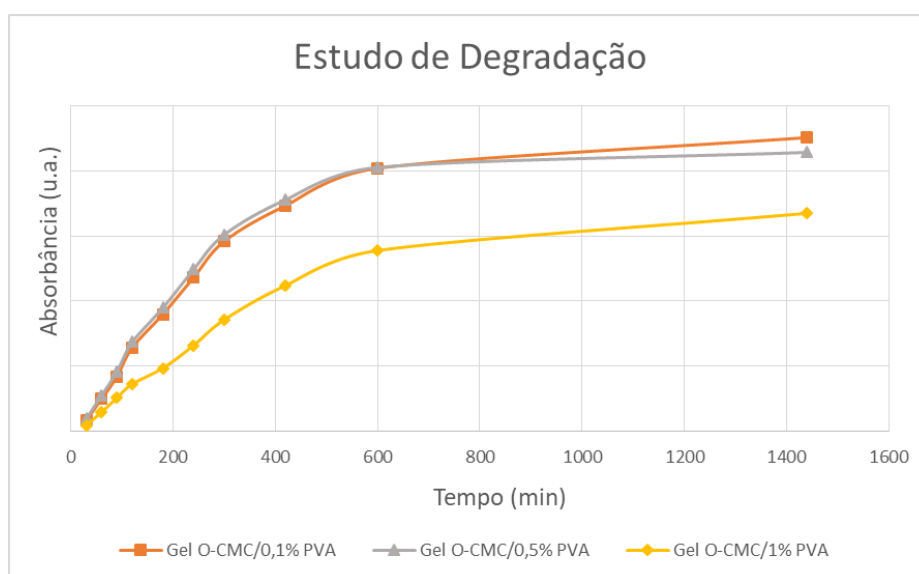


Figura 30 - Curvas de absorbância em função do tempo para os géis de O-CMC com 0.1, 0.5 e 1% de PVA.

De acordo com os resultados da Figura 30 observa-se que, os géis O-CMQ/PVA 0.1 e 0.5% apresentaram uma degradação similar na maior parte do intervalo de tempo avaliado (0 a 600 minutos), apresentando uma sutil diferença para o tempo de 1440 minutos, para o qual a composição O-CMQ/PVA 0.5% apresentou uma menor degradação, entretanto, os dois géis apresentavam-se quase totalmente degradados (solubilizados) após a remoção da última alíquota. Já o gel O-CMQ/PVA 1% apresentou degradação bem inferior as demais composições, motivo este justificado pela atuação do PVA na formação de ligações cruzadas e redução da porosidade do gel, auxiliando na redução da degradação do gel, assim como observado por (Samal *et al.*, 2009; Gholamali *et al.*, 2019) e nos resultados de FTIR anteriormente discutidos..

Na pesquisa de Sabaa *et al.* (2015) foram desenvolvidos nanocompósitos de PVA/CMQ/Montmorilonita (MMT) empregando o diisotiocianato de tereftaloila como agente reticulante. Em seus estudos de degradação foi utilizada uma solução de SBF (pH = 7,40) e as amostras foram encubadas a 37°C por um total de 28 dias. De acordo com seus resultados a perda de peso dos nanocompósitos CMQ/PVA (1:1) e (2:1) aumentou em função do tempo de incubação na solução de SBF. Estando está relacionada ao aumento do teor de CMC nos nanocompósitos, pois o próprio CMQ é um polímero biodegradável. Ademais, nanocompósitos CMQ/PVA (1:1) e (2:1) alcançaram um tempo de degradação de 28 dias apresentando perdas de massa menores quando em comparação com os nanocompósitos formulados apenas de CMQ, CMQ reticulado e CMQ/PVA/MMT para todas as suas composições.

Jaikumar *et al.* (2015) em suas pesquisas prepararam hidrogéis injetáveis em duas formulações, uma a base de alginato/O-CMQ (AOF) e a outra a base de Alginato/PVA (APF), carregados com nanopartículas de fibrina e reticulados por cloreto de cálcio, destinados a reconstrução de tecidos. Para as análises de degradação os hidrogéis foram deixados em PBS a 37°C, onde, a cada 2 dias as amostras eram removidas, lavadas com água deionizada de modo a limpar os íons presentes na superfície do hidrogel. Nos resultados foi registrado um tempo de degradação de 3 dias para a composição APF e 15 dias para a composição AOF, o qual apresentou pesos constantes entre o período de 1 a 15 dias e perda de peso observada até o 23º dia. De acordo com os autores, o menor e maior tempo de

degradação apresentado pelo APF e AOF se justificou pelas composições terem apresentado uma menor e maior reticulação, respectivamente.

Logo, observando os tempos de degradação apresentados pelos géis O-CMQ/PVA em comparação aos trabalhos descritos na literatura são observados tempos de degradação inferiores. Esse fato se explica pela ausência de um agente reticulante forte na composição dos géis, favorecendo a uma degradação mais acelerada para os mesmos. Entretanto, mesmo com tempos de degradação mais rápidos os géis O-CMQ/PVA apresentam características físicas importantes para uso como curativo, tais como rápida degradação (~24 horas) e perda de umidade (proporcionando um ambiente umedecido para a lesão), capacidade de reabsorção de líquido após perda de umidade e resistência frente a diversos ciclos de desidratação. Além disso, a O-CMQ e o PVA aqui utilizados são biodegradáveis e de rápida degradação no estado de gel (Janvikul *et al.*, 2007; Kamarul *et al.*, 2014; Jaikumar *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Dessa forma, considerando os resultados, a composição O-CMQ/PVA 1% foi selecionada para dar continuidade ao estudo de incorporação das AgNPs por ter apresentado um maior tempo de degradação frente as demais composições. No entanto, vale salientar que essa escolha foi feita buscando reduzir a quantidade amostral a ser avaliada nas demais caracterizações, não inviabilizando o potencial emprego das demais composições.

#### **4.3.5 Correlação entre a perda de umidade e degradação dos géis O-CMQ/PVA segundo a ótica de aplicação como curativo**

Partindo da aplicação dos géis como biomateriais direcionados ao tratamento de queimaduras, conseguir observar e correlacionar os resultados expressos pela perda de umidade e degradação torna-se uma condição essencial para definir as propriedades de interesse tais como: manutenção do meio úmido e a quantidade de ciclos de substituição frente a necessidade de troca dos curativos. De acordo com os protocolos de tratamento de lesões, em geral, os curativos são dados como uma forma de tratamento de feridas cutâneas, os quais são empregados de acordo com a evolução das fases de cicatrização (Franco e Gonçalves, 2008). Atualmente, existem diversas opções de curativos no mercado, os quais são selecionados de acordo com

a profundidade da queimadura, quantidade de exsudato, localização, extensão e causa da queimadura, impacto funcional na mobilidade, custo, conforto e dor do paciente (Kavanagh *et al.*, 2004; Franco e Gonçalves, 2008).

Diante dos resultados expostos pelo ensaio de perda de umidade (PU), géis de O-CMQ/PVA apresentam uma rápida PU, reportando perdas de 50% na primeira hora de simulação e perdas superiores a 95% após 8 horas. Tal característica se apresenta como um fator positivo no tratamento de lesões visto que auxilia na manutenção do meio úmido, promovendo a prevenção da desidratação do tecido a qual leva à morte celular, acelera a angiogênese, estimula a epitelização e a formação do tecido de granulação, facilita a remoção de tecido necrótico e fibrina, serve como barreira protetora contra microorganismos, promover a diminuição da dor, evita a perda excessiva de líquidos e previne traumas na troca do curativo (Morgan, 1994; George Broughton *et al.*, 2006). Outro fator positivo frente a rápida desidratação dos géis O-CMQ/PVA é a absorção do exsudato presente, sendo este mais um fator a contribuir no controle da umidade da lesão.

Na literatura é descrito que curativos de géis e/ou hidrogéis atuam na redução da dor gerando sensação de refrescância (devido a sua umidade) e indicados para o tratamento de queimaduras de espessura parcial com exsudação moderada ou abundante (Stuchi *et al.*, 2010; De Souza Tavares e Da Silva, 2015). Conforme resultados obtidos nos ensaios de degradação os géis O-CMQ/PVA 0.1 e 0.5% apresentaram degradação de 1 dia, enquanto o gel O-CMQ/PVA 1% mostrou-se parcialmente degradado para o mesmo intervalo de tempo. Logo, os tempos de degradação indicam ciclos de substituição de aproximadamente 1 dia, estando dentro do tempo indicado para curativos do tipo hidrogel (Franco e Gonçalves, 2008). Adicionalmente, o fato do gel degradar-se possibilita uma maior facilidade na troca do curativo, fator este que colabora para redução da dor causada no paciente durante a substituição do mesmo.

Logo, considerando as características dos géis O-CMQ/PVA em comparação aos protocolos e tipos de curativos empregados no tratamento de queimaduras e lesões cutâneas as três composições dos géis O-CMQ/PVA demonstram-se adequadas quanto as suas propriedades físicas.

## 4.4 Caracterização do Gel O-CMQ/PVA/AgNPs

### 4.4.1 Teste de Espalhabilidade

O estudo das propriedades reológicas tem como principal objetivo avaliar a deformação e o escoamento dos materiais, ou seja, a resposta do material frente a aplicação de uma tensão ou deformação (Corrêa et al., 2005). As propriedades avaliadas nos estudos reológicos foram a viscosidade e os módulos de armazenamento. Tratando sobre a viscosidade, a mesma pode ser definida como a medida de fricção interna de um fluido, isto é, a resistência encontrada pelas moléculas ao se moverem no interior de um líquido, devido ao movimento browniano e as forças intermoleculares presentes (Rodrigues, 2014). Por sua vez, o módulo de armazenamento ( $G'$ ) é a medida da energia armazenada e recuperada por ciclo enquanto o módulo de perda ( $G''$ ) é a medida da energia dissipada ou perdida com aquecimento por ciclo de deformação imposta. Através do  $G'$  e  $G''$  pode-se determinar o ângulo de fase (ou ângulo de perda mecânica)  $\delta$  e a tangente de perda  $\tan \delta$ , que é a razão entre as componentes viscosas e elásticas (Li, H. et al., 2016).

Existem materiais que não podem ser diferenciados em sólidos ou líquidos com clareza, de tal modo que a propriedade reológica de interesse nesses casos é a viscoelasticidade. Assim, o estudo do comportamento viscoelástico requer a aplicação de uma força sobre o material em estudo e a medição de sua deformação, onde, neste modelo de análises, uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a resistência à deformação é medida (Akhtar *et al.*, 2016). A Figura 31 mostra a evolução da deformação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda " $G''$ ") bem como a viscosidade complexa das amostras de gel O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs.

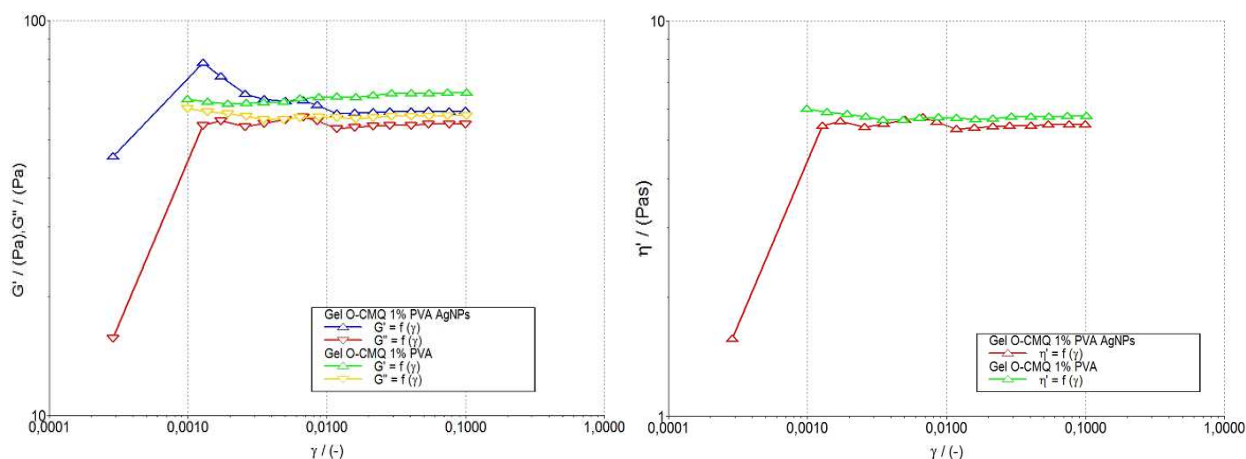


Figura 31 - Evolução da deformação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda " $G''$ ") para as amostras a) O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs 50%. b) Curva de viscoelasticidade dinâmica complexa em função da deformação para as amostras O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs 50%.

Observando a variação dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) associada à deformação, pode-se obter informações sobre o caráter viscoelástico do sistema. Logo, géis onde  $G' > G''$  são caracterizados como géis elásticos, enquanto géis nos quais  $G' < G''$  são caracterizados como géis viscosos. Outro fato é que, quanto maior o valor de  $G'$ , maior é o caráter sólido do gel, logo, as deformações são recuperáveis (Rodrigues, 2014). Nos resultados da Figura 31 a) observa-se um caráter elástico para as duas formulações durante toda varredura de deformação ( $G' > G''$ ), não ocorrendo quebra da estrutura do gel, evitando que o gel flua após sua aplicação. Adicionalmente, com a introdução das AgNPs no sistema é observado um aumento inicial do  $G'$  e  $G''$  seguido de uma leve redução e estabilização, indicando aumento da rigidez e elasticidade do gel inicial e posterior estabilidade com  $G'$  mantendo-se superior ao  $G''$ . Resultados semelhantes foram encontrados por Li, Y. *et al.* (2015) no estudo dos módulos de armazenamento e perda para diferentes concentrações de hidrogéis de O-CMQ (2.5, 5.0, 7.5 e 10% (m/m)) os quais apresentaram aumento crescente dos módulos  $G'$  e  $G''$  proporcional ao aumento da concentração de O-CMQ, alcançando um limite máximo de armazenamento ( $G'_{max}$ ) na concentração de 7.5%. Também foi observado um  $G' > G''$  para todas as concentrações estudadas. Hernández *et al.* (2009) obtiveram géis de quitosana incorporados com nanopartículas de óxido de ferro e reportaram um aumento do módulo de armazenamento ( $G'$ ) proporcional ao aumento da concentração de quitosana, atribuindo este fenômeno a maior quantidade de cadeias poliméricas



responsáveis pela formação de mais emaranhados entre as mesmas. Além disso, também constataram uma elevação dos valores de  $G'$  e  $G''$  frente ao aumento gradual das concentrações de nanopartículas. Novikov *et al.* (2018) sintetizaram géis de quitosana/AgNPs em solução de ácido carbônico com propriedades típicas de um gel elástico. Em seus estudos reológicos géis de quitosana/AgNPs apresentam  $G'$  cinco vezes maior que o  $G''$  e um aumento nos valores dos módulos à medida que a razão molar quitosana:AgNO<sub>3</sub> aumentou, propondo que o aumento da quantidade de ions Ag<sup>+</sup> proporcionava o aumento do grau de reticulação do polímero e, conseqüentemente, aumento do seu caráter sólido.

Quanto aos resultados referentes à viscoelasticidade dinâmica (Figura 28 c)), observa-se que as duas formulações apresentaram um comportamento de fluido newtoniano (viscosidade constante quando se varia a deformação), apresentando viscosidade constante durante a varredura de cisalhamento (Costa *et al.*, 2017). Ademais, a adição das AgNPs não proporcionou um aumento da viscosidade, resultado este diferente do observado na literatura (Sámano-Valencia *et al.*, 2014). Jaikumar *et al.* (2015) prepararam hidrogéis de Alginato/O-CMQ/Fibrina injetáveis os quais preservaram sua natureza viscoelástica mesmo após submetidos à deformação. Nas pesquisas de (Pérez-Díaz *et al.*, 2016) foi constatado que houve um aumento da viscosidade dos géis de quitosana proporcional a concentração de AgNPs incorporadas. Analogamente, Sámano-Valencia *et al.* (2014) obtiveram maiores valores de viscosidade para géis de quitosana quando incorporadas nanopartículas de ouro 0,1% e prata 0,02%, assim como Nascimento *et al.* (2009) que também reportou um aumento na viscosidade de géis de quitosana quando a este foi adicionada sulfadiazina de prata.

Assim, comparando os resultados para os géis O-CMQ/PVA 1% e O-CMQ/PVA 1%/AgNPs 5% tem-se que a adição das AgNPs não interferiu de maneira negativa as propriedades reológicas do gel, os quais mantiveram seu caráter viscoelástico, sólido e rígido ( $G' > G''$ ) e comportamento newtoniano, propriedades estas importantes para aplicação do gel no tratamento de queimaduras indicando um não escoamento do gel após sua aplicação (Sámano-Valencia *et al.*, 2014).

#### 4.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Após sofrer uma lesão por queimadura ocorre uma série de alterações orgânicas no corpo humano, as quais modificam seu mecanismo de defesa contra infecções. Inicialmente, de acordo com o agente e intensidade da lesão a microbiota da pele é removida, deixando de exercer sua função protetora, perdurando por até 48 horas após a lesão (Ragonha *et al.*, 2005). Nesse sentido, surge uma oportunidade para ocorrência de infecções geralmente ocasionadas por *Candida albicans* e *Aspergillus* entre os fungos e *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter ssp*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp* dentre as bactérias, destacando-se a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* que são as mais comumente encontradas em feridas e causam infecções na corrente sanguínea, na pele e em outros tecidos moles (Pruitt Jr *et al.*, 1983; Bowler *et al.*, 2001; Brogden *et al.*, 2005; Gutha *et al.*, 2017).

Concomitantemente, a falta de higienização das mãos, execução incorreta da troca de curativos, uso incorreto de luvas, infecções cruzadas por artigos e/ou equipamentos médico-hospitalares bem como esterilização incorreta de suas superfícies e o tempo de hospitalização têm sido apontados na literatura como fatores de risco para infecção (Rourke *et al.*, 2001; Mehmood *et al.*, 2014; Ogba *et al.*, 2016). Dessa forma, as amostras de géis O-CMQ/PVA, O-CMQ/PVA/AgNPs 5 e AgNPs foram avaliadas frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Os resultados estão presentes nas Figuras 32 e 33, respectivamente. Vancomicina foi empregado como controle positivo e soro fisiológico como controle

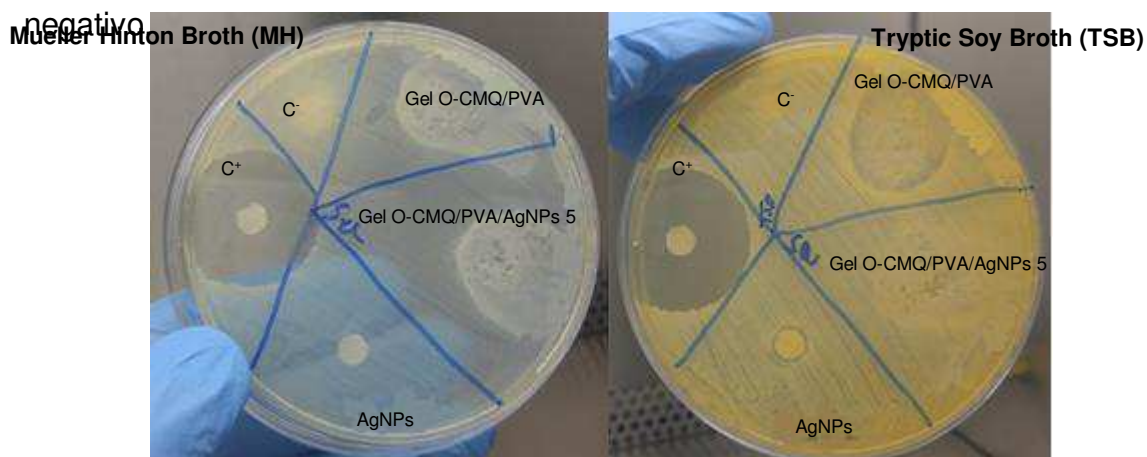


Figura 32 - Imagens do teste de Atividade antimicrobiana das nanopartículas e do Gel frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para os meios Mueller Hinton Broth (MH) e Tryptic Soy Broth (TSB) respectivamente.

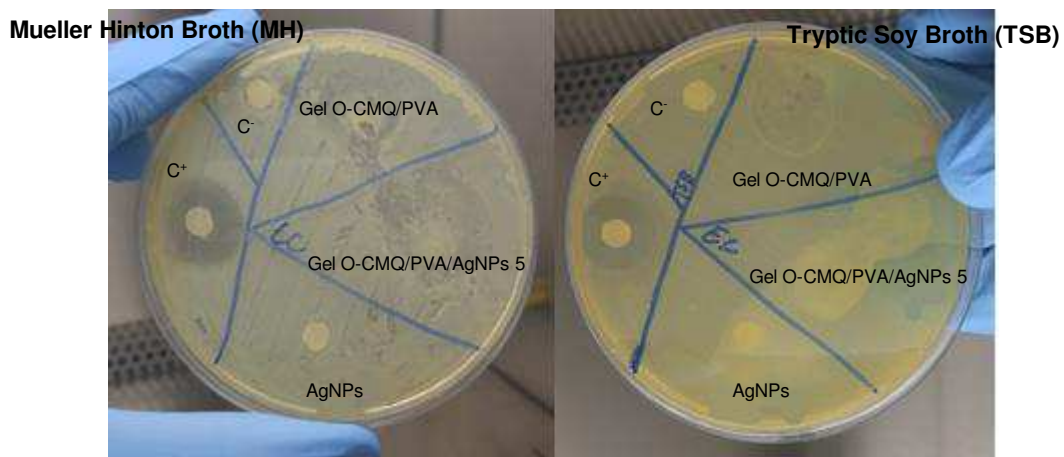


Figura 33 - Imagens do teste de Atividade antimicrobiana das nanopartículas e do Gel frente à cepa de *E. coli* ATCC 25922 para os meios Mueller Hinton Broth (MH) e Tryptic Soy Broth (TSB) respectivamente.

O antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bactericida *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, a qual analisa o padrão de crescimento das bactérias ao redor de discos ou das amostras em seu estado natural. Nos resultados avalia-se o padrão de inibição dos microrganismos ao redor de cada disco ou amostra por meio da medição do tamanho de cada halo. Assim, as amostras são classificadas em: inativas - halos de inibição de crescimento abaixo de 10 mm; ativas - halos entre 10 e 15 mm; e muito ativas - valores acima de 15 mm (Galiano e Spezzotti, 2015). De acordo com os resultados presentes nas Figuras 32 e 33 observa-se que nenhuma das amostras apresentaram abertura de halo para as cepas de *S. aureus* e *E. coli* cultivadas nos meios MH e TSB, sendo assim classificadas como inativas.

É sabido que a quitosana possui uma atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos e leveduras (Prashanth e Tharanathan, 2007; Kanatt *et al.*, 2013; Lekjing, 2016; Yuan *et al.*, 2016). Essa atividade se deve ao seu mecanismo de ação sobre as bactérias no qual a quitosana interage com a membrana das bactérias alterando a permeabilidade celular devido a interação dos grupos  $-NH_3^+$  com membranas celulares carregadas negativamente que, conseqüentemente causa o aumento da permeabilidade e lise da membrana (Severino *et al.*, 2014; Li, Z. *et al.*, 2015; Hosseinejad e Jafari, 2016).

Além da interação da quitosana com a membrana celular sua atividade antimicrobiana se apresenta também por meio de outros mecanismos, tais como: a interação dos produtos de hidrólise difusa com o DNA microbiano leva à inibição da síntese de mRNA e proteínas (Yuan *et al.*, 2016); inibição do crescimento microbiano pela quelação de nutrientes e metais essenciais (Chien *et al.*, 2016); formação de membrana polimérica que impede a entrada de nutrientes na célula ou atua como uma barreira ao oxigênio que pode inibir o crescimento de bactérias aeróbicas (El-Tahlawy *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2016).

Entretanto, a ação bactericida da quitosana via interação dos grupos  $-NH_3^+$  com a membrana celular se demonstra como a mais efetiva, de tal modo que, a neutralização dos grupos  $-NH_3^+$  pelos grupos  $-COO$  presentes no radical  $-CH_2COOH$  da O-CMQ proporciona perda em sua atividade bactericida (Hosseinnejad e Jafari, 2016), assim como observado nos estudos de Demarchi *et al.* (2018) os quais prepararam nanocompósitos a base de O-CMQ e nanopartículas de Ag,  $Fe_2O_3$  e suas atividades antimicrobianas foram estudadas e constataram em seus resultados que o nanocompósito O-CMQ/ $\gamma$ - $Fe_2O_3$  não apresentou atividade antibacteriana nem antifúngica contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Resultados similares também foram observados por Wahid *et al.* (2016) os quais preparam hidrogéis de O-CMQ reticulados com epícloridrina ausente de atividade bactericida frente cepas de *S. Aureus* e *S. Colli*.

Tratando agora sobre outro componente aplicado na confecção dos géis, o PVA, observa-se alguns trabalhos na literatura que abordam sobre sua possível atividade bactericida. El-Mohdy e Ghanem (2009) prepararam hidrogéis a base de PVA/PVP fazendo uso de radiação  $\gamma$  e avaliaram dentre outras técnicas sua atividade bactericida frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium italicum*, *Syncephalastrum racemosum* e *Candida albicans*. Em seus resultados composições envolvendo hidrogéis de PVA e PVP puro não apresentaram atividade frente nenhuma das cepas. Hidrogéis 90/10, 80/20, 70/30 60/40 e 50/50 (PVA/PVP) inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

Wang *et al.* (2020) confeccionaram filmes a base de PVA/Nanocelulose bacteriana (BNC) e AgNPs voltados a aplicação como embalagens de alimentos. Em seus resultados microbiológicos os filmes de PVA/BNC não inibiu o crescimento de

cepas de *E. Colli* O157:H7 (sorotipo da espécie bacteriana *Escherichia coli* produtora de toxinas Shiga e uma das causas de doenças de origem alimentar), indicando ausência de atividade bactericida. Resultados semelhantes foram observados por Da Cruz *et al.* (2020) os quais prepararam filmes de PVA/derivado de polímero de tanino catiônico (TN) voltados para aplicações biomédicas no campo da engenharia de tecidos. Na avaliação da atividade bactericida, o filme de PVA/TN0 (50% PVA/ 0% de TN (m/m)) foi empregado como controle negativo visto que, segundo o autor, não possui atividade bactericida, informação esta também afirmada por Rinehart *et al.* (2016) e por Montaser (2016). Como resultados, o filme PVA5/TN0 não apresentou resistência ao crescimento das cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, de modo que, apenas o filme PVA10/TN10 apresentou halos de inibição de 19 mm contra *S. Aureus* e 16 mm contra *P. aeruginosa*.

Abordando sobre as AgNPs e sua atividade, diversos trabalhos científicos reportam que a prata ( $\text{Ag}^+$ ) apresenta efeitos inibitórios frente a bactérias e diversos outros microrganismos (Krzyżewska *et al.*, 2016). Quando aplicada em escala nanométrica estudos relatam que AgNPs estáveis apresentaram concentrações inibitórias mínimas (MIC) bem menores que a prata iônica  $\text{Ag}^+$  em solução (Alarcon *et al.*, 2012). No entanto, quando em escala nanométrica fatores como: estabilidade, dispersão, tamanho, carga superficial, agentes estabilizantes e formação de agregados influenciam a atividade bactericida das AgNPs (Franci *et al.*, 2015). Portanto, a menos que essas condições sejam atendidas a ação bactericida das AgNPs pode ser realmente avaliada.

Dessa forma, Tanvir *et al.* (2017) prepararam AgNPs em duas diferentes morfologias (esferas e prismas) e estabilizadas por citrato de sódio, PVP e Poli-L-arginina de modo a estudar a atividade bactericida das AgNPs aplicando o método de microdiluição frente a cepas de *E. Coli*, *S. Enterica* e *P. Aeruginosa*. Como resultados, AgNPs estabilizados com citrato não mostraram efeito inibitório contra todas as bactérias testadas na faixa de concentração de 0 a 11 mg/L em ambas as formas (esfera e prisma), que, de acordo com os autores se explica pela agregação imediata de AgNPs estabilizadas com citrato quando em contato com o meio biológico, o que foi confirmado por espectrofotometria pela perda de absorbância no presente trabalho e também por (Choi *et al.*, 2005). Em contrapartida AgNPs-PVP no formato de prismas, com 20 nm de diâmetro e carga de -29 mV (estáveis),

apresentaram MIC 1,35 mg/L frente a cepas de E. Coli, S. Enterica e P.Aeruginosa. Propriedades similares as AgNPs-PVP foram aqui obtidas.

Raffi *et al.* (2008) prepararam AgNPs esféricas com tamanho de 16 nm e observaram que na concentração de 60 mg/L não houve crescimento bacteriano frente a cepas de E. Coli. Van Dong *et al.* (2012) preparam AgNPs-PVP variando entre 25 a 400 nm (prismas) as quais apresentaram halos de inibição frente E. Coli 0,8 cm para a concentração de 6 mg/L. Rojas-Andrade *et al.* (2015) obtiveram AgNPs com morfologia de prisma e tamanho médio de 30 nm, os quais apresentaram inibição no crescimento de E. Coli com MIC de 49 mg/L frente a cepas de E. Coli.

Nesse trabalho AgNPs recobertas por citrato de sódio e PVP foram avaliadas frente a cepas de E. Coli e S. Aureus, as quais, em nenhum dos dois testes apresentaram atividade bactericida. Considerando que, estudos de estabilidade foram conduzidos para averiguar a estabilidade das AgNPs-PVP as quais não sofreram alterações aparentes após adição do meio de cultura TSB é proposto que a ausência de atividade das AgNPs aqui preparadas pode estar relacionada a sua concentração e também, por este mesmo motivo o gel O-CMQ/PVA/AgNPs 5 não apresentou atividade bactericida frente as cepas estudadas.

#### **4.4.3 Ensaio de citotoxicidade in vitro - Método de difusão em ágar**

Com a crescente demanda voltada ao desenvolvimento dos testes de citotoxicidade “in vitro” e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como “Food and Drug Administration”, em 1993 e “Organization for Economic Cooperation and Development”, em 1987 vários métodos “in vitro” que utilizam culturas celulares foram padronizados para avaliação da toxicidade de biomateriais, tais como: método de difusão em ágar (Cruz *et al.*, 1987; Zarzecka *et al.*, 2018), método de extração (Vasington *et al.*, 1967; Puškar *et al.*, 2019), método de inibição metabólica (Frígols *et al.*, 2019), além dos métodos enzimáticos (Cruz *et al.*, 1998; Oguz *et al.*, 2019).

O método de difusão em ágar avalia os efeitos produzidos pela amostra através da camada de ágar, que protege as células de tecido conjuntivo de rato (fibroblastos de linhagem celular L929) do dano mecânico durante a colocação da amostra e permite a difusão de substâncias químicas que migram das amostras de polímeros (Li, W. *et al.*, 2015). Este método a partir da 22ª Revisão da Farmacopéia

Americana foi introduzido como teste de reatividade biológica, o qual aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros, empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano.

Dessa forma, realizou-se o ensaio de citotoxicidade in vitro - método de difusão em ágar (Procedimento Operacional Padronizado/ Manual da Qualidade) de acordo com as normas ISO 10993-5:2009 “Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity” realizando algumas adaptações. De modo a manter as dimensões das amostras do gel fixas durante o ensaio foi preparado um molde de ácido polilático (PLA) atendendo as dimensões de 100 mm<sup>2</sup>, tal como disposto na ISO 10993-5:2009. A toxicidade do molde também foi avaliada. Os valores médios em centímetro obtidos para cada amostra e controles, com os limites especificados para os diferentes graus de citotoxicidade estão presentes na Tabela 08:

Tabela 8 - Distribuição das amostras/ Leitura das placas.

DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NA PLACA								
LEITURA DAS PLACAS - AMOSTRAS								
	Orifício/Q*	1°Q (mm)	2Q (mm)	3Q (mm)	4Q (mm)	M**(cm)	MG*** (cm):	Resultado
Gel OCMQ/PVA	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório
	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
Gel OCMQ/PVA/AgNPs 1%	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
Gel OCMQ/PVA/AgNPs 3%	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório
	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
Gel OCMQ/PVA/AgNPs 5%	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório

	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
<b>AgNPs</b>	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
<b>Molde PLA</b>	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
<b>LEITURA DAS PLACAS - CONTROLES</b>								
	<b>Orifício/Q*</b>	<b>1Q (mm)</b>	<b>2Q (mm)</b>	<b>3Q (mm)</b>	<b>4Q (mm)</b>	<b>M**(cm)</b>	<b>MG*** (cm):</b>	<b>Resultado</b>
<b>Controle Positivo</b>	1	12	11	12	11	1,15	1,0875	<input type="checkbox"/> Satisfatório <input checked="" type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	4	11	10	09	11	1,025		<input type="checkbox"/> Repetir
<b>Controle Negativo</b>	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<input checked="" type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		<input type="checkbox"/> Repetir
<b>Branco</b>	3							<input type="checkbox"/> Satisfatório <input type="checkbox"/> Insatisfatório <input type="checkbox"/> Repetir
	6							<input type="checkbox"/> Repetir

De acordo com a ISO 10993-5:2009 a validade do ensaio é feita a partir das respostas das células ao tratamento pelo controle negativo, pelo controle positivo e branco. Para tanto, é medido macroscopicamente a extensão da área descolorada (células mortas) do controle positivo a partir das extremidades nos 4 diferentes quadrantes com o auxílio de um paquímetro, calculando posteriormente o valor médio em centímetros dos 4 diferentes quadrantes. Assim, de acordo com os dados presentes na tabela 08 o controle negativo mostrou ausência de reação citotóxica (grau 0), já o controle positivo mostrou uma nítida reação citotóxica severa (grau 4). O controle branco mostrou ausência de reação citotóxica. Não foram constatados halos para nenhuma das amostras.



A partir da constatação da ausência de halos nas amostras, buscou-se uma forma de ampliar a visualização macroscópica das amostras. Para tanto, os poços foram fotografados microscopicamente com o microscópio invertido digital NIKON TS100 de modo a identificar melhor os limites das áreas em questão. A Figura 34 retrata as imagens capturadas através do microscópio invertido feitas para uma região de cada poço das amostras de géis O-CMQ/1% PVA, O-CMQPVA/AgNPs 1, 3 e 5%, AgNPs puras e molde de PLA no aumento de 100 vezes.

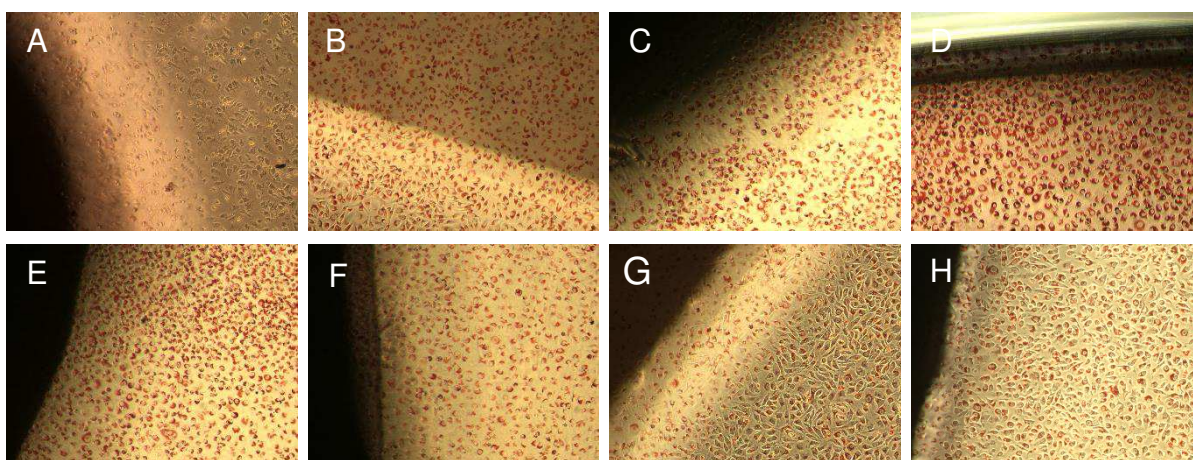


Figura 34 - Imagens com 100 vezes de aumento da linhagem celular L929 das zonas de descoloração de materiais experimentais no teste de difusão em ágar: controle positivo (látex tóxico) (A), controle negativo (PEAD) (B), Gel OCMQ/PVA (C), Gel OCMQ/PVA/AgNPs 1%(D), Gel OCMQ/PVA/ AgNPs 3% (E), Gel OCMQ/PVA/ AgNPs 5% (F), AgNPs (G), molde PLA (H).

Através do microscópio invertido podemos ver uma região escura a qual refere-se à amostra e pontos vermelhos os quais correspondem as células coradas. Dessa forma, é observada ausência de descoloramento ao redor e sob todas as amostras, assim como pode ser visto quando comparadas as imagens B a E com o controle positivo, evidenciando ausência de citotoxicidade (Grau 0), fato este que indica que o molde de PLA juntamente com os constituintes dos géis (O-CMQ, PVA e AgNPs) nas concentrações empregadas assim como os géis não são tóxicos, visto que as amostras foram estudadas na forma de gel, assim como serão aplicadas, mimetizando uma condição real de uso e exposição as células. Logo, de acordo com a Organization (2009) a citotoxicidade das amostras demonstrou-se satisfatória.

Já é consolidado de acordo com a literatura que, a quitosana e seus derivados, especialmente a O-CMQ apresentam baixa toxicidade contra células

humanas (Je *et al.*, 2006; Jimtaisong e Saewan, 2014). Snima *et al.* (2012) prepararam nanopartículas de O-CMQ carregadas com metformina objetivando avaliar sua toxicidade frente a células L929 e células de câncer pancreáticas MiaPaCa-2 pelo método de MTT. Em seus resultados, células L929 não foram afetadas pela toxicidade de metformina nem das nanopartículas de O-CMQ carregadas com metformina (O-CMQ-metformina). Ao mesmo tempo, nas células MiaPaCa-2, os NPs de metformina e O-CMQ-metformina induziram mais toxicidade do que os NPs O-CMQ. Além disso, a maior concentração (3,7 mM) de NP de metformina e O-CMQ-metformina usada no estudo mostrou 40% mais toxicidade do que os NPs O-CMQ nas células MiaPaCa-2. Em outros trabalhos, a citotoxicidade estudada pelo ensaio MTT indicou que a O-CMQ demonstrou-se atóxico tanto na célula L929 e L02 quanto em três linhas de células tumorais: Bel-7402, SGC-7901 e Hela in vitro (Anitha *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011; Huang e Kuo, 2016).

Com relação ao PVA o mesmo já é empregado em uma gama de aplicações industriais, comerciais, médicas e de na indústria de alimentos sendo bastante empregado no revestimento de produtos farmacêuticos e alimentares (Jiang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2018; Venkataprasanna *et al.*, 2019). Logo, estudos relatam que o PVA administrado por via oral é relativamente inofensivo. Essa afirmativa baseia-se no seguinte: a toxicidade aguda por via oral do PVA é muito baixa, com LD50 (dose letal aguda) na faixa de 15 a 20 g/kg; o PVA administrado por via oral tem baixa absorção no trato gastrointestinal; o PVA não se acumula no organismo quando administrado por via oral; o PVA não é mutagênico ou clastogênico; e (5) Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAELs) de PVA administrados por via oral em ratos machos e fêmeas foram 5000 mg/kg de peso corporal por dia no estudo dietético de 90 dias e 5000 mg/kg de peso corporal por dia no estudo de reprodução de duas gerações, que foi a dose mais alta testada (Demerlis e Schoneker, 2003; Kanimozhi, Basha, Kumari, Kaviyarasu, *et al.*, 2018).

Tratando sobre AgNPs, fatores como tamanho, morfologia, carga superficial, estabilizantes e concentração influenciam diretamente a toxicidade das mesmas (El Badawy *et al.*, 2010). Quando suspensos no meio de cultura celular, AgNPs podem se dissolver, resultando em formação de íons, propriedades alteradas das partículas (por exemplo, tamanho, morfologia, etc.). Dessa forma, as células cultivadas são expostas não apenas às nanopartículas, mas a uma mistura dinâmica e complexa de

nanopartículas alteradas, íons não ligados e complexos ligante-íon (Smith *et al.*, 2018).

Dessa forma, vários estudos têm investigado a toxicidade de AgNPs em uma variedade de organismos, mamíferos e células humanas. Embora os mecanismos exatos de toxicidade dos AgNPs ainda não sejam claros, muitos mecanismos propostos podem ser encontrados na literatura. Esses mecanismos incluem a dissolução de  $\text{Ag}^+$  presentes nas AgNPs (Vimbela *et al.*, 2017), associação de AgNPs com membranas celulares podendo causar danos físicos (por exemplo, corrosão) ou a penetração subsequente que causa mau funcionamento celular (Park *et al.*, 2011), e interação com proteínas e/ou enzimas específicas que inibem suas atividades (Käkinen *et al.*, 2013; Vimbela *et al.*, 2017). El Badawy *et al.* (2010) estudaram a toxicidade de AgNPs com diferentes cargas de superfície (-38 a +41 mV) e preparadas com diferentes agentes de recobrimento (AgNPs-não recobertas, AgNPs-recobertas com citrato de sódio, AgNPs-PVP e AgNPs recobertas com polietilenoimina). Em seus resultados, fatores como tamanho e morfologia das AgNPs demonstraram uma fraca ou nenhuma influência frente a toxicidade, demonstrando alguma importância apenas quando as cargas superficiais entre a membrana celular e AgNPs eram vencidas, sendo este o fator preponderante. Ademais, os resultados apresentados não encontraram impactos toxicológicos significativos associados à presença de impurezas ( $\text{Ag}^+$  residual, agentes redutores e estabilizantes remanescentes da síntese), bem como efeitos causados pelos agentes de recobrimento das suspensões de AgNPs investigadas.

Em contrapartida, Park *et al.* (2011) em seus estudos avaliaram o efeito de AgNPs preparadas em três diferentes tamanhos (20, 80 e 113 nm) sobre células do tipo L929 e RAW 264,7. Como resultados, constataram que as AgNPs causaram danos a membrana celular das células L929 e em concentrações mais altas também afetaram a atividade metabólica das células. No entanto, estes estudos não fazem menção a concentração empregada de AgNPs, fator este preponderante para considerar os resultados.

Barbosa *et al.* (2019) estudaram a ação anti-helmíntica de AgNPs obtidas através de síntese verde usando o fungo *D. Flagrans* as quais também tiveram sua toxicidade avaliada frente a células L929 por meio do ensaio de MTT. Como resultados foi encontrada dose tóxica ( $\text{EC}_{50}$ ) para células L929 na concentração de

228,2 ± 6,7 para AgNPs obtidas através de síntese química e 43,4 ± 6,8 µg/ml para AgNPs obtidas por meio do fungo *D. Flagrans*.

Dessa forma, os resultados de citotoxicidade dos géis O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs corroboram com os resultados apresentados com o que é relatado na literatura, demonstrando ausência de toxicidade para todas as composições avaliadas, fator este de grande importância considerando seu possível uso no tratamento de queimaduras. Complementarmente, pode-se afirmar que de acordo com a norma as AgNPs aqui obtidas não apresentaram toxicidade diante da inexistência de halos em torno das amostras, fator este que pode estar relacionado a sua concentração, a qual se encontra abaixo da dose letal para células L929. No entanto, não pode ser afirmado que as AgNPs não causaram danos as células, visto que, estudos mais aprofundados tais como: aplicar Microscopia Eletrônica de Transmissão na avaliação da saúde da membrana celular quando em contato com as AgNPs (El Badawy *et al.*, 2010); estudar o consumo de oxigênio das células frente o contato com AgNPs, de modo a averiguar um possível estresse oxidativo celular (Vimbela *et al.*, 2017), não foram realizados para refutar tal afirmação.

Não obstante, o molde de PLA empregado no ensaio demonstrou-se atóxico corroborando com os resultados relatados na literatura (Besko *et al.*, 2017; Konta *et al.*, 2017), logo, propõe-se uma nova metodologia que pode ser empregada para análise de materiais que não possuem a capacidade de manter sua forma quando em contato com o ágar.

#### **4.4.4 Ensaio de MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio)**

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que se baseia em determinar a interrupção da atividade mitocondrial, sendo esta quantificada por meio da medida de cristais de formazano (de cor roxa), os quais são formados pela redução do Brometo de 3-(4,5 dimetil tiazol-2il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT)(de cor amarela) através da ação do succinato desidrogenase. A absorvância obtida nas leituras é diretamente proporcional à capacidade metabólica das mitocôndrias, servindo como indicativo da quantidade destas vivas durante o contato com as amostras (Sylvester, 2011). Os ensaios foram conduzidos nos extratos dos géis pelo fato do gel não poder ser empregado no ensaio de MTT, pois, ao afundar, pode causar dano mecânico as

células. Além disso, ensaiando o extrato obtemos uma resposta citotóxica quanto a uma superexposição ao material. Na Figura 35 estão presentes os resultados para o ensaio de MTT para os extratos dos Géis O-CMQ/PVA, O-CMQ/PVA/AgNPs 1, 3 e 5% e AgNPs.

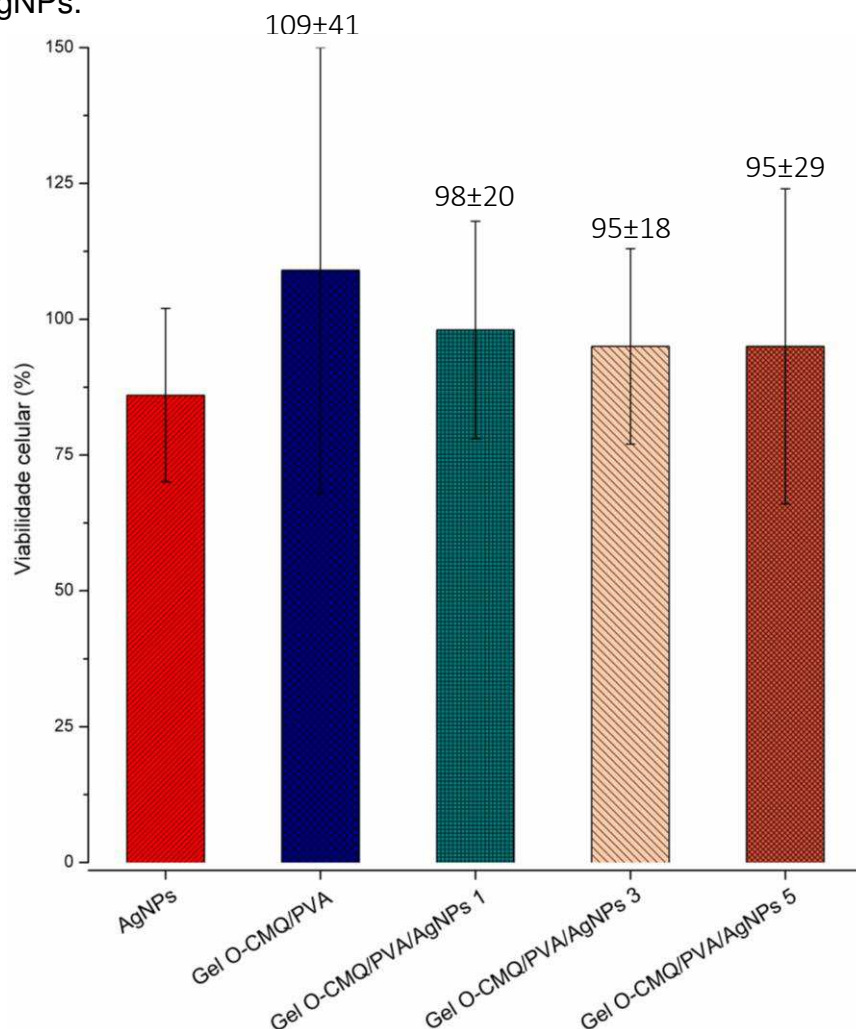


Figura 35 - Citotoxicidade via ensaio de MTT das amostras de AgNPs e géis O-CMQ/PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs.

A interpretação dos resultados do ensaio de MTT se dá por meio da avaliação da viabilidade celular, a qual, quando reduzida em mais de 30% considera um efeito tóxico oriundo da amostra analisada (Organization, 2009). De acordo com os resultados presentes na Figura 35 pode-se observar que os extratos apresentaram níveis de viabilidade celular acima de 70%, apresentando-se como materiais não tóxicos. E observada uma redução dos valores de viabilidade com o aumento da proporção de AgNPs presente no extrato, no entanto, a viabilidade mantém-se acima de 70%.

Dessa forma, as AgNPs juntamente com os extratos dos géis O-CMQ/PVA, O-CMQ/PVA/AgNPs 1, 3 e 5% demonstraram-se não tóxicas mesmo em uma condição de superexposição as células, estando de acordo com os resultados observados na literatura (Park *et al.*, 2011; Jimtaisong e Saewan, 2014; Huang e Kuo, 2016; Kanimozhi, Basha, Kumari, Kaviyarasu, *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2019; Venkataprasanna *et al.*, 2019) e também com os resultados obtidos no ensaio de difusão em ágar.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, géis O-CMQ/PVA/AgNPs foram preparados com o objetivo de empregá-los no tratamento de queimaduras. Para tanto, géis AgNPs-PVP obtidos pelo método de redução química, PVA e O-CMQ foram empregados na confecção dos géis O-CMQ/PVA/AgNPs. Como resultados, AgNPs estáveis, monodispersas (inalteradas durante o período de 1 mês), com morfologia triangular e diâmetro de  $38,17 \pm 1,37$  nm foram obtidas. Géis de O-CMQ/PVA apresentaram a formação de ligações cruzadas entre a O-CMQ e PVA as quais refletiram em uma boa habilidade de resistir a ciclos de intumescimento e secagem, baixa perda de umidade, tempo de degradação de 1 dia e comportamento de fluido newtoniano para as composições O-CMQ/1% PVA e O-CMQ/PVA/AgNPs 5. Avaliações citotóxicológicas pelo método de difusão em ágar e MTT constataram ausência de toxicidade frente a células L929 para os géis O-CMQ/PVA/AgNPs e AgNPs puras em todas as suas composições os quais também não demonstraram atividade antimicrobiana frente a cepas de E. Coli e S. Aureus. À vista disto, géis O-CMQ/PVA/AgNPs apresentaram-se promissores para aplicação no tratamento de queimaduras e lesões em geral, no entanto, mais estudos devem ser realizados quanto a concentração adequada das AgNPs para se ter um controle microbiológico efetivo durante aplicação.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos *in vivo* em ratos da raça Wistar em parceria com o LBio – Laboratório de Bioensaios – UFCG/Patos da UFCG seguindo a metodologia proposta por Nascimento *et al.* (2009);
- Quantificar e estudar o perfil de liberação controlada das AgNPs presentes no Gel via Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES);
- Adição de pantenol-D a matriz dos Géis O-CMQ/PVA/AgNPs para otimizar o tratamento de queimaduras e reepitelização.
- Avaliar a atividade antimicrobiana em diferentes concentrações de AgNPs frente a cepas de *S. Aureus* e *E. Coli* de modo a estimar sua concentração inibitória mínima.
- Realizar estudos nos géis O-CMQ com diferentes agentes reticulantes de modo a aumentar seu tempo de estabilidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, F.; AHMADI, A.; YAVARI, A.; HOSSEINI, V.; MOUSAVI, S. Comparison of silver nylon wound dressing and silver sulfadiazine in partial burn wound therapy. **International wound journal**, v. 10, n. 5, p. 573-578, 2013.

ADLY, O.; MOGHAZY, A.; ABBAS, A.; ELLABBAN, A.; ALI, O.; MOHAMED, B. Assessment of amniotic and polyurethane membrane dressings in the treatment of burns. **Burns**, v. 36, n. 5, p. 703-710, 2010.

AFSHARI, A.; NGUYEN, L.; KAHN, S. A.; MONTGOMERY, A. C.; SHINHA, T.; STRATTON, C.; SUMMITT, B. The Effective Duration of Antimicrobial Activity of Mafenide Acetate After Reconstitution. **Journal of Burn Care & Research**, v. 39, n. 5, p. 736-738, 2018.

AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N. M. Methods of synthesis of hydrogels... A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 554-559, 2016.

ALARCON, E. I.; UDEKWU, K.; SKOG, M.; PACIONI, N. L.; STAMPLECOSKIE, K. G.; GONZÁLEZ-BÉJAR, M.; POLISETTI, N.; WICKHAM, A.; RICHTER-DAHLFORS, A.; GRIFFITH, M. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4947-4956, 2012.

ALBU, A.-M.; MAIOR, I.; NICOLAE, C. A.; BOCĂNEALĂ, F. L. Novel PVA proton conducting membranes doped with polyaniline generated by in-situ polymerization. **Electrochimica Acta**, v. 211, p. 911-917, 2016.

ALHOSSEINI, S. N.; MOZTARZADEH, F.; MOZAFARI, M.; ASGARI, S.; DODEL, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; KARGOZAR, S.; JALALI, N. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 25, 2012.

ALMDAL, K.; DYRE, J.; HVIDT, S.; KRAMER, O. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. **Polymer gels and networks**, v. 1, n. 1, p. 5-17, 1993.

ALMEIDA, É. D. S. Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por *fusarium oxysporum*. 2017.

ANDRADE, P. F. Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos. 2013.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K.; NAIR, S.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 452-461, 2011.

ANITHA, A.; RANI, V. D.; KRISHNA, R.; SREEJA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 672-677, 2009.

ANTÓNIO, D. C.; CASCIO, C.; JAKŠIĆ, Ž.; JURAŠIN, D.; LYONS, D. M.; NOGUEIRA, A. J.; ROSSI, F.; CALZOLAI, L. Assessing silver nanoparticles behaviour in artificial seawater by mean of AF4 and spICP-MS. **Marine environmental research**, v. 111, p. 162-169, 2015.

ARBAB, E. A. A.; MOLA, G. T. Metals decorated nanocomposite assisted charge transport in polymer solar cell. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 91, p. 1-8, 2019.

ASHTER, S. A. **Introduction to bioplastics engineering**. William Andrew, 2016. ISBN 0323394078.

ATKINS, P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. **Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman Editora, 2018. ISBN 8582604629.

AZZOPARDI, E. A.; AZZOPARDI, E.; CAMILLERI, L.; VILLAPALOS, J.; BOYCE, D. E.; DZIEWULSKI, P.; DICKSON, W. A.; WHITAKER, I. S. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients-systematic review and metanalysis. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95042, 2014.

BAGHERI-KHOULENJANI, S.; TAGHIZADEH, S.; MIRZADEH, H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 773-778, 2009.

BAKER, C.; PRADHAN, A.; PAKSTIS, L.; POCHAN, D. J.; SHAH, S. I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 5, n. 2, p. 244-249, 2005.

BARBOSA, A. C. M. S.; SILVA, L. P. C.; FERRAZ, C. M.; TOBIAS, F. L.; DE ARAÚJO, J. V.; LOUREIRO, B.; BRAGA, G. M. A. M.; VELOSO, F. B. R.; DE FREITAS SOARES, F. E.; FRONZA, M. Nematicidal activity of silver nanoparticles from the fungus *Duddingtonia flagrans*. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 2341, 2019.

BARNES, W. L.; DEREUX, A.; EBBESEN, T. W. Surface plasmon subwavelength optics. **nature**, v. 424, n. 6950, p. 824, 2003.

BEKMURZAYEVA, A.; DUNCANSON, W. J.; AZEVEDO, H. S.; KANAYEVA, D. Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. **Materials Science and Engineering: C**, 2018.

BEPPU, M.; VIEIRA, R.; AIMOLI, C.; SANTANA, C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of membrane Science**, v. 301, n. 1, p. 126-130, 2007.

BERGO, P.; SOBRAL, P.; PRISON, J. Physical properties of cassava starch films containing glycerol. **Food Engineering Dept., FZEA, University of Sao Paulo, Brazil. Received**, v. 2, 2009.

BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics**. Courier Corporation, 2000. ISBN 0486411559.

BESKO, M.; BILYK, C.; SIEBEN, P. Aspectos técnicos e nocivos dos principais filamentos usados em impressão 3D. **Gestão, Tecnologia e Inovação**, v. 1, p. 9-18, 2017.

BHANDARI, J.; MISHRA, H.; MISHRA, P. K.; WIMMER, R.; AHMAD, F. J.; TALEGAONKAR, S. Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2021, 2017.

BIERBRAUER, K. L.; ALASINO, R. V.; MUÑOZ, A.; BELTRAMO, D. M.; STRUMIA, M. C. Characterization and bacterial adhesion of chitosan-perfluorinated acid films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 201-208, 2014.

BORSAGLI, F. G. M.; MANSUR, A. A.; CHAGAS, P.; OLIVEIRA, L. C.; MANSUR, H. S. O-carboxymethyl functionalization of chitosan: complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutant ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 97, p. 37-47, 2015.

BOWLER, P.; DUERDEN, B.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 244-269, 2001.

BRITO, G.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.; MÉLO, T. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BROGDEN, K. A.; GUTHMILLER, J. M.; TAYLOR, C. E. Human polymicrobial infections. **The Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 253-255, 2005.

BUJANG-SAFAWI, E.; HALIM, A.; KHOO, T.; DORAI, A. Dried irradiated human amniotic membrane as a biological dressing for facial burns—A 7-year case series. **Burns**, v. 36, n. 6, p. 876-882, 2010.

CAI, K.; YAO, K.; LI, Z.; YANG, Z.; LI, X. Rat osteoblast functions on the O-carboxymethyl chitosan-modified poly (D, L-lactic acid) surface. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 12, n. 12, p. 1303-1315, 2001.

CANO, A.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Development and characterization of active films based on starch-PVA, containing silver nanoparticles. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 16-24, 2016.

CHAI, Q.; JIAO, Y.; YU, X. Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them. **Gels**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.

CHALMERS, J.; GRIFFITHS, P. **Handbook of Vibrational Spectroscopy, 5 volumes set**. Wiley, 2002. ISBN 0471988472.

CHANDRAN, S. P.; CHAUDHARY, M.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 2, p. 577-583, 2006.

CHANG, S.-H.; LIN, H.-T. V.; WU, G.-J.; TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74-81, 2015.

CHAUDHRI, N.; SONI, G. C.; PRAJAPATI, S. Nanotechnology: an advance tool for nano-cosmetics preparation. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 4, n. 4, p. 28-40, 2015.

CHEN, D.; KAN, C.; LIU, X.; XIA, L. The biodegrades of porous ceramics of strontium substituted hydroxyapatite in vivo. **J. Funct. Mater**, v. 41, p. 1919-1922, 2010.

CHEN, L.; DU, Y.; TIAN, Z.; SUN, L. Effect of the degree of deacetylation and the substitution of carboxymethyl chitosan on its aggregation behavior. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 43, n. 3, p. 296-305, 2005.

CHEN, S.-C.; WU, Y.-C.; MI, F.-L.; LIN, Y.-H.; YU, L.-C.; SUNG, H.-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N, O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 2, p. 285-300, 2004.

CHEN, S.; CARROLL, D. L. Synthesis and characterization of truncated triangular silver nanoplates. **Nano letters**, v. 2, n. 9, p. 1003-1007, 2002.

CHEN, X.-G.; PARK, H.-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355-359, 2003.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. **Toxicology letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHEN, Y.; QIAO, S.; YU, J.; WANG, Y.; ZHU, J.; HU, Z. A novel dual responsive nanocomposite double network hydrogel with good mechanical property. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing, p.012042, 2018.

CHEN, Y.; TAN, H.-M. Crosslinked carboxymethylchitosan-g-poly (acrylic acid) copolymer as a novel superabsorbent polymer. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 7, p. 887-896, 2006.

CHENG, D.; HE, M.; RAN, J.; CAI, G.; WU, J.; WANG, X. Depositing a flexible substrate of triangular silver nanoplates onto cotton fabrics for sensitive SERS detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 270, p. 508-517, 2018.

CHIEN, R.-C.; YEN, M.-T.; MAU, J.-L. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 259-264, 2016.

CHOI, J.-Y.; YOO, J. Y.; KWAK, H.-S.; NAM, B. U.; LEE, J. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 5, p. 472-474, 2005.

CHOO, K.; CHING, Y. C.; CHUAH, C. H.; JULAI, S.; LIOU, N.-S. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. **Materials**, v. 9, n. 8, p. 644, 2016.

CHUA, A. W. C.; KHOO, Y. C.; TAN, B. K.; TAN, K. C.; FOO, C. L.; CHONG, S. J. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns & trauma**, v. 4, n. 1, p. 3, 2016.

CHUANG, W.-Y.; YOUNG, T.-H.; YAO, C.-H.; CHIU, W.-Y. Properties of the poly (vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. **Biomaterials**, v. 20, n. 16, p. 1479-1487, 1999.

CHUNG, T. W.; LU, Y. F.; WANG, H. Y.; CHEN, W. P.; WANG, S. S.; LIN, Y. S.; CHU, S. H. Growth of Human Endothelial Cells on Different Concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp Grafted Chitosan Surface. **Artificial organs**, v. 27, n. 2, p. 155-161, 2003.

CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O.; WINSTON, B.; LINDSAY, R. PMID: PMC1471990. **Clinical Microbiology Rev**, v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COSTA, C. M.; NACCACHE, M. F.; VARGES, P. Caracterização reológica de fluidos complexos. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 4, n. 7, 2017.

CRUZ, A. S.; CUPPOLONI, K. M.; MARTINEZ, C. H.; SALLES-GOMES, L. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.

CRUZ, A. S.; FIGUEIREDO, C. A.; IKEDA, T. I.; VASCONCELOS, A. C. E.; CARDOSO, J. B.; SALLES-GOMES, L. F. D. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade "in vitro" de materiais biocompatíveis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 153-159, 1998.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 382, n. 1, p. 205-214, 2009.

DA CRUZ, J. A.; DA SILVA, A. B.; RAMIN, B. B.; SOUZA, P. R.; POPAT, K. C.; ZOLA, R. S.; KIPPER, M. J.; MARTINS, A. F. Poly (vinyl alcohol)/cationic tannin blend films with antioxidant and antimicrobial activities. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110357, 2020.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 214-221, 2009.

DE SOUZA TAVARES, W.; DA SILVA, R. S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 4, p. 300-6, 2015.

DEMARCHI, C. A.; CRUZ, A. B.; ŚLAWSKA-WANIEWSKA, A.; NEDELKO, N.; DŁUŻEWSKI, P.; KALETA, A.; TRZCIŃSKI, J.; DAL MAGRO, J.; SCAPINELLO, J.; RODRIGUES, C. A. Synthesis of Ag@ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite based on O-carboxymethylchitosan with antimicrobial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 42-51, 2018.

DEMERLIS, C.; SCHONEKER, D. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 319-326, 2003.

DJERAHOV, L.; VASILEVA, P.; KARADJOVA, I.; KURAKALVA, R. M.; ARADHI, K. K. Chitosan film loaded with silver nanoparticles-sorbent for solid phase extraction of Al(III), Cd(II), Cu(II), Co(II), Fe(III), Ni(II), Pb(II) and Zn(II). **Carbohydr Polym**, v. 147, p. 45-52, 2016.

DOANE, T. L.; CHUANG, C.-H.; HILL, R. J.; BURDA, C. Nanoparticle  $\zeta$ -Potentials. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 3, p. 317-326, 2012.

DOWNIE, F.; EGDELL, S.; BIELBY, A.; SEARLE, R. Barrier dressings in surgical site infection prevention strategies. **British Journal of Nursing**, v. 19, n. 20, p. S42-S46, 2010.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Novel 3D scaffolds of chitosan-PLLA blends for tissue engineering applications: Preparation and characterization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 3, p. 282-289, 2010.

EL-FAHAM, A.; ELZATAHRY, A. A.; AL-OTHMAN, Z. A.; ELSAYED, E. A. Facile method for the synthesis of silver nanoparticles using 3-hydrazino-isatin derivatives in aqueous methanol and their antibacterial activity. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1167, 2014.

EL-MOHDY, H. A.; GHANEM, S. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by  $\gamma$ -irradiation. **Journal of Polymer Research**, v. 16, n. 1, p. 1, 2009.

EL-TAHLAWY, K. F.; EL-BENDARY, M. A.; ELHENDAWY, A. G.; HUDSON, S. M. The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 421-430, 2005.

EL BADAWY, A. M.; SILVA, R. G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K. G.; SUIDAN, M. T.; TOLAYMAT, T. M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 1, p. 283-287, 2010.

EROL, S.; ALTOPARLAK, U.; AKCAY, M. N.; CELEBI, F.; PARLAK, M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. **Burns**, v. 30, n. 4, p. 357-361, 2004.

F. GONÇALVES, S.; D. PAVLAKI, M.; LOPES, R.; HAMMES, J.; GALLEGU-URREA, J. A.; HASSELLÖV, M.; JURKSCHAT, K.; CROSSLEY, A.; LOUREIRO, S. Effects of silver nanoparticles on the freshwater snail *Physa acuta*: the role of test media and snails' life cycle stage. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 1, p. 243-253, 2017.

FABREGA, J.; LUOMA, S. N.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S.; LEAD, J. R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 517-531, 2011.

FAROOQ, S.; NUNES, F. D.; DE ARAUJO, R. E. Optical properties of silver nanoplates and perspectives for biomedical applications. **Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications**, v. 31, p. 160-167, 2018.

FEI LIU, X.; LIN GUAN, Y.; ZHI YANG, D.; LI, Z.; DE YAO, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324-1335, 2001.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G.; CUI, F.; KIM, T.; KIM, J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of biomedical materials research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.

FERREIRA, F. V.; PAULA, L. B. Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 132-9, 2013.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. D. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. 2009.

FERREIRA, M.; RÓZ, A.; LEITE, F.; NOVAIS, O. **Nanoestruturas**. Elsevier Brasil, 2016. ISBN 8535280928.

FOUDA, M. M.; EL-AASSAR, M. R.; AL-DEYAB, S. S. Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles. **Carbohydr Polym**, v. 92, n. 2, p. 1012-7, 2013.

FRANCI, G.; FALANGA, A.; GALDIERO, S.; PALOMBA, L.; RAI, M.; MORELLI, G.; GALDIERO, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856-8874, 2015.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev Col Bras Cir**, v. 35, n. 3, p. 203-6, 2008.

FRÍGOLS, B.; MARTÍ, M.; SALESA, B.; HERNÁNDEZ-OLIVER, C.; AARSTAD, O.; ULSET, A.-S. T.; SÆTROM, G. I.; AACHMANN, F. L.; SERRANO-AROCA, Á. Graphene oxide in zinc alginate films: Antibacterial activity, cytotoxicity, zinc release, water sorption/diffusion, wettability and opacity. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0212819, 2019.

GAAZ, T.; SULONG, A.; AKHTAR, M.; KADHUM, A.; MOHAMAD, A.; AL-AMIERY, A. Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22833-22847, 2015.

GABRIEL, J. S.; GONZAGA, V. A. M.; POLI, A. L.; SCHMITT, C. C. Photochemical synthesis of silver nanoparticles on chitosans/montmorillonite nanocomposite films and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 202-210, 2017.

GADGEY, K. K.; BAHEKAR, A. Investigation On Uses of Crab Based Chitin and Its Derivatives. **International Journal of Mechanical Engineering and Technology**, v. 8, n. 3, 2017.

GALIANO, P.; SPEZZOTTI, G. P. **Device and method for diagnostic analyses**: Google Patents 2015.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, p. 488-492, 2009.

GARAI, M.; MURTHY, T. C.; KARMAKAR, B. Microstructural characterization and wear properties of silver and gold nanoparticle doped K-Mg-Al-Si-OF glass-ceramics. **Ceramics International**, v. 44, n. 18, p. 22308-22317, 2018.

GARCIA, L. G. S.; DE MELO GUEDES, G. M.; DA SILVA, M. L. Q.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, R. S.; BRILHANTE, R. S. N. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 662-669, 2018.

GEORGE BROUGHTON, I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7S, p. 6S-11S, 2006.



GHASEMI, F.; HORMOZI-NEZHAD, M. R.; MAHMOUDI, M. Label-free detection of  $\beta$ -amyloid peptides ( $A\beta$ 40 and  $A\beta$ 42): a colorimetric sensor array for plasma monitoring of Alzheimer's disease. **Nanoscale**, v. 10, n. 14, p. 6361-6368, 2018.

GHIUȚĂ, I.; CRISTEA, D.; CROITORU, C.; KOST, J.; WENKERT, R.; VYRIDES, I.; ANAYIOTOS, A.; MUNTEANU, D. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using *Bacillus* species. **Applied Surface Science**, v. 438, p. 66-73, 2018.

GHOLAMALI, I.; ASNAASHARIISFAHANI, M.; ALIPOUR, E. Silver nanoparticles incorporated in pH-sensitive nanocomposite hydrogels based on carboxymethyl chitosan-poly (vinyl alcohol) for use in a drug delivery system. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, p. 1-16, 2019.

GREGORY, M.; SELVAKESAVAN, R.; FRANKLIN, G.; SARMENTO, B.; DIAS, A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Withania somnifera* extract and their incorporation into a cream with antibacterial activity. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. SL26, 2014.

GRIPPAUDO, F.; CARINI, L.; BALDINI, R. Procutase® versus 1% silver sulphadiazine in the treatment of minor burns. **Burns**, v. 36, n. 6, p. 871-875, 2010.

GU, Y.; LV, X.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J.; LEDESMA-AMARO, R.; LIU, L. Synthetic redesign of central carbon and redox metabolism for high yield production of N-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis*. **Metabolic engineering**, 2018.

GUENET, J.-M. Gels: A Definition. In: (Ed.). **Organogels**: Springer, 2016. p. 7-15.

GUIMARÃES, P. Q. Metodologia baseada em NIRS e Quimiometria para a determinação de parâmetros de qualidade da quitosana para fins biomédicos. 2017.

GUO, B.-L.; GAO, Q.-Y. Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly (N-isopropylacrylamide) semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 16, p. 2416-2422, 2007.

GUTHA, Y.; PATHAK, J. L.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; JIAO, X. Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO). **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 234-241, 2017.

HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis: principles, applications and problems**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9401113246.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In: (Ed.). **Biopolymers- PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites**: Springer, 2000. p. 37-65.

HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Progress in polymer science**, v. 19, n. 4, p. 663-702, 1994.

HE, G.; CHEN, X.; YIN, Y.; CAI, W.; KE, W.; KONG, Y.; ZHENG, H. Preparation and antibacterial properties of O-carboxymethyl chitosan/lincomycin hydrogels. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 27, n. 4, p. 370-384, 2016.

HE, H.; TAO, G.; WANG, Y.; CAI, R.; GUO, P.; CHEN, L.; ZUO, H.; ZHAO, P.; XIA, Q. In situ green synthesis and characterization of sericin-silver nanoparticle composite with effective antibacterial activity and good biocompatibility. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 80, p. 509-516, 2017.

HERNÁNDEZ, R.; ZAMORA-MORA, V.; SIBAJA-BALLESTERO, M.; VEGA-BAUDRIT, J.; LÓPEZ, D.; MIJANGOS, C. Influence of iron oxide nanoparticles on the rheological properties of hybrid chitosan ferrogels. **Journal of colloid and interface science**, v. 339, n. 1, p. 53-59, 2009.

HIRSCH, T.; ASHKAR, W.; SCHUMACHER, O.; STEINSTRÄESSER, L.; INGIANNI, G.; CEDIDI, C. Moist exposed burn ointment (MEBO) in partial thickness burns. **Eur J Med Res**, v. 13, p. 505-510, 2008.

HOEKSEMA, H.; VANDEKERCKHOVE, D.; VERBELEN, J.; HEYNEMAN, A.; MONSTREY, S. A comparative study of 1% silver sulphadiazine (Flammazine®) versus an enzyme alginate gel (Flaminal®) in the treatment of partial thickness burns. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1234-1241, 2013.

HOMAYONI, H.; RAVANDI, S. A. H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 656-661, 2009.

HONG, L.; CHEUNG, T.-L.; RAO, N.; OUYANG, Q.; WANG, Y.; ZENG, S.; YANG, C.; CUONG, D.; CHONG, P. H. J.; LIU, L. Millifluidic synthesis of cadmium sulfide nanoparticles and their application in bioimaging. **RSC advances**, v. 7, n. 58, p. 36819-36832, 2017.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 467-475, 2016.

HOTZA, D. Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas. **Cerâmica**, v. 43, n. 283-284, p. 157-164, 1997.

HUANG, Y.-C.; KUO, T.-H. O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 261-269, 2016.

IRFAN, M.; MONIRUZZAMAN, M.; AHMAD, T.; MANDAL, P. C.; BHATTACHARJEE, S.; ABDULLAH, B. Ionic liquid based extraction of flavonoids from *Elaeis guineensis* leaves and their applications for gold nanoparticles synthesis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 270-278, 2017.

ISSLER-FISHER, A. C.; FAKIN, R. M.; FISHER, O. M.; MCKEW, G.; GAZZOLA, R.; RAUCH, A.-K.; GOTTLIEB, T.; HAERTSCH, P.; GUGGENHEIM, M.; GIOVANOLI, P. Microbiological findings in burn patients treated in a general versus a designated intensive care unit: Effect on length of stay. **Burns**, v. 42, n. 8, p. 1805-1818, 2016.

IVRIGH, Z. J.-N.; FAHIMI-KASHANI, N.; HORMOZI-NEZHAD, M. R. Aggregation-based colorimetric sensor for determination of prothioconazole fungicide using colloidal silver nanoparticles (AgNPs). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 187, p. 143-148, 2017.

JACOB, J.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 43-55, 2018.

JAGADEESH, R. V.; MURUGESAN, K.; ALSHAMMARI, A. S.; NEUMANN, H.; POHL, M.-M.; RADNIK, J.; BELLER, M. MOF-derived cobalt nanoparticles catalyze a general synthesis of amines. **science**, v. 358, n. 6361, p. 326-332, 2017.

JAIKUMAR, D.; SAJESH, K.; SOUMYA, S.; NIMAL, T.; CHENNAZHI, K.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Injectable alginate-O-carboxymethyl chitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 74, p. 318-326, 2015.

JAISWAL, S.; MISHRA, P. Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 207, n. 1, p. 39-53, 2018.

JALVANDI, J.; WHITE, M.; GAO, Y.; TRUONG, Y. B.; PADHYE, R.; KYRATZIS, I. L. Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 440-446, 2017.

JANKAEW, R.; RODKATE, N.; LAMLERTTHON, S.; RUTNAKORNPITUK, B.; WICHAI, U.; ROSS, G.; RUTNAKORNPITUK, M. "Smart" carboxymethylchitosan hydrogels crosslinked with poly (N-isopropylacrylamide) and poly (acrylic acid) for controlled drug release. **Polymer Testing**, v. 42, p. 26-36, 2015.

JANVIKUL, W.; UPPANAN, P.; THAVORNYUTIKARN, B.; PRATEEPASEN, R.; SWASDISON, S. Fibroblast interaction with carboxymethylchitosan-based hydrogels. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 943-949, 2007.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; SELVAMURUGAN, N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, n. 7, p. 675-709, 2010.

JE, J.-Y.; CHO, Y.-S.; KIM, S.-K. Cytotoxic activities of water-soluble chitosan derivatives with different degree of deacetylation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 8, p. 2122-2126, 2006.

JI, N.; LIU, C.; ZHANG, S.; XIONG, L.; SUN, Q. Elaboration and characterization of corn starch films incorporating silver nanoparticles obtained using short glucan chains. **LWT-Food science and technology**, v. 74, p. 311-318, 2016.

JIANG, S.; LIU, S.; FENG, W. PVA hydrogel properties for biomedical application. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 4, n. 7, p. 1228-1233, 2011.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. **International journal of cosmetic science**, v. 36, n. 1, p. 12-21, 2014.

JIN, R.; CAO, Y.; MIRKIN, C. A.; KELLY, K.; SCHATZ, G. C.; ZHENG, J. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. **science**, v. 294, n. 5548, p. 1901-1903, 2001.

JUVENCIO, L. R. F. Preparação e caracterização de filme de PVA/Quitosana/Colágeno visando a aplicação como curativo cutâneo. 2017.

KADIR, M.; MAJID, S.; AROF, A. Plasticized chitosan–PVA blend polymer electrolyte based proton battery. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 4, p. 1475-1482, 2010.

KÄKINEN, A.; DING, F.; CHEN, P.; MORTIMER, M.; KAHRU, A.; KE, P. C. Interaction of firefly luciferase and silver nanoparticles and its impact on enzyme activity. **Nanotechnology**, v. 24, n. 34, p. 345101, 2013.

KAMARUL, T.; KRISHNAMURITHY, G.; SALIH, N. D.; IBRAHIM, N. S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUHAEB, A. R.; CHOON, D. Biocompatibility and toxicity of poly (vinyl alcohol)/N, O-carboxymethyl chitosan scaffold. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KANATT, S. R.; RAO, M.; CHAWLA, S.; SHARMA, A. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. **LWT-Food science and technology**, v. 53, n. 1, p. 321-326, 2013.

KANIMOZHI, K.; BASHA, S. K.; KUMARI, V. S.; KAVIYARASU, K. Development of Biomimetic Hybrid Porous Scaffold of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Carboxymethyl Cellulose by Freeze-Dried and Salt Leached Technique. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 18, n. 7, p. 4916-4922, 2018.

KANIMOZHI, K.; BASHA, S. K.; KUMARI, V. S.; KAVIYARASU, K.; MAAZA, M. In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose–Nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells. **Applied Surface Science**, v. 449, p. 574-583, 2018.

KASSAEI, M.; AKHAVAN, A.; SHEIKH, N.; SODAGAR, A. Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, n. 3, p. 1699-1703, 2008.

KAUR, A.; KUMAR, R. Enhanced bactericidal efficacy of polymer stabilized silver nanoparticles in conjugation with different classes of antibiotics. **RSC advances**, v. 9, n. 2, p. 1095-1105, 2019.

KAVANAGH, S.; DE JONG, A.; INJURIES, N. C. O. T. I. S. F. B. Care of burn patients in the hospital. **Burns**, v. 30, n. 8, p. A2-A6, 2004.

KHAN, A. U.; ZHOU, Z.; KRAUSE, J.; LIU, G. Poly (vinylpyrrolidone)-Free Multistep Synthesis of Silver Nanoplates with Plasmon Resonance in the Near Infrared Range. **Small**, v. 13, n. 43, p. 1701715, 2017.

KHARAZMI, A.; FARAJI, N.; HUSSIN, R. M.; SAION, E.; YUNUS, W. M. M.; BEHZAD, K. Structural, optical, opto-thermal and thermal properties of ZnS–PVA nanofluids synthesized through a radiolytic approach. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 529-536, 2015.

KIM, T. H.; AN, D. B.; OH, S. H.; KANG, M. K.; SONG, H. H.; LEE, J. H. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. **Biomaterials**, v. 40, p. 51-60, 2015.

KITTUR, F.; PRASHANTH, K. H.; SANKAR, K. U.; THARANATHAN, R. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 185-193, 2002.

KONTA, A. A.; GARCÍA-PIÑA, M.; SERRANO, D. R. Personalised 3D printed medicines: which techniques and polymers are more successful? **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 79, 2017.

KRZYŻEWSKA, I.; KYZIOŁ-KOMOSIŃSKA, J.; ROSIK-DULEWSKA, C.; CZUPIOŁ, J.; ANTOSZCZYSZYN-SZPICKA, P. Inorganic nanomaterials in the aquatic environment: behavior, toxicity, and interaction with environmental elements. **Archives of Environmental Protection**, v. 42, n. 1, p. 87-101, 2016.

KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL, L.; ANGULO, Y. Fabrication of silver nanoplates using *Nephelium lappaceum* (Rambutan) peel: a sustainable approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 211, p. 476-480, 2015.

KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL, L.; DEBUT, A. Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 45-50, 2017.

KUMBHAR, S.; PAWAR, S. Self-Functionalized, Oppositely Charged Chitosan-Alginate Scaffolds for Biomedical Applications. **Biotechnol Ind J**, v. 13, n. 2, p. 130, 2017.

KVITEK, L.; PANÁČEK, A.; SOUKUPOVA, J.; KOLÁŘ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; PRUCEK, R.; HOLECOVA, M.; ZBOŘIL, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 15, p. 5825-5834, 2008.

LAMEIRO, M. H.; LOPES, A.; MARTINS, L. O.; ALVES, P. M.; MELO, E. Incorporation of a model protein into chitosan–bile salt microparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 312, n. 1, p. 119-130, 2006.

LEE, J.; ELISSEEFF, J. H.; UNTERMAN, S. A. **Biomaterials comprising hyaluronic acid binding peptides and bifunctional biopolymer molecules for hyaluronic acid retention and tissue engineering applications**: Google Patents 2017.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat science**, v. 111, p. 192-197, 2016.

LI, H.; KONG, N.; LAVER, B.; LIU, J. Hydrogels constructed from engineered proteins. **Small**, v. 12, n. 8, p. 973-987, 2016.

LI, J.; WU, Y.; ZHAO, L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 200-205, 2016.

LI, N.; ZHANG, Q.; QUINLIVAN, S.; GOEBL, J.; GAN, Y.; YIN, Y. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aided Seed-Mediated Synthesis of Silver Nanoplates with Improved Yield and Efficiency. **ChemPhysChem**, v. 13, n. 10, p. 2526-2530, 2012.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 617-620, 2015.

LI, X.; CHEN, S.; ZHANG, B.; LI, M.; DIAO, K.; ZHANG, Z.; LI, J.; XU, Y.; WANG, X.; CHEN, H. In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N, O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application. **International journal of pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 110-119, 2012.

LI, Y.; TAN, Y.; XU, K.; LU, C.; LIANG, X.; WANG, P. In situ crosslinkable hydrogels formed from modified starch and O-carboxymethyl chitosan. **RSC advances**, v. 5, n. 38, p. 30303-30309, 2015.

LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 378-387, 2015.

LIMA, A. L. V. TRATAMENTO TÓPICO DE QUEIMADURAS E SUAS ATUALIZAÇÕES: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Repositório de Trabalhos de Conclusão de Curso e Monografias**, 2019.

LIN, R.; LI, A.; LU, L.; CAO, Y. Preparation of bulk sodium carboxymethyl cellulose aerogels with tunable morphology. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 126-132, 2015.

LIN, Y.-H.; LIANG, H.-F.; CHUNG, C.-K.; CHEN, M.-C.; SUNG, H.-W. Physically crosslinked alginate/N, O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 2105-2113, 2005.

LIU, Q.; ZUO, Q.; GUO, R.; HONG, A.; LI, C.; ZHANG, Y.; HE, L.; XUE, W. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan/poly (vinyl alcohol) hydrogels containing alginate microspheres for protein delivery. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 30, n. 4, p. 397-411, 2015.

LIU, X.; WANG, Q.; ZHUANG, X.; WU, B.; YANG, F.; ZENG, A. Study on antibacterial activity of O-carboxymethyl chitosan sodium salt and spinnability of O-carboxymethyl chitosan sodium salt/cellulose polyblends in N-methylmorpholine-N-oxide system. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 104-110, 2012.

LIU, Y.; TANG, M.; MENG, M.; WANG, M.; WU, J.; YIN, J.; ZHOU, Y.; GUO, Y.; TAN, C.; DANG, W. Epitaxial growth of ternary topological insulator Bi<sub>2</sub>Te<sub>2</sub>Se 2D crystals on mica. **Small**, v. 13, n. 18, p. 1603572, 2017.

LIU, Z.; JIAO, Y.; ZHANG, Z. Calcium-carboxymethyl chitosan hydrogel beads for protein drug delivery system. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n. 5, p. 3164-3168, 2007.

LOGITHKUMAR, R.; KESHAVNARAYAN, A.; DHIVYA, S.; CHAWLA, A.; SARAVANAN, S.; SELVAMURUGAN, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydr Polym**, v. 151, p. 172-88, 2016.

LU, H.; REN, X.; WEI, E.; CHEN, J.; KANG, Z.; ZHANG, H.; HO, H.-P.; CHOY, W. C. Experimental and theoretical investigation of macro-periodic and micro-random nanostructures with simultaneously spatial translational symmetry and long-range order breaking. **Scientific reports**, v. 5, p. 7876, 2015.

LUNA-HERNANDEZ, E.; CRUZ-SOTO, M. E.; PADILLA-VACA, F.; MAURICIO-SANCHEZ, R. A.; RAMIREZ-WONG, D.; MUNOZ, R.; GRANADOS-LOPEZ, L.; OVALLE-FLORES, L. R.; MENCHACA-ARREDONDO, J. L.; HERNANDEZ-RANGEL, A.; PROKHOROV, E.; GARCIA-RIVAS, J. L.; ESPANA-SANCHEZ, B. L.; LUNA-BARCENAS, G. Combined antibacterial/tissue regeneration response in thermal burns promoted by functional chitosan/silver nanocomposites. **Int J Biol Macromol**, v. 105, n. Pt 1, p. 1241-1249, 2017.

LUO, P.; NIE, M.; WEN, H.; XU, W.; FAN, L.; CAO, Q. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan sulfate/oxidized konjac glucomannan hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 1024-1031, 2018.

MA, J.; ZHAO, H.; SANDMAIER, J.; LIDDLE, J. A.; SCHUCK, P. Variable field analytical ultracentrifugation: II. Gravitational sweep sedimentation velocity. **Biophysical journal**, v. 110, n. 1, p. 103-112, 2016.

MABROUK, A.; BOUGHDADI, N. S.; HELAL, H. A.; ZAKI, B. M.; MAHER, A. Moist occlusive dressing (Aquacel® Ag) versus moist open dressing (MEBO®) in the management of partial-thickness facial burns: A comparative study in Ain Shams University. **Burns**, v. 38, n. 3, p. 396-403, 2012.

MAHL, D.; DIENDORF, J.; MEYER-ZAIKA, W.; EPPLE, M. Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 377, n. 1-3, p. 386-392, 2011a.

\_\_\_\_\_. Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 377, n. 1, p. 386-392, 2011b.

MAMATHA, R.; KHAN, S.; SALUNKHE, P.; SATPUTE, S.; KENDURKAR, S.; PRABHUNE, A.; DEVAL, A.; CHAUDHARI, B. P. Rapid synthesis of highly monodispersed silver nanoparticles from the leaves of *Salvadora persica*. **Materials Letters**, v. 205, p. 226-229, 2017.

MARTINEZ-CASTANON, G.; NINO-MARTINEZ, N.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F.; MARTINEZ-MENDOZA, J.; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 8, p. 1343-1348, 2008.

MEHMOOD, Z.; MUBEEN, S. M.; AFZAL, M. S.; HUSSAIN, Z. Potential risk of cross-infection by tourniquets: a need for effective control practices in Pakistan. **International journal of preventive medicine**, v. 5, n. 9, p. 1119, 2014.

MI, F.-L.; TAN, Y.-C.; LIANG, H.-F.; SUNG, H.-W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 181-191, 2002.

MIE, G. Contribution to the optical properties of turbid media, in particular of colloidal suspensions of metals. **Ann. Phys.(Leipzig)**, v. 25, p. 377-452, 1908.

MOCANU, A.; PASCA, R. D.; TOMOAI, G.; GARBO, C.; FRANGOPOL, P. T.; HOROVITZ, O.; TOMOAI-COTISEL, M. New procedure to synthesize silver nanoparticles and their interaction with local anesthetics. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 3867, 2013.

MOCK, J.; BARBIC, M.; SMITH, D.; SCHULTZ, D.; SCHULTZ, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 15, p. 6755-6759, 2002.



MOHAMED, R. R.; SABAA, M. W. Synthesis and characterization of antimicrobial crosslinked carboxymethyl chitosan nanoparticles loaded with silver. **Int J Biol Macromol**, v. 69, p. 95-9, 2014.

MOHAN, D.; NICA, D. A.; MOHAN, A.; FEDER, B.; CIUREA, A. V. New concept in cranioplasty based on biomaterials performance in various clinical cases. In: *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publ, p.185-188, 2016.

MOHAPATRA, B.; KURIAKOSE, S.; MOHAPATRA, S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using Piper nigrum extract. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 637, p. 119-126, 2015.

MONCRIEF, J. A.; LINDBERG, R. B.; SWITZER, W. E.; PRUITT, B. A. Use of topical antibacterial therapy in the treatment of the burn wound. **Archives of Surgery**, v. 92, n. 4, p. 558-565, 1966.

MONTASER, A. S. Physical, mechanical and antimicrobial evaluations of physically crosslinked PVA/chitosan hydrogels containing nanoparticles. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 05, p. 001-006, 2016.

MORENO-MARTIN, G.; LEÓN-GONZALEZ, M. E.; MADRID, Y. Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV-Vis spectrophotometry and chemometrics tools. **Talanta**, 2018.

MORGAN, D. Wound dressings: principals and types of dressings. **Formulary of Wound Management Products: a guide for health care staff**, v. 6, p. 64-73, 1994.

MULFINGER, L.; SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

MULVIHILL, M. J.; LING, X. Y.; HENZIE, J.; YANG, P. Anisotropic etching of silver nanoparticles for plasmonic structures capable of single-particle SERS. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 1, p. 268-274, 2009.

MUZZARELLI, R. A. Carboxymethylated chitins and chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 1, p. 1-21, 1988.

MUZZARELLI, R. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995-1012, 2012.

MUZZARELLI, R. A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. N-(carboxymethylidene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. **Carbohydrate research**, v. 107, n. 2, p. 199-214, 1982.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. In: (Ed.). **Tissue engineering I**: Springer, 2005. p. 47-90.

NASCIMENTO, E. G. D.; SAMPAIO, T. B. M.; MEDEIROS, A. C.; AZEVEDO, E. P. D. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 460-465, 2009.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

NORBURY, W.; HERNDON, D. N.; TANKSLEY, J.; JESCHKE, M. G.; FINNERTY, C. C.; SOCIETY, S. S. C. O. T. S. I. Infection in burns. **Surgical infections**, v. 17, n. 2, p. 250-255, 2016.

NOVIKOV, I. V.; PIGALEVA, M. A.; ABRAMCHUK, S. S.; MOLCHANOV, V. S.; PHILIPPOVA, O. E.; GALLYAMOV, M. O. Chitosan composites with Ag nanoparticles formed in carbonic acid solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 103-112, 2018.

OGBA, O. M.; SELEKEOWEI, T.; OTU-BASSEY, I. Infection transmission potential of reusable phlebotomy tourniquet in selected health facilities in Calabar, Nigeria. **Eur J Pharm Med Res**, v. 3, n. 10, p. 96-100, 2016.

OGUZ, E. I.; HASANREISOGLU, U.; UCTASLI, S.; ÖZCAN, M.; KIYAN, M. Effect of various polymerization protocols on the cytotoxicity of conventional and self-adhesive resin-based luting cements. **Clinical oral investigations**, p. 1-10, 2019.

OMKARAM, I.; CHAKRADHAR, R. S.; RAO, J. L. EPR, optical, infrared and Raman studies of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions in polyvinylalcohol films. **Physica B: Condensed Matter**, v. 388, n. 1-2, p. 318-325, 2007.

ORGANIZATION, I. S. ISO 10993-5: 2009. Biological evaluation of medical devices–Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

PACIONI, N. L.; BORSARELLI, C. D.; REY, V.; VEGLIA, A. V. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles. In: (Ed.). **Silver nanoparticle applications**: Springer, 2015. p. 13-46.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PARK, M. V.; NEIGH, A. M.; VERMEULEN, J. P.; DE LA FONTEYNE, L. J.; VERHAREN, H. W.; BRIEDÉ, J. J.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-9817, 2011.

PARNKLANG, T.; LAMLUA, B.; GATEMALA, H.; THAMMACHAROEN, C.; KUIMALEE, S.; LOHWONGWATANA, B.; EKGASIT, S. Shape transformation of silver nanospheres to silver nanoplates induced by redox reaction of hydrogen peroxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 153, p. 127-134, 2015.

PEREIRA, R. F.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L.; BARTOLO, P. J. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 603-621, 2013.

PÉREZ-DÍAZ, M.; ALVARADO-GOMEZ, E.; MAGAÑA-AQUINO, M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; VELASQUILLO, C.; GONZALEZ, C.; GANEM-RONDERO, A.; MARTÍNEZ-CASTAÑON, G.; ZAVALA-ALONSO, N.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F. Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 317-323, 2016.

PIATKOWSKI, A.; DRUMMER, N.; ANDRIESEN, A.; ULRICH, D.; PALLUA, N. Randomized controlled single center study comparing a polyhexanide containing bio-cellulose dressing with silver sulfadiazine cream in partial-thickness dermal burns. **Burns**, v. 37, n. 5, p. 800-804, 2011.

PLETIKAPIĆ, G.; ŽUTIĆ, V.; VINKOVIĆ VRČEK, I.; SVETLIČIĆ, V. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 5, p. 309-317, 2012.

PRASHANTH, K. H.; THARANATHAN, R. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.

PRUITT JR, B. A.; LINDBERG, R.; MCMANUS, W.; MASON JR, A. Current approach to prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burned patients. **Reviews of infectious diseases**, v. 5, n. Supplement\_5, p. S889-S897, 1983.

PUŠKAR, T.; TRIFKOVIĆ, B.; ĐUROVIĆ-KOPRIVICA, D.; KOJIĆ, V.; JEVREMOVIĆ, A.; MIRKOVIĆ, S.; EGGBEER, D. In vitro cytotoxicity assessment of the 3D printed polymer based epoxy resin intended for use in dentistry. **Vojnosanitetski pregled**, v. 76, n. 5, p. 502-509, 2019.

RABBANI, F.; NEZHAD, M. R. H.; ABDOLLAHI, H. Useful multivariate kinetic analysis: Size determination based on cystein-induced aggregation of gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 588-594, 2013.

RAFFI, M.; HUSSAIN, F.; BHATTI, T.; AKHTER, J.; HAMEED, A.; HASAN, M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. **Journal of materials science and technology**, v. 24, n. 2, p. 192-196, 2008.

RAGONHA, A. C. O.; FERREIRA, E.; DE ANDRADE, D.; ROSSI, L. A. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 13, n. 4, p. 514-521, 2005.

RAJIV, S.; DRILLING, A.; BASSIOUNI, A.; HARDING, M.; JAMES, C.; ROBINSON, S.; MORATTI, S.; WORMALD, P. J. Chitosan Dextran gel as an anti adhesion agent in a postlaminectomy spinal sheep model. **J Clin Neurosci**, v. 40, p. 153-156, 2017.

RINEHART, S.; CAMPBELL, T.; BURKE, K.; GARCIA, B.; MLYNARSKI, A.; BRAIN, S.; TRUFFA, J.; RAGO, J.; CHURA, W.; KELEHER, J. Synthesis and characterization of a chitosan/PVA antimicrobial hydrogel nanocomposite for responsive wound management materials. **J. Microb. Biochem. Technol**, v. 8, p. 65-70, 2016.

RIVA, R.; RAGELLE, H.; DES RIEUX, A.; DUHEM, N.; JÉRÔME, C.; PRÉAT, V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. In: (Ed.). **Chitosan for biomaterials II**: Springer, 2011. p. 19-44.

RODDIE, M. E.; ADAM, A. Metallic stents in biliary disease. **Baillière's clinical gastroenterology**, v. 6, n. 2, p. 341-354, 1992.

RODKATE, N.; RUTNAKORNPITUK, M. Multi-responsive magnetic microsphere of poly (N-isopropylacrylamide)/carboxymethylchitosan hydrogel for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 251-259, 2016.

RODRIGUES, J. F. B.; OLIVEIRA, M. R. P.; FOOK, M. V. L.; BARBOSA, R. C.; SANTOS, K. O.; SILVA, R. N.; BARRETO, G. B. C.; SOARES, C. R. D. M. Silver Nanoprismas Production Optimization by Using Fatorial Design. **Biological and Chemical Research**, v. 3, n. 10, p. 8, 2016.

RODRIGUES, L. B. O. **Estudos reológicos e de textura dos géis de amido de araruta (Maranta arundinaceae L.) e dos géis adicionados de sacarose e concentrado protéico de soro**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB

ROJAS-ANDRADE, M.; CHO, A. T.; HU, P.; LEE, S. J.; DEMING, C. P.; SWEENEY, S. W.; SALTIKOV, C.; CHEN, S. Enhanced antimicrobial activity with faceted silver nanostructures. **Journal of materials science**, v. 50, n. 7, p. 2849-2858, 2015.

ROSA, P. D. F.; AGUIAR, M. L.; BERNARDO, A. Elimination of evaluation of bioaerosols in mesh filter modified with silver nanoparticles. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 747-752, 2016.

ROSKIES, M.; JORDAN, J. O.; FANG, D.; ABDALLAH, M.-N.; HIER, M. P.; MLYNAREK, A.; TAMIMI, F.; TRAN, S. D. Improving PEEK bioactivity for craniofacial reconstruction using a 3D printed scaffold embedded with mesenchymal stem cells. **Journal of biomaterials applications**, v. 31, n. 1, p. 132-139, 2016.

ROURKE, C.; BATES, C.; READ, R. Poor hospital infection control practice in venepuncture and use of tourniquets. **Journal of Hospital Infection**, v. 49, n. 1, p. 59-61, 2001.

SABAA, M. W.; ABDALLAH, H. M.; MOHAMED, N. A.; MOHAMED, R. R. Synthesis, characterization and application of biodegradable crosslinked carboxymethyl chitosan/poly (vinyl alcohol) clay nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 363-373, 2015.

SABAA, M. W.; MOHAMED, R. R.; ELTAWHEEL, S.; SEOUDI, R. S. Crosslinked poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl chitosan hydrogels for removal of metal ions and dyestuff from aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 6, p. 3459-3469, 2012.

SAIKIA, C.; GOGOI, P. Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. s4, 2015.

SAMAL, S. K.; CHIELLINI, F.; BARTOLI, C.; FERNANDES, E. G.; CHIELLINI, E. Hybrid Hydrogels Based on Poly (vinylalcohol)-Chitosan Blends and Relevant CNT Composites. In: (Ed.). **Hydrogels**: Springer, 2009. p. 67-78.

SÁMANO-VALENCIA, C.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F.; RUIZ, F.; TORO-VÁZQUEZ, J.; MORALES-RUEDA, J.; ESPINOSA-CRISTÓBAL, L.; ALONSO, N.; MARTÍNEZ, N. Characterization and biocompatibility of chitosan gels with silver and gold nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, p. 142, 2014.

SANTOS, J. V.; SOUZA, J.; AMARANTE, J.; FREITAS, A. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. **World J Surg**, v. 41, n. 8, p. 2006-2012, 2017.

SARAVANAN, M.; BARIK, S. K.; MUBARAKALI, D.; PRAKASH, P.; PUGAZHENDHI, A. Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 116, p. 221-226, 2018.

SERRE, C.; PAPILLARD, M.; CHAVASSIEUX, P.; VOEGEL, J.; BOIVIN, G. Influence of magnesium substitution on a collagen–apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials**, v. 42, n. 4, p. 626-633, 1998.

SEVERINO, R.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; FERRARI, G.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. **Journal of food engineering**, v. 124, p. 1-10, 2014.

SEVGI, M.; TOKLU, A.; VECCHIO, D.; HAMBLIN, M. **Topical antimicrobials for burn infections—an update. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 8: 161–197** 2013.

SHAH, D.; SAVALIYA, R.; PATEL, P.; KANSARA, K.; PANDYA, A.; DHAWAN, A.; SINGH, S. Curcumin Ag nanoconjugates for improved therapeutic effects in cancer. **International journal of nanomedicine**, v. 13, n. T-NANO 2014 Abstracts, p. 75, 2018.

SHANDIL, Y.; DAUTOO, U. K.; CHAUHAN, G. S. New glucosamine Schiff base grafted poly (acrylic acid) as efficient Cu<sup>2+</sup> ions adsorbent and antimicrobial agent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 5, p. 5970-5979, 2018.

SHI, Z.; TANG, J.; CHEN, L.; YAN, C.; TANVIR, S.; ANDERSON, W. A.; BERRY, R. M.; TAM, K. C. Enhanced colloidal stability and antibacterial performance of silver nanoparticles/cellulose nanocrystal hybrids. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 4, p. 603-611, 2015.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, n. 22, p. 225103, 2007.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. **Int J Biol Macromol**, v. 59, p. 46-58, 2013.

SIDDIQUI, M. R. H.; ADIL, S.; NOUR, K.; ASSAL, M.; AL-WARTHAN, A. Ionic liquid behavior and high thermal stability of silver chloride nanoparticles: synthesis and characterization. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 435-438, 2013.

SIGNINI, R.; MOREIRA, J. V. I.; DE SOUSA, R. B.; DE MORAIS, L. N.; BORBA, R. D.; XAVIER, G. R. Avaliação da adsorção de íons níquel (II) e cádmio (II) em Quitosana, Quitosana reticulada e carboximetilquitosana reticulada. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, 2019.

SINGH, H.; DU, J.; SINGH, P.; YI, T. H. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1. 4 and their antimicrobial application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2018.

SINGH, R.; CHACHARKAR, M. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. **Journal of tissue viability**, v. 20, n. 2, p. 49-54, 2011.

SMITH, J. N.; THOMAS, D. G.; JOLLEY, H.; KODALI, V. K.; LITCKE, M. H.; MUNUSAMY, P.; BAER, D. R.; GAFFREY, M. J.; THRALL, B. D.; TEEGUARDEN, J. G. All that is silver is not toxic: silver ion and particle kinetics reveals the role of silver ion aging and dosimetry on the toxicity of silver nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 15, n. 1, p. 47, 2018.

SNIMA, K.; JAYAKUMAR, R.; UNNIKISHNAN, A.; NAIR, S. V.; LAKSHMANAN, V.-K. O-Carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 1003-1007, 2012.

SOHRABI, S.; HAERI, A.; MAHBOUBI, A.; MORTAZAVI, A.; DADASHZADEH, S. Chitosan gel-embedded moxifloxacin niosomes: An efficient antimicrobial hybrid system for burn infection. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 625-33, 2016.

SOUSA, W. F. D. **Avaliação da centrifugação como método para separação granulométrica de nanopartículas de prata**. 2016. 9. Departamento de Pós-Graduação de Engenharia Química, Universidade de São Paulo

STAFFORD, W. F.; BRASWELL, E. H. Sedimentation velocity, multi-speed method for analyzing polydisperse solutions. **Biophysical chemistry**, v. 108, n. 1-3, p. 273-279, 2004.

STUCHI, L. A. R.; MENEZEZ, M. A.; GONÇALVES, N.; CIOFI-SILVA, C. L.; FARINA-JUNIOR, J. A.; GARCIA, R. A. Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 2010.

SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 65-108, 1987.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In: (Ed.). **Drug design and discovery**: Springer, 2011. p. 157-168.

TAMILSELVAN, S.; ASHOKKUMAR, T.; GOVINDARAJU, K. Microscopy based studies on the interaction of bio-based silver nanoparticles with Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis virus. **Journal of virological methods**, v. 242, p. 58-66, 2017.

TAN, S. C.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, n. 4, p. 713-719, 1998.

TAN, W.; LI, Q.; DONG, F.; WEI, L.; GUO, Z. Synthesis, characterization, and antifungal property of chitosan ammonium salts with halogens. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 293-298, 2016.

TAN, Z.; DINI, D.; Y BAENA, F. R.; FORTE, A. E. Composite hydrogel: A high fidelity soft tissue mimic for surgery. **Materials & Design**, v. 160, p. 886-894, 2018.

TANVIR, F.; YAQUB, A.; TANVIR, S.; ANDERSON, W. Poly-L-arginine coated silver nanoprisms and their anti-bacterial properties. **Nanomaterials**, v. 7, n. 10, p. 296, 2017.

TAŞKIRAN, F.; UZUNOĞLU, D.; ÖZER, A. BIOSYNTHESIS, CHARACTERISATION AND DETERMINATION OF ADSORBENT PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES WITH CYPRUS ACACIA (*Acacia cyanophylla*) LEAF EXTRACT. **Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi A-Uygulamalı Bilimler ve Mühendislik**, v. 18, n. 3, p. 733-745, 2017.

TEEGUARDEN, J. G.; HINDERLITER, P. M.; ORR, G.; THRALL, B. D.; POUNDS, J. G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. **Toxicological sciences**, v. 95, n. 2, p. 300-312, 2006.

TEJAMAYA, M.; RÖMER, I.; MERRIFIELD, R. C.; LEAD, J. R. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 13, p. 7011-7017, 2012.

TOMASZEWSKA, E.; SOLIWODA, K.; KADZIOLA, K.; TKACZ-SZCZESNA, B.; CELICHOWSKI, G.; CICHOMSKI, M.; SZMAJA, W.; GROBELNY, J. Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 60, 2013.

TOMAZ, A. F. Desenvolvimento de membrana de quitosana/1, 4 naftoquinona para liberação controlada: curativo para feridas oncológicas. 2017.

TOURI, M.; MOZTARZADEH, F.; OSMAN, N. A. A.; DEGHAN, M. M.; MOZAFARI, M. Optimisation and biological activities of bioceramic robocast scaffolds provided with an oxygen-releasing coating for bone tissue engineering applications. **Ceramics International**, 2018.

UBBINK, D. T.; VERMEULEN, H.; GOOSSENS, A.; KELNER, R. B.; SCHREUDER, S. M.; LUBBERS, M. J. Occlusive vs gauze dressings for local wound care in surgical patients: a randomized clinical trial. **Archives of Surgery**, v. 143, n. 10, p. 950-955, 2008.

ULLAH, I.; SHINWARI, Z. K.; KHALIL, A. T. Investigation of the cytotoxic and antileishmanial effects of *Fagonia indica* L. extract and extract mediated silver nanoparticles (AgNPs). **Pak J Bot**, v. 49, n. 4, p. 1561-1568, 2017.

ULLAH, K.; SOHAIL, M.; MURTAZA, G.; KHAN, S. A. Natural and synthetic materials based CMCh/PVA hydrogels for oxaliplatin delivery: Fabrication, characterization, In-Vitro and In-Vivo safety profiling. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 538-548, 2019.

UPADHYAYA, L.; SINGH, J.; AGARWAL, V.; TEWARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 452-66, 2013.

VALENCIA-SULLCA, C.; VARGAS, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 107-115, 2018.

VAN DONG, P.; HA, C. H.; KASBOHM, J. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 2, n. 1, p. 9, 2012.



VASINGTON, P.; PIERSMA, H.; CORBETT, J.; BITTLE, J. Cytotoxicity of rubber closures in tissue culture systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 56, n. 10, p. 1276-1279, 1967.

VELGOSOVÁ, O.; MRAŽÍKOVÁ, A.; MARCINČÁKOVÁ, R. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles. **Materials Letters**, v. 180, p. 336-339, 2016.

VENKATAPRASANNA, K.; PRAKASH, J.; VIGNESH, S.; BHARATH, G.; VENKATESAN, M.; BANAT, F.; SAHABUDEEN, S.; RAMACHANDRAN, S.; VENKATASUBBU, G. D. Fabrication of Chitosan/PVA/GO/CuO patch for potential wound healing application. **International journal of biological macromolecules**, 2019.

VERBELEN, J.; HOEKSEMA, H.; HEYNEMAN, A.; PIRAYESH, A.; MONSTREY, S. Aquacel® Ag dressing versus Acticoat™ dressing in partial thickness burns: a prospective, randomized, controlled study in 100 patients. Part 1: Burn wound healing. **Burns**, v. 40, n. 3, p. 416-427, 2014.

VERISSIMO, N. C.; GEILICH, B. M.; OLIVEIRA, H. G.; CARAM, R.; WEBSTER, T. J. Reducing *S. taphylococcus aureus* growth on Ti alloy nanostructured surfaces through the addition of Sn. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 103, n. 12, p. 3757-3763, 2015.

VIEIRA, A. L. G.; STOCCO, J. G. D.; RIBEIRO, A. C. G.; FRANTZ, C. V. Dressings used to prevent surgical site infection in the postoperative period of cardiac surgery: integrative review. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, 2018.

VIJAYAKUMAR, V.; SAMAL, S. K.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

VIMBELA, G. V.; NGO, S. M.; FRAZE, C.; YANG, L.; STOUT, D. A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 3941, 2017.

WAHID, F.; YIN, J.-J.; XUE, D.-D.; XUE, H.; LU, Y.-S.; ZHONG, C.; CHU, L.-Q. Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl Chitosan/ZnO nanocomposite hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 88, p. 273-279, 2016.

WAHID, F.; ZHOU, Y.-N.; WANG, H.-S.; WAN, T.; ZHONG, C.; CHU, L.-Q. Injectable self-healing carboxymethyl chitosan-zinc supramolecular hydrogels and their antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1233-1239, 2018.

WANG, C.; WONG, K. W.; WANG, Q.; ZHOU, Y.; TANG, C.; FAN, M.; MEI, J.; LAU, W.-M. Silver-nanoparticles-loaded chitosan foam as a flexible SERS substrate for active collecting analytes from both solid surface and solution. **Talanta**, v. 191, p. 241-247, 2019.

WANG, J.; SONG, S.; GAO, S.; MUCHAKAYALA, R.; LIU, R.; MA, Q. Mg-ion conducting gel polymer electrolyte membranes containing biodegradable chitosan: Preparation, structural, electrical and electrochemical properties. **Polymer Testing**, v. 62, p. 278-286, 2017.

WANG, W.; YU, Z.; ALSAMMARRAIE, F. K.; KONG, F.; LIN, M.; MUSTAPHA, A. Properties and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol-modified bacterial nanocellulose packaging films incorporated with silver nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105411, 2020.

WANG, Y.; BEEKMAN, J.; HEW, J.; JACKSON, S.; ISSLER-FISHER, A. C.; PARUNGAO, R.; LAJEVARDI, S. S.; LI, Z.; MAITZ, P. K. M. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 123, p. 3-17, 2018.

WEI, Y.; XIE, R.; LIN, Y.; XU, Y.; WANG, F.; LIANG, W.; ZHANG, J. Structure formation in pH-sensitive hydrogels composed of sodium caseinate and N, O-carboxymethyl chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 353-359, 2016.

WU, H.; ZHU, A.; YUAN, L. Interactions between O-carboxymethylchitosan and bovine serum albumin. **Materials Chemistry and Physics**, v. 112, n. 1, p. 41-46, 2008.

XIE, M.; WANG, J.; ZHAO, H. A PVA film for detecting lipid oxidation intended for food application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 273, p. 260-263, 2018.

XU, Q.; XIE, L.; DIAO, H.; LI, F.; ZHANG, Y.; FU, F.; LIU, X. Antibacterial cotton fabric with enhanced durability prepared using silver nanoparticles and carboxymethyl chitosan. **Carbohydr Polym**, v. 177, p. 187-193, 2017.

XU, T.; XIN, M.; LI, M.; HUANG, H.; ZHOU, S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N, N, N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 931-936, 2010.

YANG, L.-Q.; LAN, Y.-Q.; GUO, H.; CHENG, L.-Z.; FAN, J.-Z.; CAI, X.; ZHANG, L.-M.; CHEN, R.-F.; ZHOU, H.-S. Ophthalmic drug-loaded N, O-carboxymethyl chitosan hydrogels: synthesis, in vitro and in vivo evaluation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 12, p. 1625, 2010.

YIN, L.; FEI, L.; CUI, F.; TANG, C.; YIN, C. Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1258-1266, 2007.

YUAN, G.; LV, H.; TANG, W.; ZHANG, X.; SUN, H. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59, p. 818-823, 2016.

ZARZECKA, J.; FRĄCZEK, J.; SKÓRSKA-STANIA, A.; JELONEK, A.; CZOPIK, B.; MYCIŃSKI, P.; WRÓBEL, M. Cytotoxicity and proinflammatory cytokine expression in response to eluates of a ceramic-polymer composite biomaterial in cultured human hs-27 cells; possible application for bone regeneration. **Folia Biologica**, v. 66, n. 4, p. 159-164, 2018.

ZHAI, M.; XU, Y.; ZHOU, B.; JING, W. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. **J Photochem Photobiol B**, v. 180, p. 253-258, 2018.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; ZENG, G.; DONG, H.; CHEN, Y.; HUANG, C.; ZHU, Y.; XU, R.; CHENG, Y.; HOU, K. Multivariate relationships between microbial communities and environmental variables during co-composting of sewage sludge and agricultural waste in the presence of PVP-AgNPs. **Bioresource technology**, v. 261, p. 10-18, 2018.

ZHANG, Q.; FANG, J.; LIU, W.; ZHAO, Y.; HUANG, T.; CUI, J.; YANG, Y.; ZHOU, Z. Synthesis and characterization of poly (d, l-lactide-co-glycolide) modified by maleic anhydride and 1, 4-butanediamine. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 23, n. 5, p. 474-482, 2018.

ZHANG, Q.; HU, Y.; GUO, S.; GOEBL, J.; YIN, Y. Seeded growth of uniform Ag nanoplates with high aspect ratio and widely tunable surface plasmon bands. **Nano letters**, v. 10, n. 12, p. 5037-5042, 2010.

ZHANG, Q.; LI, N.; GOEBL, J.; LU, Z.; YIN, Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "magic" reagent? **J Am Chem Soc**, v. 133, n. 46, p. 18931-9, 2011.

ZHANG, Q.; LI, N.; GOEBL, J.; LU, Z.; YIN, Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "magic" reagent? **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 46, p. 18931-18939, 2011.

ZHANG, X.; CAI, W.; HAO, L.; ZHANG, W. In Situ Preparation and Properties of Poly (vinyl alcohol)/Carboxymethyl Chitosan/Cyanidin Hydrogel Films. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, 2019.

ZHAO, L.; XU, L.; MITOMO, H.; YOSHII, F. Synthesis of pH-sensitive PVP/CM-chitosan hydrogels with improved surface property by irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 3, p. 473-480, 2006.

ZHAO, X.; KATO, K.; FUKUMOTO, Y.; NAKAMAE, K. Synthesis of bioadhesive hydrogels from chitin derivatives. **International journal of adhesion and adhesives**, v. 21, n. 3, p. 227-232, 2001.

ZHENG, M.; HAN, B.; YANG, Y.; LIU, W. Synthesis, characterization and biological safety of O-carboxymethyl chitosan used to treat Sarcoma 180 tumor. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 231-238, 2011.

**APÊNDICE I – Desenvolvimento de modelo de calibração multivariada para  
determinação de polidispersividade e diâmetro de AgNPs utilizando  
espectroscopia UV-Vis e quimiometria**

**METODOLOGIA**

Para construção de um modelo de calibração robusto é necessário uma ampla faixa de variação das propriedades. Logo, visando a construção dos modelos de calibração multivariada, as quantidades de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) foram variados de acordo com as tabelas de 9 a 14. Essa variação resultou em um total de 43 amostras de NPs que adicionadas a síntese de 7 amostras preparadas nas condições padrões compreendendo um conjunto de 50 amostras.

Tabela 9 - Variações de volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Variável	Amostra	Varição
$\text{H}_2\text{O}_2$ (Volume - $\mu\text{L}$ )	H1	20
	H2	30
	H3	40
	H4	50
	H5	60
	H6	90
	H7	100
	H8	110
	H9	120
	H10	130
	H11	140
	H12	150

Tabela 10 - Variação da concentração de  $\text{NaBH}_4$ .

Variável	Amostra	Varição
$\text{NaBH}_4$ (Concentração - $\text{mmol.L}^{-1}$ )	B1	50
	B2	60
	B3	70
	B4	80
	B5	90
	B6	100
	B7	110
	B8	120

Tabela 11 - Variação do volume de  $\text{NaBH}_4$ .

Variável	Amostra	Varição
$\text{NABH}_4$ (Volume - $\mu\text{L}$ )	BV1	150
	BV2	200
	BV3	250

Tabela 12 - Variação de volume de  $\text{AgNO}_3$ .

Variável	Amostra	Varição
$\text{AgNO}_3$ (Volume - $\mu\text{L}$ )	A1	20
	A2	25
	A3	30
	A4	35
	A5	40
	A6	45

Tabela 13 - Variação do volume de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .

Variável	Amostra	Variação
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Volume - ml)	SV1	0,75
	SV2	1,00
	SV3	1,25
	SV4	1,50
	SV5	1,75
	SV6	2,00
	SV7	2,25
	SV8	2,50

Tabela 14 - Variação da concentração de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .

Variável	Amostra	Variação
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Concentração - $\text{mmol.L}^{-1}$ )	SC1	15
	SC2	20
	SC3	25
	SC4	30
	SC5	35
	SC6	40

Essas variações têm influência direta nas propriedades estudadas das AgNPs. Todas as nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por DLS e tiveram seus espectros UV-Vis registrados.

### Caracterização das AgNPs

Para as análises de DLS e espectroscopia UV-Vis foram utilizados os mesmos parâmetros citados na sessão **3.3 Caracterização das AgNPs**.

## **Construção e Validação dos Modelos**

Para etapa de construção e validação dos modelos quimiométricos foi utilizado o software The Unscrambler® v9.1 da CAMO Process A. para pré-processamento dos espectros e construção dos modelos PLS. Na etapa de seleção das amostras para os conjuntos calibração e predição foi utilizado o algoritmo SPXY executados onde utilizou do software Matlab®, versão 6.5.

### **Etapas para a construção dos modelos**

Nesta etapa, após a coleta dos espectros no UV-Vis se deu início a escolha da faixa de trabalho para a construção do modelo. Para tanto, após uma análise prévia dos espectros foi escolhido o intervalo entre 250 – 450 nm devido ruído existente no espectro completo, o qual influenciava de forma negativa a construção dos modelos multivariados.

Posteriormente, foi realizada a avaliação dos dados com relação à presença de amostras anômalas. Em seguida, foi feita a seleção dos conjuntos de calibração e predição do modelo por meio do algoritmo SPXY. Após isso, foram avaliados quais pré-tratamentos forneciam melhores modelos, baseados em parâmetro de validação como o erro médio quadrado de calibração RMSEC e predição RMSEP,  $r^2$ , correlação, bias, slope, offset e número de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo.

Os pré-tratamentos testados na construção do modelo foram: correção de linha de base, MSC, EMSC, SNV, derivadas, suavização e a combinação de alguns destes. Os modelos de predição foram construídos com base nos parâmetros avaliados na calibração. As etapas empregadas na construção dos modelos multivariados estão descritas no fluxograma apresentado na Figura 36.

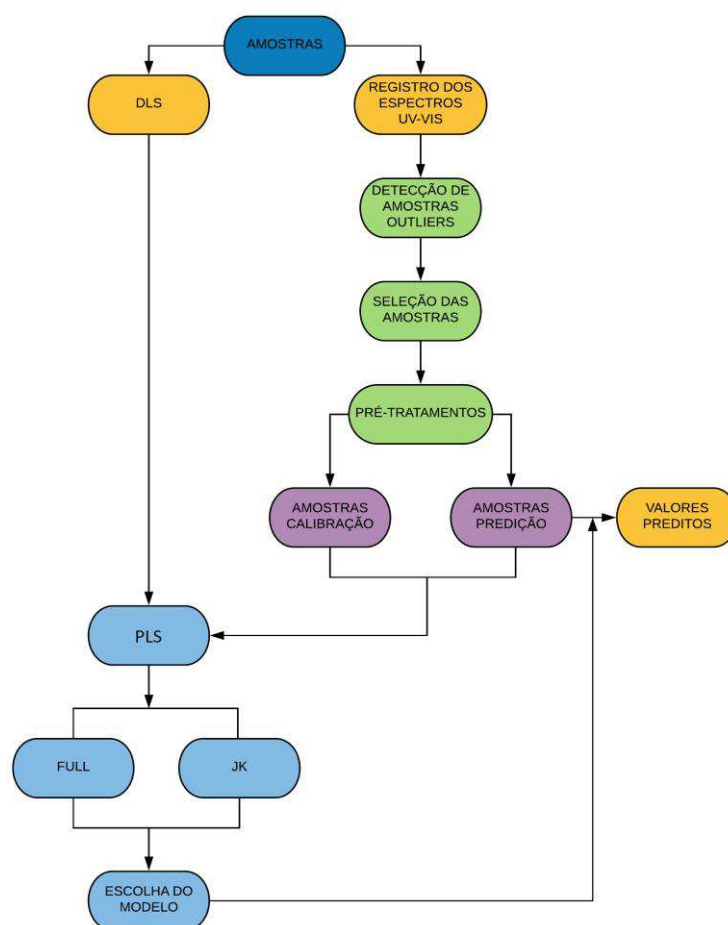


Figura 36 - Fluxograma das etapas para a construção dos modelos de calibração multivariada.

## RESULTADOS

### Amostras e valores de referência

Os métodos de calibração multivariada têm como finalidade desenvolver, a partir de dados instrumentais, modelos que possam prever com precisão as propriedades ou características das amostras. Portanto, é necessário que as amostras que irão compor o conjunto de calibração possuam uma variabilidade adequada da faixa dinâmica do parâmetro de estudo. Neste trabalho, foram sintetizadas 50 amostras, como descrito na metodologia, variando o diâmetro no intervalo de 26,38 nm a 71,19 nm e polidispersividade no intervalo de 0,021 a 0,472. As Figuras 37 e 38 ilustram a variabilidade das amostras em relação aos parâmetros estudados, respectivamente.



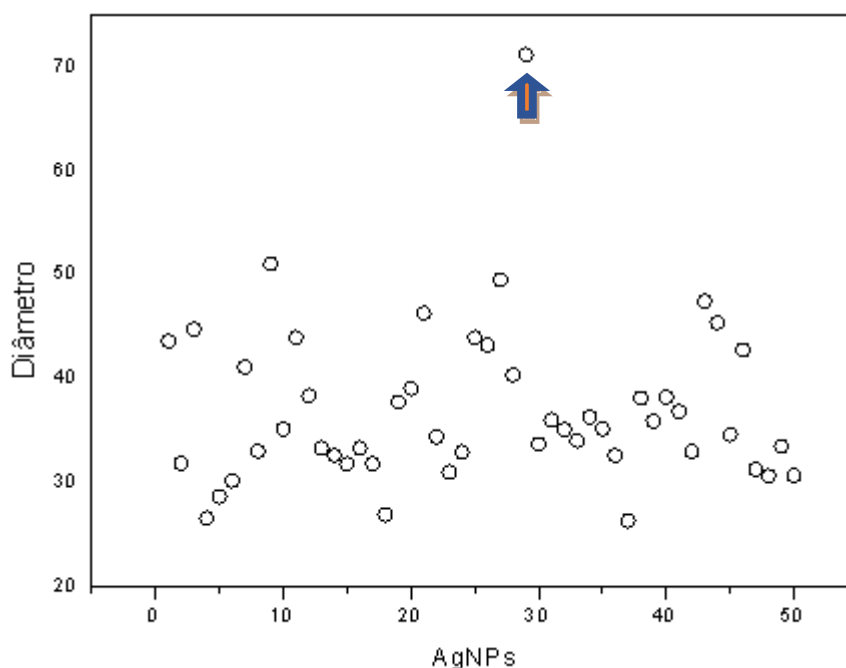


Figura 37 - Faixa de variação de diâmetro em relação as amostras.

De acordo com a Figura 37 apenas uma amostra apresenta diâmetro superior a 55nm, no entanto todas as amostras estão dentro dos valores de escala nanométricas, isto é de 1 a 100 nm.

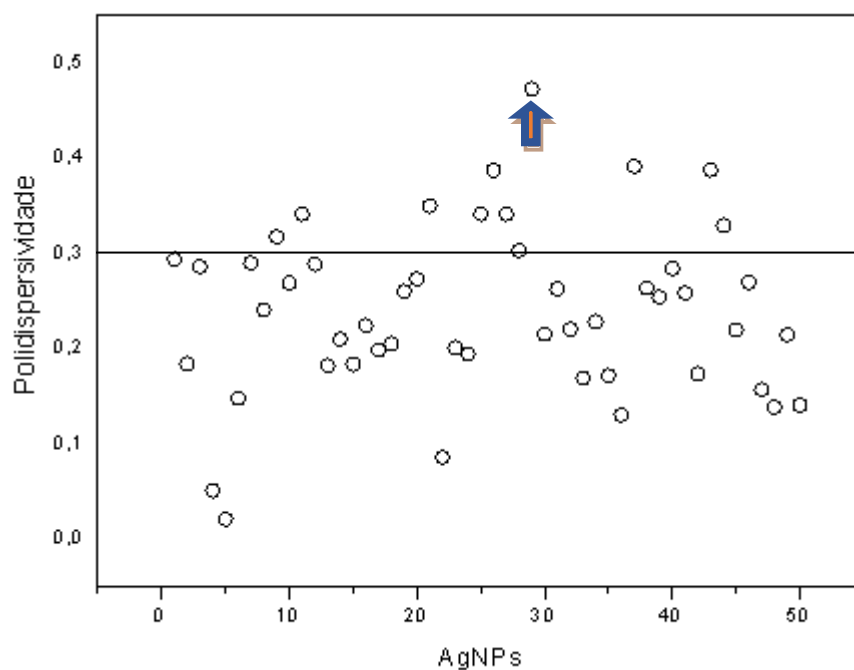


Figura 38 – Faixa de variação de Polidispersividade em relação as amostras.

De acordo com a figura 38, é observado que 40 amostras (80%) são monodispersas (<0,300). De acordo com a literatura, partículas com valores de

polidispersividade inferiores a 0,300 possuem tamanho aproximado. Já partículas com valores superiores a 0,300 apresentam tamanhos diversos e, deste modo, podem fornecer valores de referência pouco reprodutíveis (Li, N. *et al.*, 2012). No entanto, para ampliar a faixa de variação do parâmetro polidispersividade e evitar extrapolação do modelo, apenas a amostra destacada nas figuras 17 e 18 foi excluída da construção dos modelos.

### Construção dos modelos de calibração multivariada

Para construção de modelos de calibração multivariada faz-se necessário a definição da região espectral de trabalho, ou seja, a exclusão de regiões com alto ruído ou sinal “estourado”, para que se possa trabalhar com a região espectral com maior quantidade de informação. Isto é feito a partir da análise visual dos dados brutos (Figura 39). Esta análise visual também pode levar a identificação de espectros que se comportam de forma anômala, que podem, posteriormente, vir a ser excluídos do conjunto de dados. Essa análise prévia é realizada afim da obtenção de modelos mais robustos e precisos.

A Figura 39 apresenta os espectros UV-Vis, na faixa de 200 a 700 nm, de todas as amostras analisadas das AgNPs sem pré-tratamento.

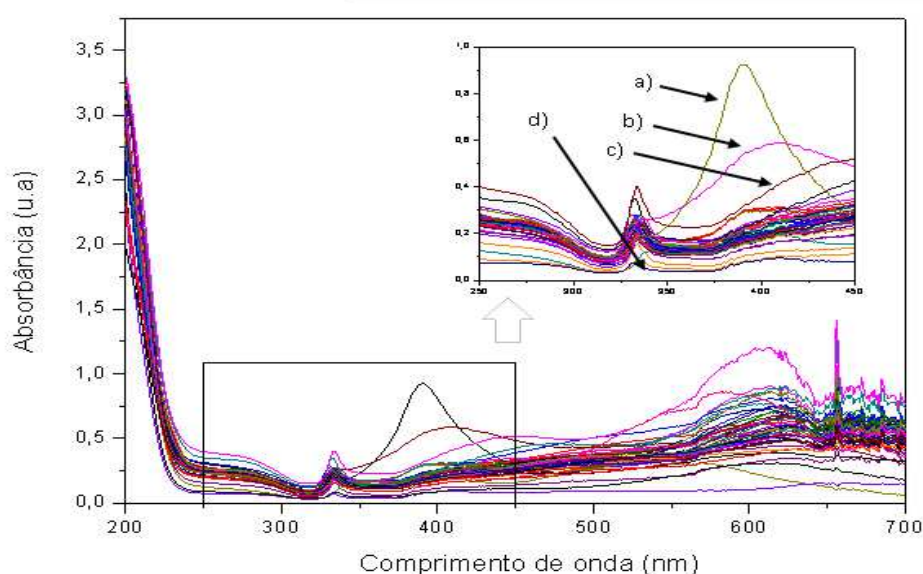


Figura 39 - Espectros das amostras de AgNPs, sem pré-tratamentos.

A partir da análise dos espectros percebeu-se que as regiões de 200 a 250 e de 450 a 700 nm são bastante ruidosas e possuem valores de absorvância superiores a 1,5 u.a (sinal “estourado”) os quais podem levar a construção de modelos pouco robustos e com baixo poder preditivo. Deste modo, a faixa espectral de trabalho utilizada foi de 250 a 450 nm, destacado na Figura 39. De acordo com a literatura esta é a região onde se localizam as bandas de absorção características das AgNPs (Mamatha *et al.*, 2017; Farooq *et al.*, 2018). A partir desta análise prévia, também foi possível detectar alguns espectros com comportamento anômalo, identificados como [a), b), c) e d)], que foram prontamente excluídas do conjunto de dados.

A fim de construir modelos robustos alguns pré-tratamentos espectrais foram testados para minimização de ruídos ou características espectrais que não estivessem relacionadas as propriedades de interesse. Neste trabalho foram testados MSC, EMSC, SNV, derivadas e a combinação dos mesmos. A escolha do melhor pré-tratamento foi realizada com base nos valores de RMSEC, RMSEP,  $r^2$ , correlação, bias, slope, offset e número de variáveis latentes utilizadas para a construção do modelo.

Para a determinação do diâmetro os modelos construídos com os dados brutos ou com primeira derivada com janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem (D1-J15-P2) apresentaram resultados comparáveis. Já para a determinação da polidispersividade o pré-tratamento primeira derivada com janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem (D1-J15-P2) apresentou o menor número de variáveis latentes utilizadas para a construção do modelo. No entanto, visando a implementação mais prática da metodologia desenvolvida como análise de rotina, iremos adotar como melhor pré-tratamento para os dois parâmetros de interesse a D1-J15-P2.

Os resultados, dos melhores pré-tratamentos, são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 - Pré-processamentos espectrais e figuras de mérito para diâmetro.

Pré- processamento	VL	Etap a	Figuras de Mérito (Diâmetro)					
			RMSE	Correlaçã o	R <sup>2</sup>	Slope	Offset	Bias
BRUTOS	5	Cal	2,6536	0,86351	0,745	0,745	9,27196	1,589E-
			7		6	6		06
		CV	3,5794	0,74199	0,567	0,636	13,3642	0,100216
			2		2	1	6	
MSC	3	Cal	2,9148	0,82616	0,682	0,682	11,5724	1.335E-
			2		5	5		06
		CV	3,4037	0,75630	0,595	0,624	13,6758	-0,003961
			3		5	7		
D1-J9-P2	5	Cal	2,5321	0,87202	0,760	0,760	8,73333	1,526E-
					4	4		06
		CV	3,7149	0,71566	0,518	0,630	13,5435	0,089278
					1	9		
D1-J15-P2	5	Cal	2,6677	0,866290	0,750	0,750	9,07296	-1,78E-06
					4	4	3	
		CV	3,6959	0,726852	0,537	0,639	13.2001	0,095595
					0	5	2	

**VL:** Variáveis Latentes; **Cal:** Etapa de Calibração; **CV:** Validação Cruzada; **D1-J9-POL2:** 1ª Derivada-Janela de 9 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem; **D1-J15-POL1:** 1ª Derivada-Janela de 15 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem.

Tabela 16 - Pré-processamentos espectrais e figuras de mérito para polidispersividade.

Figuras de Mérito (Polidispersividade)								
Pré-processamento	VL	Etapa	RMSE	Correlaçã o	R <sup>2</sup>	Slope	Offset	Bias
BRUTOS	6	Cal	0,0425	0,90370	0,816	0,816	0,044	-3.201E-09
			3		6	6	0	
		CV	0,0677	0,75013	0,564	0,679	0,082	0,005383
			1		0	5	4	
MSC	2	Cal	0,0571	0,81808	0,669	0,669	0,079	1,123E-08
			3		2	2	5	
		CV	0,0662	0,74849	0,582	0,615	0,093	0,000901
			9		1	3	3	
D1-J9-P2	5	Cal	0,0477	0,87671	0,768	0,768	0,055	9,837E-09
			9		6	6	6	
		CV	0,0738	0,69595	0,481	0,615	0,615	0,004114
			6		2	2	2	
D1-J15-P2	5	Cal	0,0485	0,87625	0,767	0,767	0,055	-8,731E-10
			6		8	8	3	10
		CV	0,0690	0,75132	0,559	0,700	0,074	0,003526
			6		2	8	7	

**VL:** Variáveis Latentes; **Cal:** Etapa de Calibração; **CV:** Validação Cruzada; **D1-J9-POL2:** 1ª Derivada-Janela de 9 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem; **D1-J15-POL1:** 1ª Derivada-Janela de 15 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem.

A Figura 40 ilustra os espectros UV-Vis das amostras de AgNPs com os pré-tratamentos utilizados para construção do modelo de diâmetro e polidispersividade (D1-J15-P2).

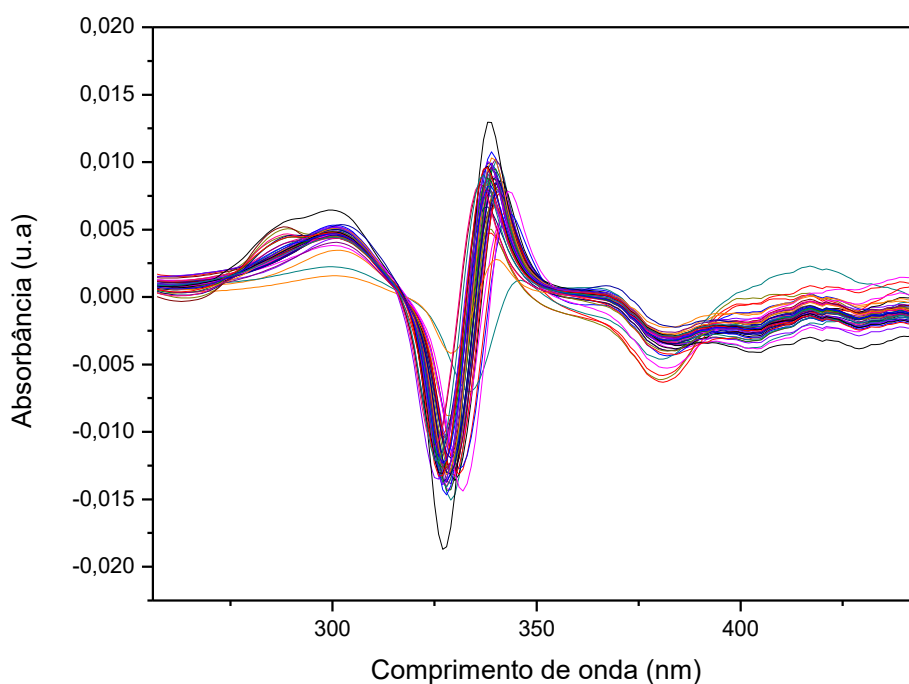


Figura 40 - Espectros das amostras de AgNps com pré-tratamentos (D1-J15-P2).

Antes de efetivamente se construir os modelos, um novo gráfico de influência foi construído com os dados pré-tratados (D1-J15-P2). A Figura 41 e 42 apresentam o gráfico de influência para polidispersividade e diâmetro, respectivamente.

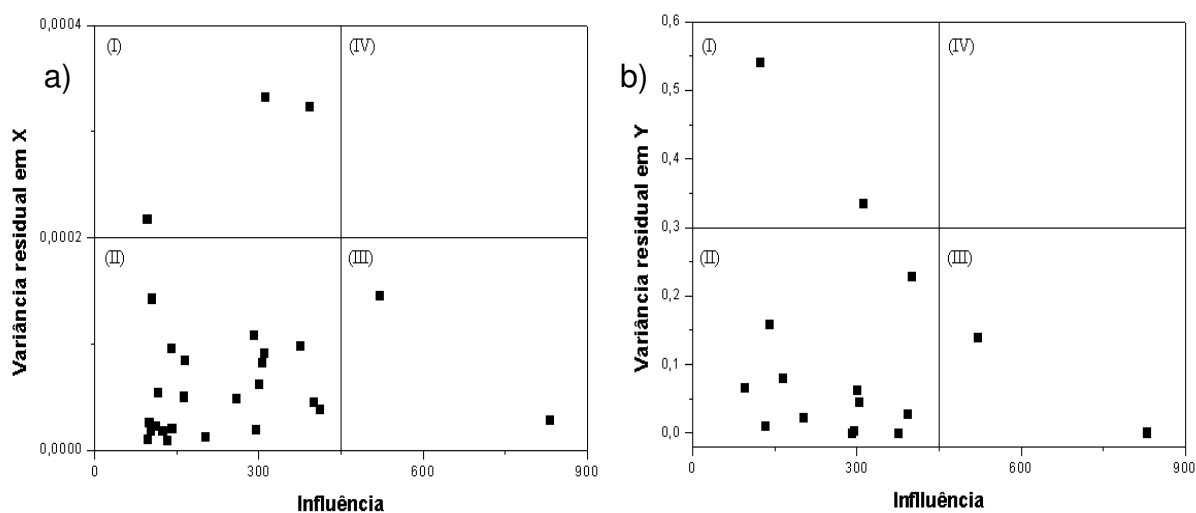


Figura 41 - Gráfico de Influência em (a) X, em (b) Y para polidispersividade.

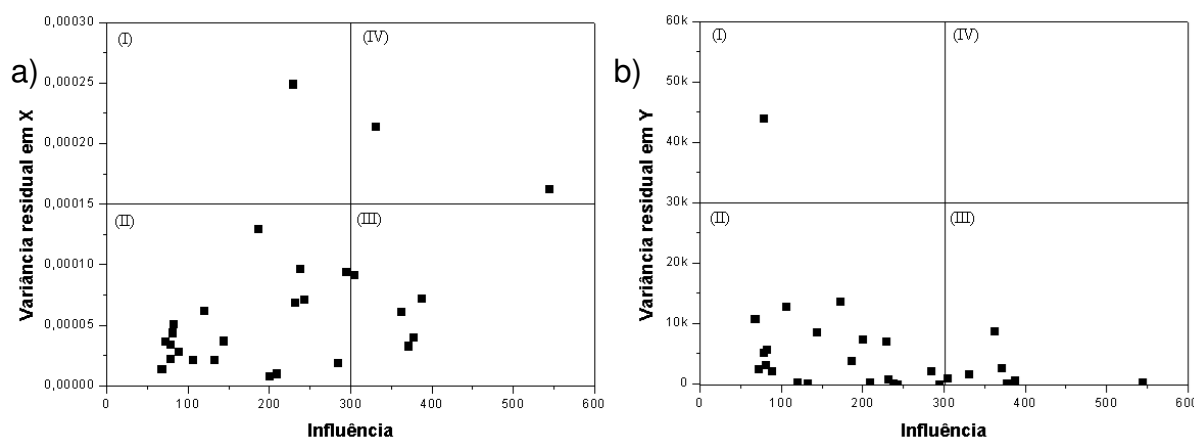


Figura 42 - Gráfico de Influência em (a) X, em (b) Y para diâmetro.

Pode-se observar que não existem amostras anômalas para o parâmetro polidispersividade. No entanto para diâmetro, duas amostras aparecem no quadrante IV em relação aos espectros (figura 42 a), mas não em relação ao valor de referência. Estas amostras não foram excluídas do modelo devido ao baixo valor de resíduo apresentado.

### Seleção dos conjuntos de calibração e predição

Outra etapa importante na construção de modelos de calibração multivariada é a seleção dos conjuntos de calibração e predição a qual foi realizada utilizando o algoritmo SPXY. Para sistemas complexos, em que existe pouca variação na sua concentração, o conjunto de calibração pequeno é capaz de contemplar a relação de variáveis latentes e a propriedade de interesse. No caso de amostras com uma maior complexidade, em que possuem uma porção maior de variação na concentração, o conjunto de calibração requer um maior número de amostras para contemplar a relação de variáveis latentes e a propriedade de interesse estabelecendo uma relação entre a complexidade do problema a ser resolvido e o número de amostras necessárias para o conjunto de calibração (Guimarães, 2017).

A fim de melhorar a performance dos modelos construídos, implementou-se o algoritmo Jack Knife para selecionar os coeficientes de regressão, pelo teste de incerteza de Martens, mais relacionados com os parâmetros estudados e com estes, logo, novos modelos PLS foram desenvolvidos. Os resultados obtidos para os novos modelos construídos são apresentados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Figuras de mérito para os modelos destinados a predição de diâmetro.

Figuras de mérito para Diâmetro									
Pré-processamento	Método	VL	Etapa	RMSE	Correlaçã o	r <sup>2</sup>	Slope	Offset	Bias
BRUTOS	-	6	Cal	2,653 6	0,8635	0,745 6	0,745 6	9,2719 6	1,589e- 06
			Pred.	5,666 6	0,5945	0,293 9	0,228 1	28,088 6	- 0,827481
BRUTOS	JK	4	Cal	3,016 7	0,8123	0,659 9	0,659 9	12,396	1,399e- 06
			Pred.	6,141 2	0,4381	0,170 7	0,154 4	30,880 9	- 0,794658
D1-J15-POL2	-	5	Cal	2,274 1	0,9057	0,820 4	0,820 4	6,5586	4,087e- 07
			Pred.	2,977 9	0,8369	0,713 6	0,777 2	8,1825	0,046155
D1-J15-POL2	JK	6	Cal	2,120 9	0,9185	0,843 7	0,843 7	5,7045	4,087e- 07
			Pred.	2,765 8	0,8916	0,758 6	0,628 2	13,745	0,206206

**.VL:** Variáveis Latentes; **Cal:** Etapa de Calibração; **CV:** Validação Cruzada; **D1-J9-POL2:** 1<sup>a</sup> Derivada-Janela de 9 Pontos-Polinômio de 2<sup>a</sup> Ordem; **D1-J15-POL1:** 1<sup>a</sup> Derivada-Janela de 15 Pontos-Polinômio de 2<sup>a</sup> Ordem. **JK:** coeficientes Jack-Knife.



Tabela 18 - Figuras de mérito para modelos destinados a predição de polidispersividade.

Figuras de mérito para Polidispersividade									
Pré-processamento	Método	VL	Etapa	RMSE	Correlação	r <sup>2</sup>	Slope	Offset	Bias
BRUTOS	-	6	Cal	0,04253	0,9037	0,816	0,8166	0,0440	-3,201e-09
			Pred.	0,040	0,8123	0,5766	0,86	0,0238	-0,008580
				37			57		
BRUTOS	JK	1	Cal	0,07827	0,6264	0,392	0,3923	0,1472	-9,013e-10
			Pred.	0,056	0,4721	0,1782	0,12	0,2088	-0,002418
				24			48		
D1-J15-POL2	-	6	Cal	0,03995	0,9226	0,851	0,8512	0,0358	8,506e-09
			Pred.	0,0572	0,8399	0,7141	0,79	0,0514	0,001871
				8			37		
D1-J15-POL2	JK	6	Cal	0,04110	0,9178	0,842	0,8425	0,0378	9,499e-09
			Pred.	0,0207	0,9295	0,8299	0,99	-0,004	-0,006023
				6			45		

**VL:** Variáveis Latentes; **Cal:** Etapa de Calibração; **CV:** Validação Cruzada; **D1-J9-POL2:** 1ª Derivada-Janela de 9 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem; **D1-J15-POL1:** 1ª Derivada-Janela de 15 Pontos-Polinômio de 2ª Ordem. **JK:** coeficientes Jack-Knife.

Analisando as figuras de mérito como RMSE, r<sup>2</sup> e número de variáveis utilizadas que descrevem a performance preditiva, o modelo D1-J15-POL2-JK foi confirmado como sendo o modelo mais adequado para a predição dos parâmetros de diâmetro e polidispersividade. Os modelos D1-J15-POL2 sem o coeficiente Jack-Knife apresentaram valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP comparáveis aos apresentados pelo modelo D1-J15-POL2-JK, no entanto, o primeiro apresenta um menor número de VL para a construção do modelo.

As Figuras 43 e 44 mostram os gráficos dos valores preditos pelo modelo versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro e polidispersividade, respectivamente, que demonstram a concordância do valor predito pelo modelo com os valores medidos pelo método de referência (DLS). Pode-se

observar a distribuição aleatória das amostras em torno da bissetriz, o que mostra que não há tendências nos resultados.

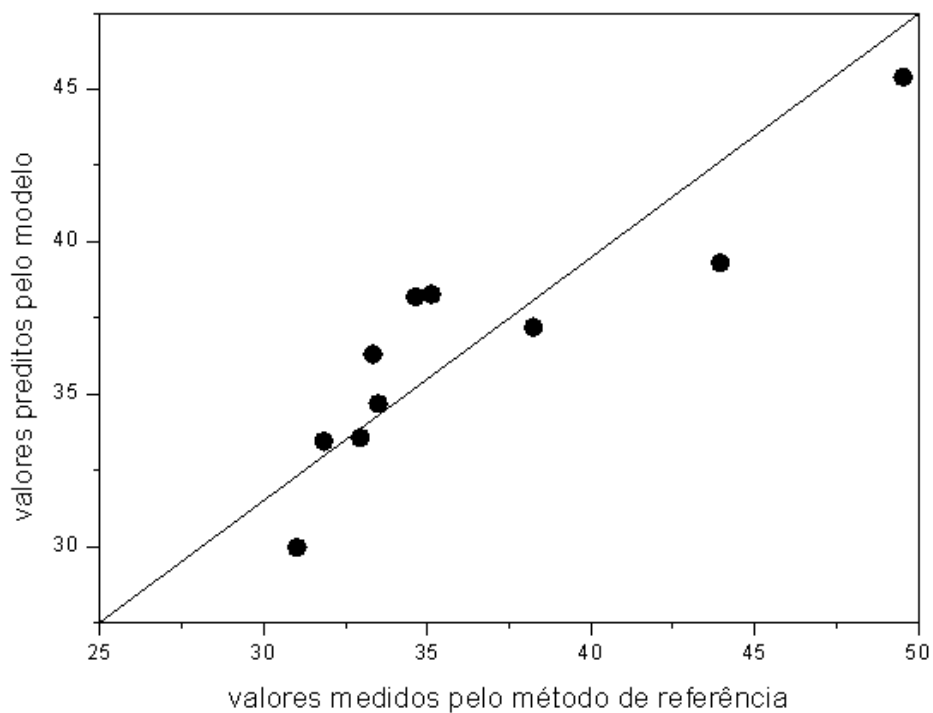


Figura 43 - Gráfico dos valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2 versus valores medidos pelo método de referência para o diâmetro.

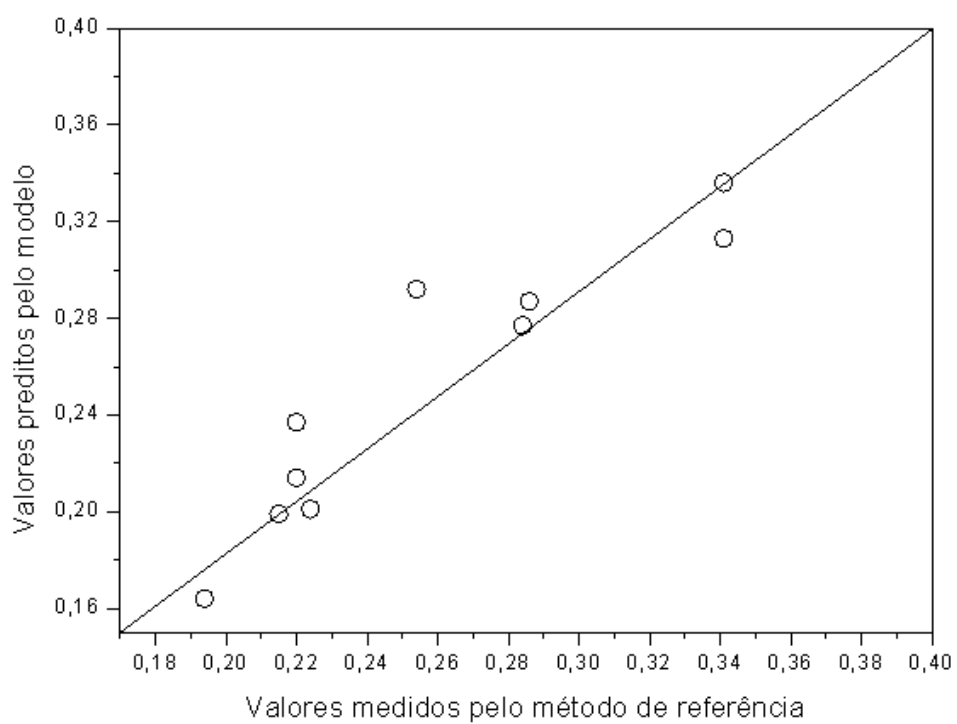


Figura 44 - Gráfico dos valores preditos pelo modelo D1-J15-POL2-JK versus valores medidos pelo método de referência para a polidispersividade.