

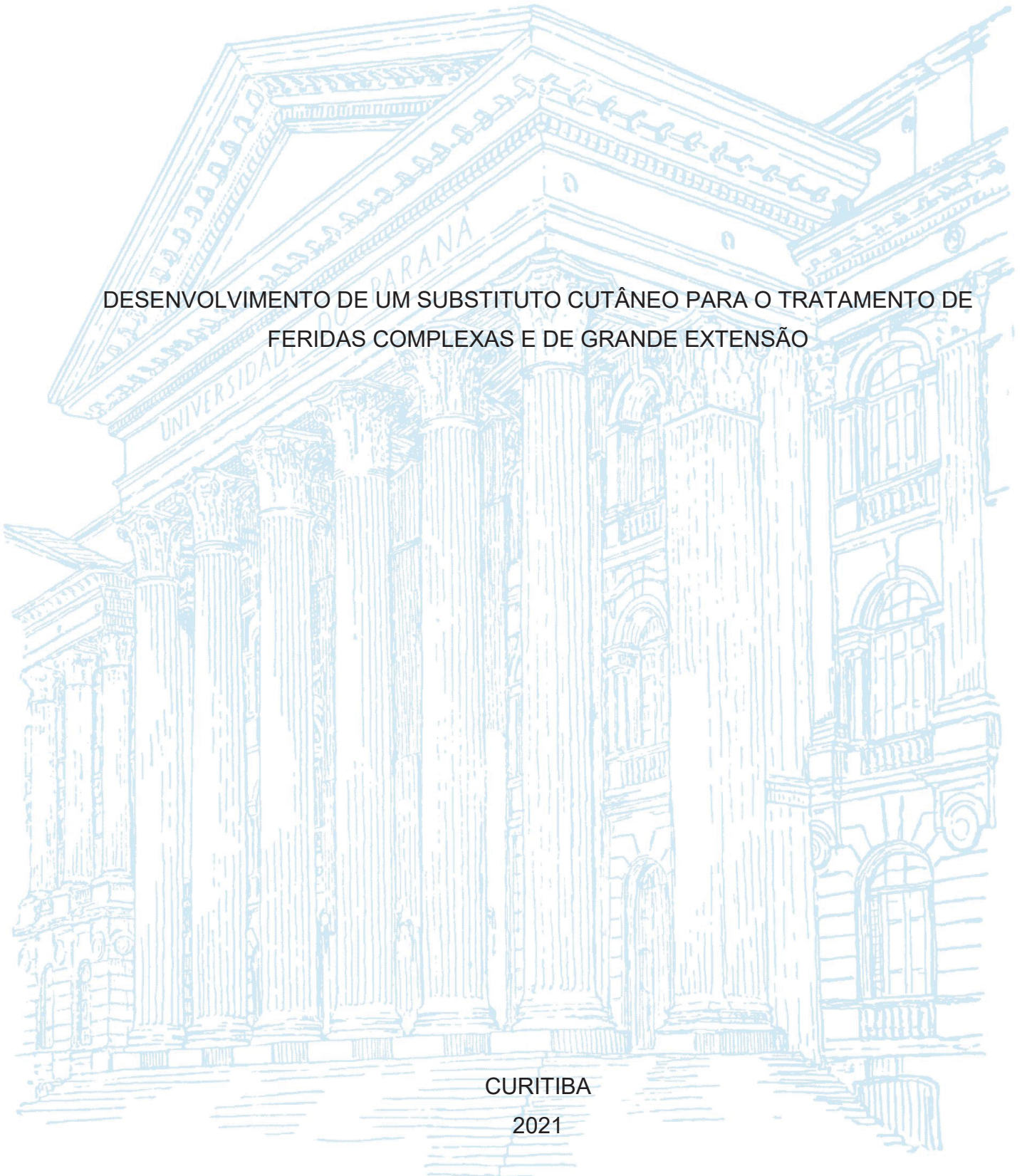
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELISSA MARQUES GONÇALVES

DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO CUTÂNEO PARA O TRATAMENTO DE
FERIDAS COMPLEXAS E DE GRANDE EXTENSÃO

CURITIBA

2021



MELISSA MARQUES GONÇALVES

DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO CUTÂNEO PARA O TRATAMENTO DE
FERIDAS COMPLEXAS E DE GRANDE EXTENSÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Florencio Maluf

CURITIBA

2021

Gonçalves, Melissa Marques

Desenvolvimento de um substituto cutâneo para o tratamento de feridas complexas e de grande extensão [recurso eletrônico] / Melissa Marques Gonçalves – Curitiba, 2021.

1 arquivo (112 p.):PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Florencio Maluf

1. Quitosana. 2. Nanofibras. 3. Nanotecnologia. 4. Fator 2 de crescimento de fibroblastos. 5. *Lavandula augustifolia*. I. Pontarolo, Roberto. II. Maluf, Daniela Florencio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MELISSA MARQUES GONÇALVES** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO CUTÂNEO PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS COMPLEXAS E DE GRANDE EXTENSÃO**, sob orientação do Prof. Dr. **ROBERTO PONTAROLO**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica
05/10/2021 21:28:55.0
ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/12/2021 06:16:13.0
JOSIANE DE FÁTIMA PADILHA DE PAULA
Avaliador Externo (UEPG)

Assinatura Eletrônica
08/10/2021 09:12:42.0
CYRO KETZER SAUL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
05/10/2021 15:53:05.0
RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao meu avô Otávio (*in memoriam*), meu maior incentivador.

À minha mãe, minha maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

Minha mais profunda gratidão à Profa. Dra. **Daniela Florencio Maluf**, ao Prof. Dr. **Roberto Pontarolo**, ao Prof. Dr. **Cyro Ketzer Saul**, ao Prof. Dr. **Yves Chevalier** e ao Prof. Dr. **Eyad Almouazen** pela orientação durante todos esses anos de doutorado. Agradeço por terem me ensinado a ser uma pessoa melhor profissional e pessoalmente. A vocês, todo o meu respeito e a minha eterna admiração.

Agradeço ao **Laboratório de Bioensaios de Segurança e Eficácia de Produtos Cosméticos**, ao **Centro de Estudos em Biofarmácia**, ao **Laboratório de Inovação Tecnológica em Sensores** e ao **Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique** por terem proporcionado a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica**, à **Central Analítica do Departamento de Farmácia**, ao **Laboratório Multiusuário do Departamento de Bioquímica**, ao **Laboratório de Biopolímeros** e ao **Laboratório de Controle de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica** pelo auxílio na caracterização dos *scaffolds* e das nanocápsulas de óleo essencial de lavanda.

Ao Me. **Allan Michael Junkert**, à Ma. **Amabily Bohn**, à Dra. **Jaqueline Carneiro**, ao Dr. **Guilherme Fadel Picheth**, à Dra. **Mariana Mazetto de Carvalho**, à Ma. **Lívia Májeda Adam**, ao Me. **Cassiano Pires**, à Ma. **Andressa Veiga** e ao Me. **Victor Concentino** pela ajuda na realização de diferentes experimentos.

À Profa. Dra. **Josiane de Fátima Padilha de Paula**, à Profa. Dra. **Raquel de Oliveira Vilhena** e ao Prof. Dr. **Cyro Ketzer Saul** pela participação na defesa desta tese e pela constante disponibilidade.

À **Universidade Federal do Paraná** pela oportunidade de me formar nesta importante instituição.

À **Université Claude Bernard Lyon1** pelo acolhimento.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pelas bolsas concedidas que me permitiram realizar muitos sonhos.

What I cannot create, I do not understand. (RICHARD FEYNMAN)

RESUMO

Substitutos cutâneos são materiais que mimetizam a pele, e assim, aceleram o processo de cicatrização. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um substituto cutâneo a partir de um *scaffold* de nanofibras de quitosana, poli(álcool vinílico) e glicerina e também produzir nanopartículas e nanocápsulas contendo ativos cicatrizantes para serem incorporadas no produto final. Os polímeros utilizados foram caracterizados (Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no Infravermelho e Cromatografia por Exclusão de Tamanho) e a concentração inibitória mínima da quitosana foi determinada utilizando a técnica de microdiluição. Foram preparados 96 *scaffolds* por eletrofiação utilizando planejamento fatorial 2^3 , para avaliar a influência das variáveis independentes na morfologia das nanofibras (variável dependente). As variáveis independentes foram quitosana bruta e purificada, poli(álcool vinílico) de duas marcas diferentes, dois calibres de agulha diferentes, baixa e alta concentração dos polímeros e da glicerina, solução final com e sem ultrafiltração. As nanofibras obtidas apresentaram diferentes estruturas e espessuras. A amostra NF67 (obtida com: 2% m/m de CS2, 7% m/m de PVA1, 0,25 g de glicerina, temperatura 22,5 °C, umidade 39%, vazão 28,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e tensão 14,0 kV) foi a que apresentou maior espessura média (268,3 nm), distribuição uniforme e alto rendimento. Nanopartículas de quitosana foram produzidas pelo método de gelificação ionotrópica, utilizando diferentes poliânions a fim de obter estruturas carregadas negativamente para aumentar a eficiência da encapsulação de proteínas carregadas positivamente, como o fator de crescimento fibroblástico básico. Partículas com diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de 123 nm e - 21 mV e 162 nm e - 29 mV foram obtidas como o uso do hexametáfosfato e do polifosfato, respectivamente. Nanocápsulas de óleo essencial de lavanda foram obtidas pelo método de nanoprecipitação, apresentando diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 250 nm, potencial zeta de - 32 mV, com eficiência de encapsulação de 43,51% e ausência de citotoxicidade. Portanto, foi produzido um substituto cutâneo polimérico antimicrobiano, que pode ter seu efeito cicatrizante potencializado com a adição das nanopartículas contendo fator de crescimento fibroblástico básico e das nanocápsulas contendo óleo essencial de lavanda.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanocarreadores. *Scaffold* polimérico. FGFb.
Lavandula angustifolia.

ABSTRACT

Skin substitutes are materials that mimic the skin, and thus accelerate the healing process. The objectives of this work were to develop a skin substitute from a nanofibrous scaffold of chitosan, poly(vinyl alcohol) and glycerin and to produce nanoparticles and nanocapsules containing healing actives to be incorporated into the final product. The polymers used were characterized (Nuclear Magnetic Resonance, Infrared Spectroscopy and Size Exclusion Chromatography) and the minimal inhibitory concentration activity of chitosan was determined using the microdilution technique. Were prepared 96 scaffolds by electrospinning using a 2^3 factorial design to assess the influence of independent variables on the morphology of nanofibers (dependent variable). The independent variables were crude and purified chitosan, poly(vinyl alcohol) of two different brands, two different needle sizes, low and high concentration of polymers and glycerin, final dispersion with and without ultrafiltration. The nanofibers obtained had different structures and thicknesses. The NF67 sample (obtained with: 2% m/m CS2, 7% m/m PVA1, 0.25 g glycerin, temperature 22.5 °C, humidity 39%, flow rate 28.5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and voltage 14.0 kV) had the largest average thickness (268.3 nm), uniform distribution and high yield. Chitosan nanoparticles were produced by the ionotropic gelling method, using different polyanions in order to obtain negatively charged structures to increase the encapsulation efficiency of positively charged proteins, such as basic fibroblast growth factor. Particles with hydrodynamic diameter and zeta potential of 123 nm and - 21 mV and 162 nm and - 29 mV were obtained using hexametaphosphate and polyphosphate, respectively. Lavender essential oil nanocapsules were obtained by the nanoprecipitation method, with a mean hydrodynamic diameter of approximately 250 nm, zeta potential of - 32, with an encapsulation efficiency of 43.51% and absence of cytotoxicity. Therefore, an antimicrobial polymeric skin substitute was produced, which can have its healing effect enhanced with the addition of basic fibroblast growth factor nanoparticles and lavender essential oil nanocapsules.

Keywords: Nanotechnology. Nanocarriers. Polymeric scaffold. bFGF. *Lavandula angustifolia*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PELE..... | 19 |
| FIGURA 2 - | ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA..... | 24 |
| FIGURA 3 - | ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)..... | 26 |
| FIGURA 4 - | TECIDO CONJUNTIVO FROUXO..... | 26 |
| FIGURA 5 - | EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO..... | 28 |
| FIGURA 6 - | TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA..... | 32 |
| FIGURA 7 - | TÉCNICA DE NANOPRECIPITAÇÃO..... | 33 |
| FIGURA 8 - | ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (PVA1 E PVA2) (Δ1.4-2.4 PPM) OBTIDO EM D ₂ O, 70 °C..... | 53 |
| FIGURA 9 - | ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (a) E DE RMN DE ¹³ C (b) DA QUITOSANA (CS ₂) OBTIDOS EM D ₂ O, 70 °C..... | 53 |
| FIGURA 10 - | ESPECTROS OBTIDOS POR FTIR PARA OS POLÍMEROS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS..... | 54 |
| FIGURA 11 - | IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | 58 |
| FIGURA 12 - | IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | 59 |
| FIGURA 13 - | IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | 59 |
| FIGURA 14 - | IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | 60 |

- FIGURA 15 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 60
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO
- FIGURA 16 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 61
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM
ULTRAFILTRAÇÃO.....
- FIGURA 17 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 61
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®),
GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM
ULTRAFILTRAÇÃO.....
- FIGURA 18 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 62
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO
- FIGURA 19 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 62
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM
ULTRAFILTRAÇÃO.....
- FIGURA 20 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 63
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO
- FIGURA 21 - IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 63
VARREDURA, DOS *SCAFFOLDS* DESENVOLVIDOS COM
QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA,
UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO

| | | |
|-------------|--|----|
| FIGURA 22 - | IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | 64 |
| FIGURA 23 - | IMAGEM DE NF83 OBTIDAS A PARTIR DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA..... | 68 |
| FIGURA 24 - | IMAGEM DE NF83 OBTIDA A PARTIR DE MICROSCOPIA CONFOCAL..... | 68 |
| FIGURA 25 - | SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA USANDO PCL, SPAN® 80 E TWEEN® 80 (mg)..... | 77 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|--------------|--|----|
| GRÁFICO 1 - | VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA <i>E. coli</i> | 56 |
| GRÁFICO 2 - | VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA <i>P. aeruginosa</i> | 56 |
| GRÁFICO 3 - | VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA <i>S. aureus</i> | 57 |
| GRÁFICO 4 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO OBTIDO POR DLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO PIROFOSFATO SOBRE A QUITOSANA. | 69 |
| GRÁFICO 5 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO OBTIDO POR DLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O PIROFOSFATO. | 69 |
| GRÁFICO 6 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO TRIFOSFATO SOBRE A QUITOSANA..... | 70 |
| GRÁFICO 7 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O TRIFOSFATO..... | 70 |
| GRÁFICO 8 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO HEXAMETAFOSFATO SOBRE A QUITOSANA..... | 72 |
| GRÁFICO 9 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O HEXAMETAFOSFATO..... | 72 |
| GRÁFICO 10 - | POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO POLIFOSFATO SOBRE A QUITOSANA..... | 73 |

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 11 - POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O POLIFOSFATO..... | 73 |
| GRÁFICO 12 - POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO ÁCIDO FÍTICO SOBRE A QUITOSANA..... | 74 |
| GRÁFICO 13 - POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O ÁCIDO FÍTICO..... | 74 |
| GRÁFICO 14 - VIABILIDADE CELULAR (%) DE CÉLULAS NIH-3T3 TRATADAS COM AS NANOCÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA..... | 78 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 - PRINCIPAIS SUBSTITUTOS CUTÂNEOS DISPONÍVEIS NO MERCADO..... | 22 |
| QUADRO 2 - SCAFFOLDS DE QUITOSANA, PVA E ASSOCIAÇÕES..... | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 38 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 2 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 39 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 3 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 39 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 4 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 40 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 5 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 40 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 6 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 41 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 MM E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 7 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O | 41 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |

| | | |
|-------------|--|----|
| TABELA 8 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 42 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH [®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 9 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 42 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH [®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 10 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 43 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC [®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 11 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 43 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC [®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E SEM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 12 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 44 |
| | DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC [®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 MM E COM ULTRAFILTRAÇÃO..... | |
| TABELA 13 - | FORMULAÇÕES DAS NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA..... | 45 |
| TABELA 14 - | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O | 49 |
| | DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA..... | |
| TABELA 15 - | VALORES DE M_w E M_n DETERMINADOS PARA PVA1 E PVA2 POR SEC..... | 55 |
| TABELA 16 - | ESPESSURA DAS NANOFIBRAS MEDIDAS EM QUINTUPLICATA POR IMAGEJ, ESPESSURAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES RELATIVOS CALCULADOS..... | 64 |
| TABELA 17 - | COEFICIENTES DA EQUAÇÃO E SIGNIFICÂNCIA DOS EFEITOS POR ANOVA..... | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

| | |
|----------|--|
| ANOVA | - Análise de Variância |
| ATCC | - <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATR | - Reflectância Total Atenuada |
| BSA | - Albumina de Soro Bovino |
| CIM | - Concentração Inibitória Mínima |
| CEB | - Centro de Estudos em Biofarmácia |
| CS1 | - Quitosana Purificada |
| CS2 | - Quitosana Sigma-Aldrich® |
| DLS | - Espalhamento de Luz Dinâmico |
| DO | - Densidade Óptica |
| EDC | - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| EE | - Eficiência de Encapsulação |
| EGF | - Fator de Crescimento Epidérmico |
| FGF | - Fator de Crescimento Fibroblástico |
| FGFb | - Fator de Crescimento Fibroblástico Básico |
| CLAE-DAD | - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diôdo |
| IVTF | - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier |
| LALLS | - Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo |
| LD | - Limite de Detecção |
| LQ | - Limite de Quantificação |
| MC | - Microscopia Confocal |
| MEV | - Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MFA | - Microscopia de Força Atômica |
| MTT | - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico |
| NC | - Nanocápsulas |
| NF | - Nanofibras |
| NHS | - N-hidroxisuccinimida |
| NIH 3T3 | - Fibroblastos embrionários de camundongo |
| OMS | - Organização Mundial da Saúde |
| PBS | - Tampão Fosfato Salino |
| PCL | - Policaprolactona |

| | |
|--------------|--|
| PDGF | - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas |
| pH | - Potencial Hidrogeniônico |
| PLGA | - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| PVA1 | - Poli(álcool vinílico) Sigma-Aldrich® |
| PVA2 | - Poli(álcool vinílico) Vetec® |
| PVC | - Poli(cloreto de vinila) |
| ppm | - Partes por Milhão |
| RMN | - Ressonância Magnética Nuclear |
| rpm | - Rotações por Minuto |
| RPMI | - Meio de cultura |
| SEC | - Cromatografia por Exclusão de Tamanho |
| SFB | - Soro Fetal Bovino |
| SUS | - Sistema Único de Saúde |
| TGF- β | - Fator de Transformação do Crescimento Beta |
| EUA | - Estados Unidos da América |
| VEGF | - Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

δ - Desvio químico

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 | JUSTIFICATIVA..... | 17 |
| 1.2 | OBJETIVOS..... | 17 |
| 1.2.1 | Objetivo geral..... | 17 |
| 1.2.2 | Objetivos específicos..... | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 19 |
| 2.1 | ESTRUTURA DA PELE..... | 19 |
| 2.2 | QUEIMADURAS..... | 20 |
| 2.3 | SUBSTITUTOS CUTÂNEOS..... | 21 |
| 2.4 | BIOMATERIAIS..... | 22 |
| 2.4.1 | Quitosana..... | 23 |
| 2.4.2 | Poli(álcool vinílico)..... | 25 |
| 2.5 | SCAFFOLDS..... | 26 |
| 2.6 | ELETROFIAÇÃO..... | 27 |
| 2.7 | NANOFIBRAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)..... | 29 |
| 2.8 | FATORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS EM SUBSTITUTOS CUTÂNEOS..... | 30 |
| 2.8.1 | Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)..... | 30 |
| 2.9 | GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA..... | 31 |
| 2.10 | UMA ALTERNATIVA AO USO DE FATORES DE CRESCIMENTO.. | 32 |
| 2.11 | NANOPRECIPITAÇÃO..... | 33 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.1 | MATERIAL E EQUIPAMENTOS..... | 34 |
| 3.2 | MÉTODOS..... | 35 |
| 3.2.1 | Purificação da Quitosana (CS2)..... | 35 |
| 3.2.2 | Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana Purificada (CS1)..... | 35 |
| 3.2.3 | Caracterização das Matérias-primas..... | 36 |
| 3.2.3.1 | Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS2)..... | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.3.2 | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS1 e CS2)..... | 36 |
| 3.2.3.3 | Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2)..... | 36 |
| 3.2.4 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Quitosana (CS2)..... | 37 |
| 3.2.5 | Desenvolvimento dos <i>Scaffolds</i> | 37 |
| 3.2.6 | Caracterização dos <i>Scaffolds</i> | 44 |
| 3.2.6.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 44 |
| 3.2.6.2 | Microscopia de Força Atômica (MFA)..... | 44 |
| 3.2.6.3 | Microscopia Confocal (MC)..... | 45 |
| 3.2.7 | Desenvolvimento das Nano e Micropartículas de Quitosana..... | 45 |
| 3.2.8 | Caracterização das Nano e Micropartículas de Quitosana..... | 47 |
| 3.2.9 | Desenvolvimento das Nanopartículas de Albumina de Soro Bovino (BSA)..... | 47 |
| 3.2.10 | Caracterização das Nanopartículas de Albumina de Soro Bovino (BSA)..... | 47 |
| 3.2.11 | Determinação da Eficiência da Encapsulação da Albumina do Soro Bovino (BSA) nas Nanopartículas..... | 48 |
| 3.2.12 | Desenvolvimento das Nanopartículas de Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)..... | 48 |
| 3.2.13 | Caracterização das Nanopartículas de Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)..... | 48 |
| 3.2.14 | Desenvolvimento das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda. | 48 |
| 3.2.15 | Caracterização das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda.... | 49 |
| 3.2.16 | Determinação da Eficiência da Encapsulação do Óleo Essencial de Lavanda nas Nanocápsulas..... | 50 |
| 3.2.17 | Avaliação da Citotoxicidade das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda..... | 50 |
| 4 | APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS..... | 52 |
| 4.1 | DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> | 52 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.1.1 | Purificação da Quitosana (CS2) e Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana Purificada (CS1)..... | 52 |
| 4.1.2 | Caracterização das Matérias-primas..... | 52 |
| 4.1.2.1 | Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS2)..... | 52 |
| 4.1.2.2 | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS1 e CS2)..... | 54 |
| 4.1.2.3 | Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2)..... | 55 |
| 4.1.2.4 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Quitosana (CS2)..... | 55 |
| 4.1.3 | Caracterização dos <i>Scaffolds</i> | 57 |
| 4.1.3.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 57 |
| 4.1.3.2 | Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Confocal (MC).. | 67 |
| 4.2 | DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA, CONTENDO ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) E FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (FGFb)... | 68 |
| 4.3 | DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.. | 75 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 79 |
| 5.1 | RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 80 |
| | REFERÊNCIAS | 81 |

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior e mais externo órgão do corpo humano. Em condições fisiológicas é autorrenovável e sua principal função é proteger o organismo contra a desidratação e a entrada de agentes agressores, sejam eles físicos, químicos ou biológicos. Mas, a perda de sua integridade compromete esta barreira (BROWN & HORSWILL, 2020; KOSEKI *et al.*, 2020; MORGADO, AGUIAR-RICARDO & CORREIA, 2015).

O processo de cicatrização inicia imediatamente após a ocorrência de uma lesão cutânea. No entanto, a inflamação, a perda de fluidos, infecções e outras complicações podem retardar ou não permitir tal processo (GRAÇA *et al.*, 2020). Por isso, feridas complexas e de grande extensão, como as queimaduras, necessitam de uma rápida e correta intervenção médica (SHEIKHOLESLAM *et al.*, 2020).

O atual padrão ouro para o tratamento dessas feridas é o enxerto autólogo de pele (pele do próprio indivíduo). No entanto, a quantidade de tecido existente no paciente é limitada. Então, os aloenxertos (pele de outro indivíduo da mesma espécie) são possíveis alternativas, mas seu uso oferece os mesmos riscos ao receptor que qualquer transplante e depende da disponibilidade de tecido em bancos de pele. Foram essas desvantagens que motivaram o desenvolvimento dos substitutos cutâneos (MORGADO, AGUIAR-RICARDO & CORREIA, 2015; SHEIKHOLESLAM *et al.*, 2020).

Substitutos cutâneos são materiais projetados para acelerar a cicatrização de feridas através da substituição da matriz extracelular da pele (DAI, SHIH & KHACHEMOUNE, 2018) e, a técnica de eletrofiação permite a obtenção de *scaffolds* de nanofibras que mimetizam a sua arquitetura (ANTUNES *et al.*, 2015; HONG *et al.*, 2019).

Outro importante componente dos substitutos cutâneos são os fatores de crescimento (GOODARZI *et al.*, 2018), que como são instáveis, são comumente encapsulados em nano e micropartículas a fim de melhorar a sua biodisponibilidade (KIM *et al.*, 2019). Substitutos cutâneos também podem conter células em sua composição (KHAN AA *et al.*, 2020).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um substituto cutâneo acelular através da obtenção de um *scaffold* polimérico por eletrofiação e de nanoestruturas contendo substâncias cicatrizantes.

1.1 JUSTIFICATIVA

As queimaduras constituem um dos tipos de lesões mais comuns em todo o mundo (SHPICHKA *et al.*, 2019). Representam um problema de saúde pública global e, segundo a Organização Mundial da Saúde, são responsáveis por cerca de cento e oitenta mil mortes a cada ano, que acontecem em sua maior parte em países de baixa e média renda, principalmente em ambientes domésticos com mulheres e crianças (OMS, 2021), sendo a principal causa de morbidade e mortalidade infantil (SOFIA & AMBARDEKAR, 2020).

No Brasil não há uma base de dados que contemple o perfil epidemiológico das vítimas de queimaduras, mas estima-se que ocorram aproximadamente dois milhões de casos por ano e que cem mil recebam atendimento hospitalar. Destes, dois mil e quinhentos vão a óbito. O Sistema Único de Saúde (SUS) destina cerca de cinquenta e cinco milhões de reais anualmente para o tratamento desses pacientes (DALLA-CORTE *et al.*, 2019). Mas, esses números já foram maiores (JESCHKE & HERNDON, 2014). As taxas de sucesso no tratamento de queimaduras aumentaram significativamente nas últimas décadas com o uso dos substitutos cutâneos (SHPICHKA *et al.*, 2019). Por este motivo, é necessário e urgente o desenvolvimento de novos produtos, sobretudo os de baixo custo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um substituto cutâneo para o tratamento de feridas complexas e de grande extensão a partir da obtenção de um *scaffold* de quitosana/poli(álcool vinílico)/glicerina por eletrofiação e de nanopartículas de fator de crescimento fibroblástico básico produzidas pela técnica de gelificação ionotrópica bem como nanocápsulas de óleo essencial de lavanda obtidas pela técnica de nanoprecipitação, que podem ser incorporadas no substituto cutâneo.

1.2.2 Objetivos específicos

Purificar a quitosana;

Caracterizar os polímeros utilizados;

Determinar a concentração inibitória mínima da quitosana;

Desenvolver e caracterizar *scaffolds* de quitosana/poli(álcool vinílico)/ glicerina;

Desenvolver e caracterizar as nano e micropartículas de quitosana;

Encapsular albumina de soro bovino nas nanopartículas selecionadas e caracterizá-las;

Determinar a eficiência da encapsulação da albumina de soro bovino nas nanopartículas de quitosana;

Encapsular fator de crescimento fibroblástico básico nas nanopartículas selecionadas;

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo óleo essencial de lavanda;

Determinar a eficiência da encapsulação do óleo essencial de lavanda nas nanocápsulas;

Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas de óleo essencial de lavanda com a maior eficiência de encapsulação em fibroblastos embrionários de camundongo.

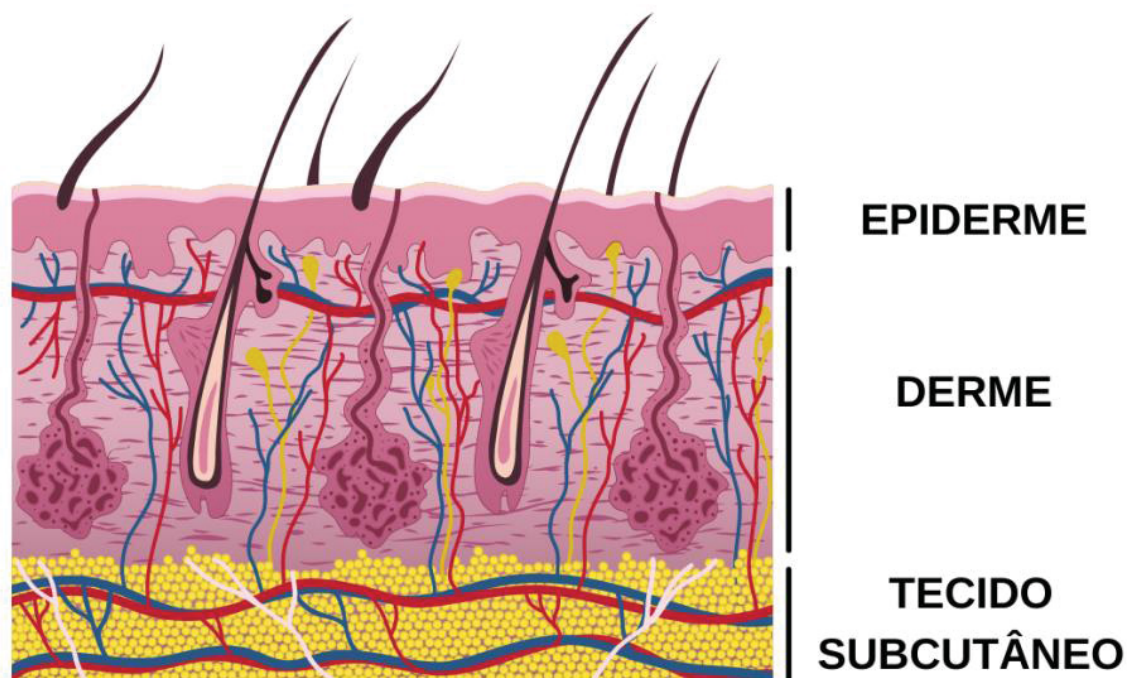
2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste texto serão discutidas as feridas complexas, das quais as queimaduras são as principais, abordados os substitutos cutâneos e suas técnicas de obtenção.

2.1 ESTRUTURA DA PELE

A pele é uma barreira fisiológica complexa que tem a função de manter a homeostase e proteger o organismo. Ela é composta por duas camadas: a epiderme (mais superficial) e a derme (mais profunda), nas quais estão inseridos seus apêndices (FIGURA 1). Se considerarmos os folículos pilosos e as glândulas sebáceas, a extensão da pele é de pelo menos 30 m², o que representa uma área superficial maior que a do intestino (BROWN & HORSWILL, 2020; DYRING-ANDERSEN *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2020).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PELE.



FONTE: A autora (2021).

A epiderme é subdividida em cinco camadas: estrato basal (camada mais interna), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (presente apenas na

pele da palma das mãos e da planta dos pés) e estrato córneo (camada mais externa). A principal célula de todas estas camadas é o queratinócito, que passa pelo processo de cornificação enquanto caminha do estrato basal até o estrato córneo, de onde é eliminado, como etapa final da diferenciação (GRICE & SEGRE, 2011; JIANG *et al.*, 2021; NGUYEN & SOULIKA, 2019; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A derme, por sua vez, pode ser subdividida em derme papilar (camada mais externa) e derme reticular (camada mais interna). Sua principal célula é o fibroblasto, que produz a matriz extracelular, composta principalmente por fibras de colágeno e elastina e glicosaminoglicanas, como o ácido hialurônico. A derme é a camada que contém os vasos sanguíneos, que suprem toda a pele com nutrientes e oxigênio (BOCHEVA, SLOMINSKI & SLOMINSKI, 2019; DAI, SHIH & KHACHEMOUNE, 2018; GOODARZI *et al.*, 2018).

2.2 QUEIMADURAS

As queimaduras são causadas por calor, frio, eletricidade, produtos químicos ou radiação e, a gravidade da lesão depende da duração e da intensidade da exposição ao agente causador. Elas ocasionam a perda da integridade da barreira cutânea e, por isso, trazem sérias consequências como dor, suscetibilidade à infecção e aumento da perda de fluidos corporais, o que pode resultar em desidratação e choque hipovolêmico, dependendo de sua extensão. As queimaduras podem ser classificadas em: primeiro grau quando estão limitadas à epiderme; segundo grau: quando destroem completamente a epiderme e atingem a derme; terceiro grau: quando destroem completamente a derme e atingem o tecido subcutâneo; quarto grau: quando se estendem aos músculos, ossos, tendões e podem exigir amputações (GREENHALGH, 2019; VIJAYAVENKATARAMAN, LU & FUH, 2016; WANG, ZHANG & LINEAWEAVER, 2020).

As queimaduras térmicas correspondem à maioria dos casos, sendo a escaldadura a causa mais comum em crianças menores de cinco anos e a exposição às chamas a principal causa no restante da população. A mortalidade dos pacientes queimados varia de acordo com o gênero, a idade, a área superficial total acometida, a presença de dano por inalação, comorbidades e traumas

concomitantes (DOMASZEWSKA-SZOSTEK *et al.*, 2021; GREENHALGH, 2019; TEMIZ *et al.*, 2020).

A recuperação das vítimas deste tipo de lesão melhorou muito, nas últimas décadas, graças à realização de enxertos cutâneos. Apesar disso, os enxertos autólogos e os aloenxertos apresentam limitações relativas à disponibilidade de tecido no paciente e nos bancos de pele, respectivamente. Então, os substitutos cutâneos são utilizados para compensar esta escassez (SHPICHKA *et al.*, 2019).

2.3 SUBSTITUTOS CUTÂNEOS

Substitutos cutâneos compreendem um grupo heterogêneo de materiais projetados para acelerar a cicatrização da pele através da substituição da matriz extracelular. Um substituto cutâneo “ideal” deve ser estruturalmente semelhante a uma pele de enxerto autólogo, podendo ser um produto acelular ou composto por células autólogas (do próprio paciente), alogênicas (de outro indivíduo da mesma espécie) ou xenogênicas (de origem animal) (DAI, SHIH & KHACHEMOUNE, 2018; KHAN AA *et al.*, 2020).

O objetivo dos substitutos cutâneos acelulares é, principalmente, fornecer uma barreira que evita a perda de fluidos e infecções. Geralmente, eles são compostos por biomateriais, mas também podem consistir em matriz extracelular descelularizada de cadáveres humanos ou animais. Já a inclusão de células nesses produtos promove a cicatrização por meio da produção de fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Alguns deles são baseados em células alogênicas obtidas do prepúcio de neonatos e outros em células oriundas de biópsias do próprio paciente (BELLO, FALABELLA & EAGLSTEIN, 2001; CHOCARRO-WRONA *et al.*, 2019).

No QUADRO 1 são apresentados alguns dos principais substitutos cutâneos disponíveis no mercado, divididos em dois grandes grupos: acelulares e celulares.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS SUBSTITUTOS CUTÂNEOS DISPONÍVEIS NO MERCADO.

| Nome | Composição | Referências |
|-------------------|---|--|
| Acelulares | | |
| Integra® | Colágeno bovino, glicosaminoglicanas (condroitina-6-sulfato) de tubarão e silicone | CHANG <i>et al.</i> , 2019 |
| Biobrane® | Membrana de silicone semipermeável ligada a uma malha de náilon revestida com colágeno tipo I suíno | FAN <i>et al.</i> , 2018 |
| MatriDerm® | Colágeno e elastina bovinos | KANG <i>et al.</i> , 2019 |
| MatriStem® | Matriz extracelular da bexiga urinária suína descelularizada | LIANG <i>et al.</i> , 2017 |
| OASIS® | Matriz extracelular da submucosa do intestino delgado suíno descelularizada | SHI & RONFARD, 2013 |
| Hyalomatrix® | HYAFF (derivado de ácido hialurônico) | ERBATUR, COBAN & AYDIN, 2012 |
| Hyalograft 3D® | Ácido hialurônico esterificado | GRONBACH <i>et al.</i> , 2020 |
| AlloDerm® | Matriz extracelular dérmica humana descelularizada | TAUFIQUE <i>et al.</i> , 2018 |
| GraftJacket® | Matriz extracelular dérmica humana descelularizada | JOHNSON <i>et al.</i> , 2020 |
| DermACELL® | Matriz extracelular dérmica humana descelularizada | STEIN <i>et al.</i> , 2020 |
| Celulares | | |
| Epifix® | Membrana corioamniótica humana desidratada | BIANCHI <i>et al.</i> , 2018 |
| Epicel® | Queratinócitos autólogos | DOMASZEWSKA-SZOSTEK <i>et al.</i> , 2021 |
| ReCell® | Fibroblastos, queratinócitos e melanócitos autólogos | DOMASZEWSKA-SZOSTEK <i>et al.</i> , 2021 |
| TransCyte® | Fibroblastos dérmicos alogênicos | AMANI, DOUGHERTY & BLOME-EBERWEIN, 2016 |
| Dermagraft® | Fibroblastos dérmicos alogênicos de prepúcio de neonatos | OMAR <i>et al.</i> , 2004 |
| Apligraf® | Fibroblastos e queratinócitos alogênicos de prepúcio de neonatos em colágeno tipo I bovino | ZAULYANOV & KIRSNER, 2007 |
| OrCel® | Fibroblastos e queratinócitos alogênicos em colágeno tipo I bovino | BELLO, FALABELLA & EAGLSTEIN, 2001 |
| Stratagraft® | Fibroblastos e queratinócitos alogênicos | CENTANNI <i>et al.</i> , 2001 |

FONTE: A autora (2021).

2.4 BIOMATERIAIS

Os biomateriais formam uma parte importante dos substitutos cutâneos. Eles compõem os *scaffolds* e têm como objetivo imitar as propriedades da matriz extracelular da pele, como a resistência oferecida pelo colágeno, a elasticidade pela elastina e a viscosidade e a hidratação pelos glicosaminoglicanos. Para isso, os polímeros são os mais utilizados e eles podem ter diversas origens (SHPICHKA *et al.*, 2019).

Polímeros naturais são amplamente utilizados na obtenção de substitutos cutâneos por serem biocompatíveis, biodegradáveis e semelhantes à matriz extracelular (ABDULGHANI & MITCHELL, 2019), o que permite a migração, o crescimento e a organização das células durante a cicatrização (HUANG & FU,

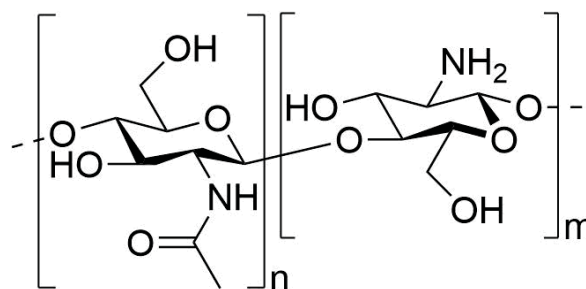
2010). Os mais comumente empregados são os polissacarídeos, sendo a quitosana um importante exemplo, uma vez que apresenta propriedades biológicas adicionais como atividade cicatrizante e antimicrobiana (MOGOȘANU & GRUMEZESCU, 2014).

No entanto, nanofibras de polímeros naturais e seus derivados são de difícil obtenção por causa das suas pobres propriedades mecânicas (MOGOȘANU & GRUMEZESCU, 2014). O caso da quitosana é ainda mais crítico porque as interações repulsivas entre as cargas positivas de sua cadeia fazem com que a viscosidade das soluções aquosas aumente dramaticamente com o aumento da concentração, dificultando o processo de eletrofiação e impedindo a formação de uma fibra contínua. Por esse motivo, altas concentrações de ácido são frequentemente usadas para obter uma solução com alta concentração de polímero, o que preocupa quanto à biocompatibilidade do produto final. Para resolver este problema, uma alternativa bastante utilizada é o desenvolvimento de blendas com polímeros sintéticos como o poli(álcool vinílico) (SUN, PERRY & SCHIFFMAN, 2019; FATHOLLAHIPOUR *et al.*, 2015; KOOSHA & MIRZADEH, 2015; GOUDARZIR, *et al.*, 2014).

2.4.1 Quitosana

Depois da celulose, o polissacarídeo mais abundante na natureza é a quitina, que é extraída majoritariamente do exoesqueleto de invertebrados marinhos. A partir da sua desacetilação alcalina é obtida a quitosana, que é um copolímero formado por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, como mostra a FIGURA 2. A porcentagem de unidades de D-glucosamina fornece o grau de desacetilação, que a partir de cerca de 50%, torna a molécula solúvel em meio ácido aquoso (KHAN F *et al.*, 2020; LOPEZ-MOYA, SUAREZ-FERNANDEZ & LOPEZ-LLORCA, 2019; MUXIKA *et al.*, 2017).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA.



FONTE: A autora (2021).

Em meio ácido ($\text{pH} < 6,5$), são protonados os grupos amino (pK_a 6,5) (WANG & HEUZEY, 2016) da cadeia do polímero que se tornam catiônicos. São essas cargas positivas as responsáveis pelas propriedades biológicas da quitosana e, conseqüentemente por suas aplicações biomédicas. Além disso, como a maioria das macromoléculas de origem natural, a quitosana é biocompatível, biodegradável e não antigênica. Por essas razões, é amplamente utilizada em sistemas de liberação de ativos e em engenharia de tecidos (ABD EL-HACK *et al.*, 2021; KOU, PETERS & MUCALO *et al.*, 2021; MALEKI DANA *et al.*, 2021; MUXIKA *et al.*, 2017).

A quitosana atua em várias fases do processo de cicatrização. Ela apresenta propriedades adesivas porque é capaz de se ligar às membranas celulares (carregadas negativamente) (SIVASHANKARI & PRABAHARAN, 2016) e, aumenta a liberação de citocinas e a infiltração de células inflamatórias, promovendo hemostase, angiogênese, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno e glicosaminoglicanas (ANTUNES *et al.*, 2015; ARCHANA *et al.*, 2015; ORYAN & SAHVIEH, 2017).

Ainda, a quitosana apresenta uma forte atividade e um largo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus bulgaricus*), Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterobacter aerogenes* e *Vibrio cholera*) e fungos (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis 24inéria*, *Rhizoctonia solani*, *Candida lambica*, *Phomopsis asparagi*) (ABD EL-HACK *et al.*, 2021; HOSSEINNEJAD & JAFARI, 2016; QIN & LI, 2020). Mas, a intensidade desta atividade varia de acordo com algumas propriedades físico-químicas, sendo principalmente: a) o pH do meio, tendo

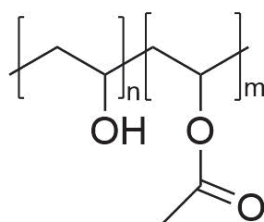
em vista que apenas abaixo de pH 6,5 a quitosana apresenta grupos amino livres (carregados positivamente), ou seja, grupos ativos; b) do grau de desacetilação, que afeta a densidade das cargas positivas, assim, quanto maior o grau de desacetilação, maior é a atividade; e, c) da massa molecular e da concentração do polímero, que não afetam somente a quantidade de grupos ativos disponíveis, mas também a viscosidade do meio, que por sua vez exerce influencia na atividade antimicrobiana dependendo do tipo de micro-organismo (ABD EL-HACK *et al.*, 2021; KONG *et al.*, 2010; PERINELLI, *et al.*, 2018).

São propostos vários mecanismos de ação para a atividade antimicrobiana da quitosana, sendo os principais: a) a quitosana, carregada positivamente, interage com a superfície dos micro-organismos, que esta carregada negativamente, levando ao aumento da permeabilidade da membrana e à lise celular; b) a quitosana, carregada positivamente, pode se ligar ao DNA, carregado negativamente, inibindo a síntese de RNA e proteínas dos micro-organismos; c) a quitosana inibe o crescimento microbiano através da quelação de nutrientes e metais essenciais; e, d) a quitosana forma uma membrana polimérica ao redor da célula, que bloqueia a passagem de nutrientes e oxigênio para os micro-organismos (HOSSEINNEJAD & JAFARI, 2016; MATICA *et al.*, 2019).

2.3.1 Poli(álcool vinílico)

O poli(álcool vinílico) (PVA) é um copolímero sintético de acetato de vinila e álcool vinílico (FIGURA 3), obtido a partir da hidrólise alcalina do poli(acetato de vinila). Geralmente, ele é classificado em dois grupos: parcialmente hidrolisado (obtido a partir da hidrólise incompleta, ainda apresentando monômeros de acetato de vinila) e totalmente hidrolisado (obtido a partir da hidrólise completa, apresentando apenas monômeros de álcool vinílico) (DeMERLIS & SCHONEKER, 2003; MALEKI, GHAREHAGHAJI & DIJKSTRA, 2013).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO).



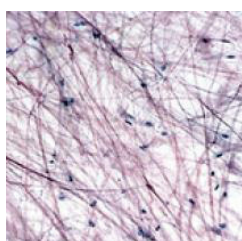
FONTE: A autora (2021).

O PVA tem sido muito utilizado na engenharia de tecidos devido à sua hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de desenvolver misturas poliméricas. Sua estrutura molecular é responsável por suas propriedades únicas, como natureza elástica, elevado grau de intumescimento em soluções aquosas e, participação em reações de reticulação, interagindo com outros polímeros, principalmente, por meio de ligações de hidrogênio, devido à presença do grande número de grupos hidroxila em sua cadeia (COZZOLINO *et al.*, 2012; KAVOOSI *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2010).

2.5 SCAFFOLDS

Scaffolds são estruturas porosas tridimensionais produzidas a partir de biomateriais para a engenharia de tecidos. Uma vez que eles mimetizam a matriz extracelular, eles estimulam respostas biológicas em nível molecular, ou seja, estimulam a fixação, a proliferação, a diferenciação e a organização das células. Como a matriz extracelular dos tecidos conjuntivos é formada por uma malha de proteína fibrosa (composta principalmente por colágeno e elastina) (FIGURA 4), os *scaffolds* são projetados para apresentarem uma morfologia semelhante (GOODARZI *et al.*, 2018; KHEIRJOU *et al.*, 2021; ROGINA, 2014).

FIGURA 4 – TECIDO CONJUNTIVO FROUXO.



FONTE: Adaptado de KIERSZENBAUM & TRES (2016).

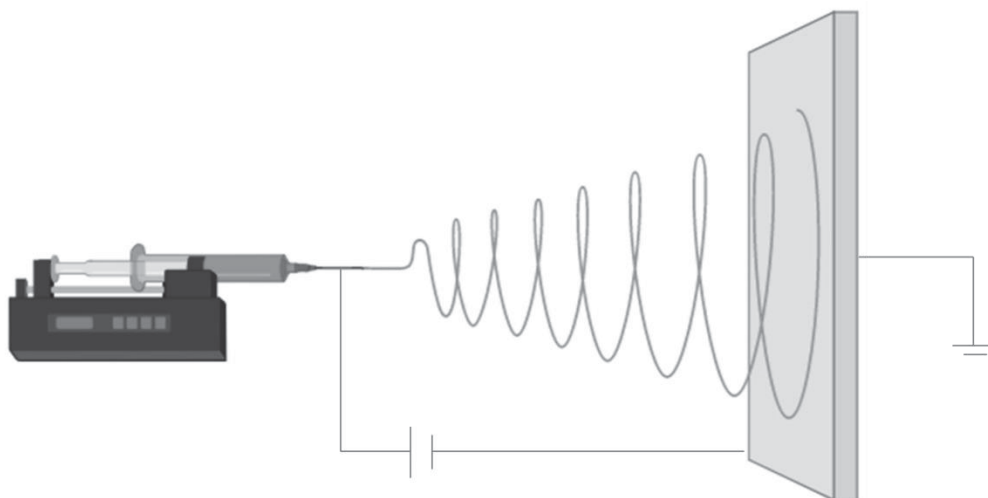
Diferentes tipos de *scaffolds* são descritos na literatura, mas a maior parte deles é composta por uma mistura de polímeros naturais e sintéticos. A superfície das suas nanofibras pode ser funcionalizada a fim de anexar moléculas, fármacos, fatores de crescimento e genes, que também podem ser encapsulados para serem liberados de forma controlada e apresentarem melhor biodisponibilidade (ABDULGHANI & MITCHELL, 2019; CHAUDHARI *et al.*, 2016).

Um dos maiores desafios da medicina regenerativa são as infecções bacterianas. Antibióticos sintéticos convencionais são usados para controlar estas infecções, mas o uso inapropriado destes fármacos pode levar à toxicidade e resistência bacteriana (WANG *et al.*, 2020). Por este motivo, a prevenção de infecções é um atributo importante para a escolha dos *scaffolds* e a demanda por *scaffolds* que apresentem atividade antimicrobiana é crescente (QIAN *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019).

2.6 ELETROFIAÇÃO

A técnica de eletrofiação ou “*electrospinning*” (FIGURA 5) é uma das mais utilizadas para a obtenção de *scaffolds* fibrosos na engenharia de tecidos porque ela é simples e barata se comparada à bioimpressão. Ela se baseia na aplicação de alta voltagem em uma agulha pela qual passa uma solução polimérica. Uma bomba acoplada à seringa permite que a solução polimérica flua e forme uma gota na ponta da agulha. As cargas elétricas se acumulam na superfície da gota até que uma voltagem crítica é atingida. Neste ponto, a repulsão eletrostática supera a tensão superficial e as forças viscoelásticas da solução polimérica, deformando a gota para um formato cônico, conhecido como cone de Taylor. Então, jatos líquidos eletrificados partem do ápice do cone de Taylor e são recolhidos como nanofibras em um coletor distante e com diferença de potencial (YU *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2019; MELE, 2020; ROGINA, 2014).

FIGURA 5 – EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO.



FONTE: A autora (2021).

Esta técnica apresenta muitas variáveis e, durante a sua execução, vários fatores precisam ser considerados, como parâmetros da solução, do procedimento e ambientais (DZIEMIDOWICZ *et al.*, 2021).

Os parâmetros da solução são: a) viscosidade, que precisa ser adequada para a formação de fibras espessas, contínuas e com alto rendimento (viscosidades muito altas ou muito baixas dificultam o processo de eletrospinning formando fibras com *beads* ou apenas partículas); b) tensão superficial, já que ela se opõe ao efeito da força elétrica, e assim, soluções com alta tensão superficial podem ser difíceis de eletrospinar, originando fibras com *beads* ou somente partículas; c) condutividade, uma vez que altos valores aumentam também as cargas na superfície da gota, facilitando a formação do cone de Taylor e do jato líquido (mas, valores de condutividade muito altos reduzem o diâmetro das nanofibras); e, d) volatilidade do solvente, que deve ser suficiente para evaporar antes da chegada das nanofibras ao coletor, a fim de evitar a formação de fibras fundidas e defeituosas (quando a evaporação é lenta), bem como de somente partículas (quando a evaporação é muito rápida) (CLEETON *et al.*, 2019; DZIEMIDOWICZ *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2021).

Os parâmetros do procedimento incluem: a) taxa de fluxo da solução, que se aumentada resulta em maiores diâmetros das nanofibras, uma vez que há uma quantidade maior de líquido sendo ejetada por unidade de tempo (mas, taxas de fluxo muito altas podem levar à evaporação incompleta do solvente e, conseqüentemente, à fibras defeituosas, enquanto que taxas de fluxo muito baixas podem resultar em fibras descontínuas); b) distância entre a ponta da agulha e o

coletor, que influencia a trajetória do jato carregado, reduzindo o diâmetro da nanofibra com o aumento da distância (se a distância for muito curta, o solvente não tem tempo de evaporar totalmente e fibras defeituosas são formadas, já se a distância for muito longa, o rendimento da deposição diminui, pois as fibras se depositam em outras superfícies antes de chegar ao coletor); e, 3) tensão aplicada, que deve ser alta o suficiente para promover a geração do cone de Taylor e garantir a ejeção estável do jato líquido (sem gotejamento), mas mantida abaixo de um certo limite para evitar instabilidades como a formação de múltiplos jatos (KEIROUZ *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2021).

Os parâmetros ambientais compreendem a temperatura e a umidade, que influenciam a viscosidade, a tensão superficial, a condutividade e a taxa de evaporação da solução. Temperaturas mais altas diminuem a viscosidade e a tensão superficial bem como aumentam a condutividade e a taxa de evaporação da solução. Por outro lado, a taxa de evaporação da solução é reduzida com o aumento da umidade (MOREIRA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2007).

2.7 NANOFIBRAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)

São encontrados na literatura muitos estudos que desenvolveram *scaffolds* de quitosana e PVA. No entanto, normalmente outros materiais são adicionados a fim de aumentar sua resistência mecânica (QUADRO 2). Há ainda autores que se valem de outras estratégias como a deposição de nanofibras de PVA separadamente das nanofibras de quitosana (ALI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019), dada a dificuldade em se obter fibras adequadas a partir desta mistura.

QUADRO 2 – SCAFFOLDS DE QUITOSANA, PVA E ASSOCIAÇÕES.

| Materiais Associados | Referências |
|--|---|
| Seda | FATHI <i>et al.</i> , 2020 |
| Kaolin | SALEHI <i>et al.</i> , 2020 |
| Nanotubos de Halosita | KOOSHA, RAOUFI & MORAVVEJ, 2019 |
| Nanobiovidro | CHEN <i>et al.</i> , 2019 |
| Policaprolactona (PCL) | GHOLIPOUR-KANANI, BAHRAMI & RABBANI, 2016 |
| Pectina | LIN (a) <i>et al.</i> , 2013 |
| Colágeno | LIN (b) <i>et al.</i> , 2013 |
| Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) | AJALLOUEIAN <i>et al.</i> , 2014 DUAN <i>et al.</i> , 2014 |
| Fibroína de Seda | ZHOU <i>et al.</i> , 2013 |

FONTE: A autora (2021).

Embora não existam relatos do desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana/PVA/glicerina até o momento, é possível que a glicerina reduza a hidrossolubilidade da blenda, resultado que observamos em estudo anterior (GONÇALVES *et al.*, 2020).

2.8 FATORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS EM SUBSTITUTOS CUTÂNEOS

Fatores de crescimento são moléculas que estimulam as células envolvidas na cicatrização da pele. A terapia com fatores de crescimento acelera esse processo e melhora os resultados funcionais e estéticos do tecido. Os mais importantes são (GOODARZI *et al.*, 2018; NICHOLAS, JESCHKE & AMINI-NIK, 2016):

- a) Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF): que aumenta a angiogênese, a migração e a proliferação celular;
- b) Fator de Crescimento Epidérmico (EGF): que aumenta a migração e a proliferação de fibroblastos e queratinócitos;
- c) Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β): que regula a migração, a proliferação e a diferenciação das células, além de aumentar a produção da matriz extracelular e atuar na modulação imunológica da pele (LICHTMAN, OTERO-VINAS & FALANGA, 2016);
- d) Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF): que produz angiogênese;
- e) Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF): que induz a produção da matriz extracelular.

2.8.1 Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) constituem uma grande família. Dentre eles, o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) ou fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) é particularmente utilizado porque modula a proliferação, a diferenciação, a migração e a sobrevivência de vários tipos de células além dos fibroblastos, como células endoteliais vasculares e de músculo liso, osteoblastos e condrócitos. A administração local de FGFb também reduz a fibrose

por meio da prevenção da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (GOODARZI *et al.*, 2018; KOIKE *et al.*, 2020).

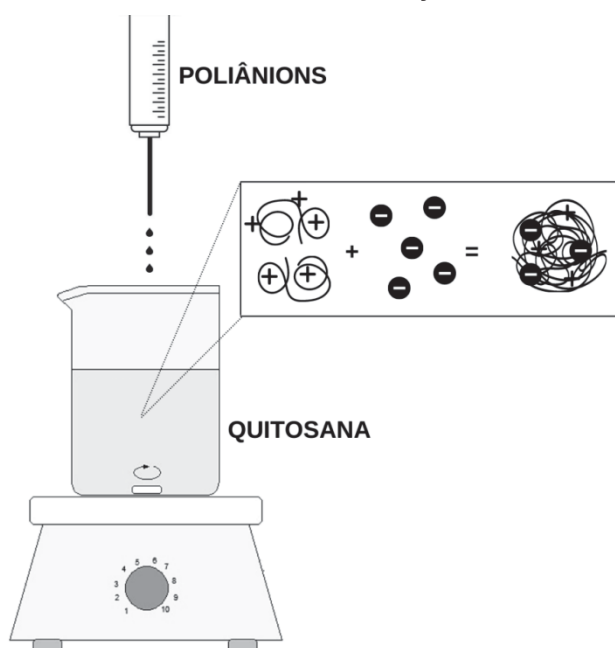
No entanto, o FGFb é suscetível ao calor e às enzimas proteolíticas. Sua meia-vida *in vivo* simulada a 37 °C e pH 7,4 é muito curta, sendo de aproximadamente 12 h (BENINGTON *et al.*, 2020; KINODA *et al.*, 2018). Portanto, a proteção do FGFb em sistemas de liberação, como as nanopartículas, é fundamental para garantir sua eficiência (ZHANG *et al.*, 2018).

2.9 GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA

Proposta por Calvo *et al.* (1997), a gelificação ionotrópica (FIGURA 6) é uma técnica simples que não requer solventes orgânicos nem altas temperaturas (PANT & NEGI, 2018), para a obtenção de nanopartículas de quitosana carregadas positivamente. Ela se baseia na interação eletrostática entre os grupos amino do polímero e poliânions, que por ser uma interação física e reversível, produz partículas biocompatíveis (ANTER *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2016).

Porém, nessas partículas, a eficiência da encapsulação de proteínas carregadas positivamente, como a albumina de soro bovino (BSA), é baixa (LI *et al.*, 2016). Outro problema é que partículas positivas interagem fortemente com os componentes do soro e sofrem rápida eliminação (WU *et al.*, 2017). Para superar essas limitações, modificações químicas da quitosana e revestimento das partículas são frequentemente utilizados (JAISWAL *et al.*, 2019; DU, *et al.*, 2019; BAY STIE *et al.*, 2019; CHEN & ZENG, 2018; HOSSEINI, SOLEIMANI & NIKKHAH, 2018; RAJA, KATAS & WEN, 2015), uma vez que partículas de quitosana e poliânions carregadas negativamente não são descritas na literatura.

FIGURA 6 – TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA.



FONTE: A autora (2021).

2.10 UMA ALTERNATIVA AO USO DE FATORES DE CRESCIMENTO

Embora os fatores de crescimento sejam excelentes promotores da cicatrização, eles apresentam um elevado custo. Assim, se faz necessária a avaliação do efeito cicatrizante de alternativas mais baratas. Muitos produtos naturais apresentam atividade cicatrizante (IBRAHIM *et al.*, 2018) e um exemplo é o óleo essencial de lavanda, que recentemente tem mostrado (*in vitro*) o aumento da expressão de colágeno e da atividade de proteínas envolvidas no processo de remodelação tecidual (SAMUELSON *et al.*, 2020; MORI *et al.*, 2016).

Óleos essenciais são misturas líquidas e complexas, predominantemente biossintetizados por plantas aromáticas e compostos por diterpenos, monotepenos e sesquiterpenos (CARVALHO, ESTEVINHO & SANTOS, 2016). A *Lavandula angustifolia* pertence à família Lamiaceae e é comumente conhecida como lavanda (IM *et al.*, 2019). As propriedades biológicas do óleo essencial de lavanda estão principalmente relacionadas à presença de linalol e acetato de linalil e, secundariamente, à presença de lavandulol, geraniol, acetato de bornil, borneol, terpineol e eucaliptol ou acetato de lavandulil (BIAŁOŃ *et al.*, 2019).

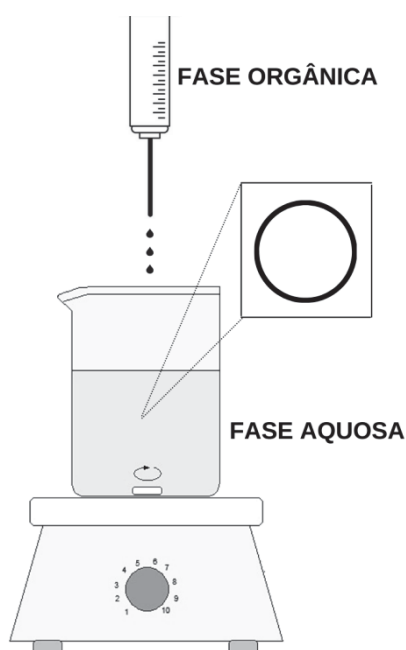
No entanto, óleos essenciais são voláteis (DRAĞ-ZALESIŃSKA *et al.*, 2019) e, a nanoencapsulação pode ser usada para evitar a perda dos seus compostos,

bem como para proteger contra a degradação e permitir sua liberação controlada (LOPES *et al.*, 2018). Devido a essas vantagens, as nanocápsulas são amplamente utilizadas em produtos de aplicação tópica (SALLAM & ELZOGHBY, 2018). Elas consistem em um núcleo oleoso envolto por uma camada polimérica (EPHREM *et al.*, 2014). A policaprolactona (PCL) está entre os polímeros mais aplicados em nanocarreadores (LOPES *et al.*, 2018) por ser biocompatível, biodegradável e de fácil fabricação (LEE *et al.*, 2017).

2.11 NANOPRECIPITAÇÃO

A nanoprecipitação (FIGURA 7) é uma técnica rápida e fácil utilizada para a produção de nanocápsulas contendo substâncias ativas hidrofóbicas. Ela foi proposta por Fessi *et al.*, 1989 e se baseia no gotejamento de uma fase orgânica, em que polímero e o ativo são solúveis, em uma fase aquosa que não solubiliza o polímero e o ativo, mas é miscível com a fase orgânica. Assim, quando a gota da fase orgânica cai sobre a fase aquosa, o solvente migra para a água, formando as nanocápsulas. Por este motivo, este método também é chamado de deslocamento do solvente ou deposição do polímero pré-formado. Todo esse processo é feito sob agitação magnética (LAMMARI *et al.*, 2020; MARTÍNEZ RIVAS *et al.*, 2017).

FIGURA 7 – TÉCNICA DE NANOPRECIPITAÇÃO.



FONTE: A autora (2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Ácido clorídrico, dimetilsulfóxido e glicerina foram obtidos da Synth[®]; álcool etílico absoluto 99,8% P.A. e acetona P.A. da Neon[®]; hidróxido de sódio P.A. e poli(álcool vinílico) (PVA2) com viscosidade (4% em água, 20 °C) de 40-48 mPas e 86,5-89,5% hidrolisado da Vetec[®]. Ácido acético glacial, quitosana de média massa molecular e 75-85% desacetilada, quitosana de baixa viscosidade, solventes deuterados, poli(álcool vinílico) (PVA1) de 146.000-186.000 g.mol⁻¹ e 99,3-100% hidrolisado, azida sódica, tampão fosfato salino pH 7,4, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), N-hidroxisuccinimida, rodamina, hexametáfosfato de sódio, hidrato de sal sódico de ácido fítico, pirofosfato de sódio tetrabásico deca-hidratado, polifosfato de sódio, trifosfato de sódio pentabásico, albumina de soro bovino, reagente de Bradford, Span 80[®], Tween 80[®], padrão de linalol (96%), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico, fosfato de potássio monobásico anidro P.A., fosfato de sódio dibásico anidro P.A., solução de penicilina (10.000 unidades) e estreptomicina (10 mg.mL⁻¹), soro fetal bovino, tripsina e meio RPMI 1640 foram comprados da Sigma-Aldrich[®]; membrana de copolímero acrílico com suporte não tecido e poro de 5 µm da Versapor[®]; membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm da Merck Millipore[®]; placa de 96 da Kasvi[®]; cloranfenicol, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) da Newprov[®]. Fator de Crescimento Fibroblástico Básico foi obtido da PeproTech[®]; óleo essencial de *Lavandula angustifolia* da WNF[®]; policaprolactona da Tai'na Health Chemical; acetonitrila 99,9+% da J.T.Baker[®]; fibroblastos embrionários de camundongo (NHI 3T3) do Banco de Células do Rio de Janeiro. Água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore) foi utilizada em todos os experimentos. Agitadores magnéticos (702, Fisatom[®] e RCT basic, IKA[®]); balança analítica (CY 224C, Aczet[®]); centrífuga (5810 R, Eppendorf[®]); ultracentrífuga (Optima MAX-XP, Beckman Coulter[®]); estufa de esterilização e secagem (GD110, Gigante[®]); titulador automático (T50, Mettler Toledo[®]); seringas de vidro (2,5 mL, Hamilton[®]); leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific[®]); espectrofotômetro (UV5, Mettler Toledo[®]); espectrômetro de ressonância magnética nuclear (AVANCE III 400 MHz, Bruker[®]); espectrômetro de infravermelho

com transformada de Fourier (Alpha-P, Bruker[®]); detector (Viscotek 270, Malvern[®]) com coluna (Ohpak SB-806M HQ, Shodex[®]) e refratômetro UV/Vis (VE 3210, Malvern[®]); microscópio confocal (A1MP+, NIKON[®]); microscópio de força atômica (5500, Agilent[®]) com cantilever (NSC14-AIBS, Mikromasch[®]); microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360-LV, JEOL[®]); zetasizer (Nano ZS, Malvern[®]); mastersizer (3000, Malvern[®]); analisador de tamanho de partículas (NANODLS, Brookhaven[®]); analisador de carga de partículas (Particle Metrix, Stabino[®]) e sistema de CLAE-DAD (1100 series, Agilent[®]) com coluna (Zorbax[®] Eclipse XDB-C18 (4.6x150 mm, 5 µm), Agilent[®]) também foram utilizados.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Purificação da Quitosana (CS2)

Para a purificação 5 g de quitosana foram pesados e dispersos em 1 L de solução de ácido acético glacial 0,5 mol.L⁻¹. Esse sistema foi mantido sob agitação magnética por 24 h. Após esse período, a solução obtida foi centrifugada a 3220 g e 40 °C por 1 h. Então, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi alcalinizado com solução de hidróxido de sódio 10 mol.L⁻¹ até pH ~ 9. A alcalinização ocasionou a precipitação do polímero, que foi lavado a vácuo com água ultrapura, depois com álcool etílico absoluto e seco em estufa a 60 °C até peso constante. O mesmo procedimento foi repetido três vezes e assim a quitosana purificada (CS1) foi obtida (LUBAMBO *et al.*, 2013; RECILLAS *et al.*, 2009).

3.2.2 Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana Purificada (CS1)

O grau de desacetilação da quitosana purificada (CS1) foi determinado pelo método clássico de titulação potenciométrica proposto por Broussignac. Para isso, 100 mg da quitosana purificada foram pesados e solubilizados em 20 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹. Esse sistema foi mantido sob agitação magnética por 24 h. Após esse período, essa solução foi titulada em titulador automático com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹. Então, foi obtida uma curva com dois pontos de inflexão. O grau de desacetilação da quitosana foi determinado através da equação:

$$\% NH_2 = 16.1 (V_2 - V_1) \times Mb/W$$

em que, V1 e V2 são os volumes (mL) referentes ao primeiro e ao segundo ponto de inflexão, respectivamente; Mb é a concentração do NaOH e W é a massa (g) do polímero (WESKA *et al.*, 2006).

3.2.3 Caracterização das Matérias-primas

3.2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS2)

Os experimentos de RMN foram realizados a 70 °C usando um espectrômetro equipado com uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm. As frequências base foram 400,13 e 100,63 MHz para os núcleos ^{13}C e ^1H , respectivamente. Os hidrogênios das amostras foram trocados por deutério, para não interferirem nos espectros, por etapas sucessivas de liofilização em D_2O (99,9%) antes da dissolução da amostra nos solventes indicados. Os desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e acetona foi usada como o padrão interno para espectros de RMN de ^{13}C (30,2 ppm) e RMN de ^1H (2,224 ppm), juntamente com os solventes indicados.

3.2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS1 e CS2)

A identidade dos polímeros foi confirmada por IVTF, no modo de transmitância, utilizando a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) e as seguintes condições: 24 *scans*, resolução de 4 cm^{-1} e faixa espectral de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Para isso, os polímeros foram dispersos adequadamente em água ultrapura e as soluções obtidas foram secas em estufa a 60 °C até a obtenção de um filme que possibilitou a realização das análises pela técnica de ATR.

3.2.3.3 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2)

Duas amostras de PVA1 e duas amostras de PVA2 foram dispersas na fase móvel (tampão fosfato salino $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ com 300 ppm de azida sódica) na concentração final de 1 mg.mL^{-1} . Depois, essas amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Uma das amostras de cada PVA foi ainda filtrada em membranas de copolímero acrílico com diâmetro médio dos poros de $5 \text{ }\mu\text{m}$, simulando a etapa de ultrafiltração da solução polimérica final no preparo dos *scaffolds*. As massas moleculares médias em massa (Mw) e as massas moleculares médias em número (Mn) foram determinadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em um Viscotek (Malvern®) equipado com uma coluna SHODEX SB-806M HQ, usando detectores de UV/Vis, índice de refração e espalhamento de luz laser. O volume de amostra injetado foi de $0,1 \text{ mL}$, com fluxo de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$, à temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados foram analisados através do software Omni SEC.

3.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Quitosana (CS2)

A atividade antimicrobiana da quitosana (CS2) foi avaliada através do teste de microdiluição colorimétrica descrito por Veiga *et al.* (2019). A concentração inibitória mínima da quitosana foi determinada para as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Foi utilizada, como controle positivo, uma solução hidroalcoólica (5%) contendo cloranfenicol, na concentração de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli* e $1000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*. Como controle negativo foi utilizada uma solução hidroalcoólica (5%). A análise estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

3.2.5 Desenvolvimento dos *Scaffolds*

De acordo com as TABELAS 1 – 12 foram preparados 96 *scaffolds* por eletrofiliação utilizando planejamento fatorial 2^3 . Foram avaliadas as influências das variáveis independentes relacionadas: a) à formulação (concentrações inferior e superior dos polímeros e da glicerina); b) às matérias-primas (quitosana bruta (CS2) e purificada (CS1), PVA de duas marcas diferentes); e c) ao procedimento (agulha com calibre de $0,7 \text{ mm}$ ou $1,2 \text{ mm}$ e ultrafiltração ou não das dispersões poliméricas

finais), sobre as variáveis dependentes (propriedades morfológicas: fibras espessas e contínuas com alto rendimento) dos *scaffolds*.

Para isso, foram preparadas 96 soluções poliméricas misturando 20 g de solução de quitosana, 20 g de solução de PVA e 0,25 g (-) ou 0,50 g (+) de glicerina. As soluções de quitosana bruta (CS2) e purificada (CS1) foram preparadas nas concentrações 2% m/m (-) e 3% m/m (+) em solução aquosa de ácido acético glacial (0,5 mol.L⁻¹) com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) como cossolvente, sob agitação magnética por 24 h. As soluções de PVA1 foram preparadas nas concentrações 5% m/m (-) e 7% m/m (+) e de PVA2 nas concentrações 6% m/m (-) e 8% m/m (+) em água ultrapura aquecida, sob agitação magnética por 24 h. A ultrafiltração foi realizada em membranas de copolímero acrílico com suporte não tecido com diâmetro médio dos poros de 5 µm.

TABELA 1 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS1 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão (µL.min ⁻¹) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| NF01 | - | - | - | 18,4 | 60 | 7,1 | 20,6 |
| NF02 | + | - | - | 18,9 | 60 | 7,1 | 21,0 |
| NF03 | - | + | - | 18,4 | 60 | 7,1 | 19,9 |
| NF04 | + | + | - | 18,9 | 60 | 4,3 | 7,5 |
| NF05 | - | - | + | 18,9 | 54 | 7,1 | 19,9 |
| NF06 | + | - | + | 18,9 | 54 | 7,1 | 20,7 |
| NF07 | - | + | + | 18,9 | 54 | 7,1 | 18,5 |
| NF08 | + | + | + | 18,9 | 54 | 7,1 | 19,2 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 2 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF09 | - | - | - | 21,5 | 41 | 7,1 | 21,4 |
| NF10 | + | - | - | 22,1 | 41 | 10,7 | 21,1 |
| NF11 | - | + | - | 22,5 | 41 | 10,7 | 22,2 |
| NF12 | + | + | - | 22,5 | 41 | 7,1 | 22,3 |
| NF13 | - | - | + | 22,6 | 41 | 7,1 | 21,3 |
| NF14 | + | - | + | 22,7 | 41 | 10,7 | 23,0 |
| NF15 | - | + | + | 22,7 | 41 | 10,7 | 22,6 |
| NF16 | + | + | + | 22,9 | 41 | 10,7 | 23,9 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF17 | - | - | - | 19,9 | 48 | 7,1 | 19,0 |
| NF18 | + | - | - | 20,2 | 48 | 4,3 | 18,6 |
| NF19 | - | + | - | 20,3 | 48 | 7,1 | 18,0 |
| NF20 | + | + | - | 20,5 | 48 | 5,7 | 16,0 |
| NF21 | - | - | + | 20,6 | 48 | 7,1 | 14,0 |
| NF22 | + | - | + | 20,7 | 48 | 7,1 | 14,0 |
| NF23 | - | + | + | 20,9 | 48 | 7,1 | 18,0 |
| NF24 | + | + | + | 20,9 | 48 | 5,7 | 16,5 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 4 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS1 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF25 | - | - | - | 19,1 | 54 | 7,1 | 17,1 |
| NF26 | + | - | - | 19,3 | 53 | 7,1 | 17,9 |
| NF27 | - | + | - | 19,4 | 52 | 14,2 | 21,0 |
| NF28 | + | + | - | 19,5 | 53 | 7,1 | 17,0 |
| NF29 | - | - | + | 19,6 | 53 | 7,1 | 17,0 |
| NF30 | + | - | + | 19,6 | 53 | 14,2 | 18,0 |
| NF31 | - | + | + | 19,8 | 52 | 14,2 | 17,0 |
| NF32 | + | + | + | 19,8 | 52 | 14,2 | 17,0 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 5 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF33 | - | - | - | 18,0 | 51 | 7,1 | 19,8 |
| NF34 | + | - | - | 18,0 | 51 | 7,1 | 18,6 |
| NF35 | - | + | - | 18,0 | 51 | 7,1 | 19,4 |
| NF36 | + | + | - | 18,0 | 51 | 7,1 | 18,2 |
| NF37 | - | - | + | 18,0 | 51 | 7,1 | 19,7 |
| NF38 | + | - | + | 18,0 | 51 | 7,1 | 19,8 |
| NF39 | - | + | + | 18,0 | 51 | 7,1 | 18,4 |
| NF40 | + | + | + | 18,0 | 51 | 7,1 | 19,8 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF41 | - | - | - | 18,0 | 58 | 10,7 | 23,6 |
| NF42 | + | - | - | 18,4 | 60 | 10,7 | 23,6 |
| NF43 | - | + | - | 18,4 | 58 | 7,1 | 12,5 |
| NF44 | + | + | - | 18,6 | 58 | 10,7 | 25,4 |
| NF45 | - | - | + | 18,6 | 55 | 10,7 | 19,5 |
| NF46 | + | - | + | 18,6 | 53 | 10,7 | 19,5 |
| NF47 | - | + | + | 18,8 | 54 | 7,1 | 13,0 |
| NF48 | + | + | + | 18,9 | 53 | 7,1 | 25,5 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 7 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS1 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF49 | - | - | - | 20,9 | 40 | 28,5 | 19,1 |
| NF50 | + | - | - | 21,1 | 40 | 28,5 | 20,0 |
| NF51 | - | + | - | 21,1 | 40 | 28,5 | 18,8 |
| NF52 | + | + | - | 21,4 | 40 | 21,4 | 22,0 |
| NF53 | - | - | + | 21,4 | 41 | 28,5 | 14,1 |
| NF54 | + | - | + | 21,5 | 41 | 28,5 | 14,8 |
| NF55 | - | + | + | 21,5 | 40 | 28,5 | 14,6 |
| NF56 | + | + | + | 21,6 | 41 | 28,5 | 16,4 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 8 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF57 | - | - | - | 21,6 | 40 | 28,5 | 21,0 |
| NF58 | + | - | - | 21,9 | 41 | 21,4 | 19,5 |
| NF59 | - | + | - | 21,9 | 41 | 28,5 | 14,0 |
| NF60 | + | + | - | 21,9 | 40 | 21,4 | 23,0 |
| NF61 | - | - | + | 21,9 | 40 | 28,5 | 21,0 |
| NF62 | + | - | + | 22,0 | 40 | 28,5 | 16,0 |
| NF63 | - | + | + | 22,1 | 40 | 28,5 | 16,0 |
| NF64 | + | + | + | 22,1 | 39 | 21,4 | 20,0 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 9 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA1 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF65 | - | - | - | 22,4 | 40 | 28,5 | 14,5 |
| NF66 | + | - | - | 22,4 | 40 | 28,5 | 17,5 |
| NF67 | - | + | - | 22,5 | 39 | 28,5 | 14,0 |
| NF68 | + | + | - | 22,6 | 40 | 28,5 | 18,0 |
| NF69 | - | - | + | 22,6 | 40 | 28,5 | 15,0 |
| NF70 | + | - | + | 22,8 | 39 | 28,5 | 19,0 |
| NF71 | - | + | + | 22,9 | 40 | 28,5 | 17,0 |
| NF72 | + | + | + | 22,9 | 39 | 28,5 | 21,0 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 10 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS1 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF73 | - | - | - | 22,9 | 40 | 28,5 | 18,0 |
| NF74 | + | - | - | 22,9 | 40 | 28,5 | 18,5 |
| NF75 | - | + | - | 23,0 | 39 | 28,5 | 17,5 |
| NF76 | + | + | - | 23,0 | 39 | 28,5 | 17,5 |
| NF77 | - | - | + | 23,1 | 39 | 28,5 | 18,0 |
| NF78 | + | - | + | 23,1 | 39 | 28,5 | 19,0 |
| NF79 | - | + | + | 23,1 | 39 | 28,5 | 17,0 |
| NF80 | + | + | + | 23,1 | 38 | 28,5 | 18,5 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 11 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS SCAFFOLDS DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF81 | - | - | - | 22,3 | 44 | 28,5 | 19,0 |
| NF82 | + | - | - | 22,3 | 44 | 28,5 | 20,0 |
| NF83 | - | + | - | 22,4 | 44 | 28,5 | 18,0 |
| NF84 | + | + | - | 22,5 | 44 | 28,5 | 20,0 |
| NF85 | - | - | + | 22,6 | 44 | 28,5 | 18,0 |
| NF86 | + | - | + | 22,6 | 43 | 28,5 | 18,0 |
| NF87 | - | + | + | 22,6 | 43 | 28,5 | 18,0 |
| NF88 | + | + | + | 22,8 | 43 | 28,5 | 20,0 |

FONTE: A autora (2021).

TABELA 12 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DOS *SCAFFOLDS* DE QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.

| Experimento | CS2 | PVA2 | Glicerina | Temperatura (°C) | Umidade (%) | Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) | Tensão (kV) |
|-------------|-----|------|-----------|---------------------|----------------|--|----------------|
| NF89 | - | - | - | 22,8 | 42 | 28,5 | 18,0 |
| NF90 | + | - | - | 22,9 | 42 | 28,5 | 18,0 |
| NF91 | - | + | - | 22,9 | 42 | 28,5 | 18,0 |
| NF92 | + | + | - | 22,9 | 42 | 28,5 | 19,0 |
| NF93 | - | - | + | 22,9 | 42 | 28,5 | 18,0 |
| NF94 | + | - | + | 22,9 | 41 | 28,5 | 18,0 |
| NF95 | - | + | + | 22,9 | 41 | 28,5 | 18,0 |
| NF96 | + | + | + | 22,9 | 41 | 28,5 | 18,0 |

FONTE: A autora (2021).

Cada uma das soluções poliméricas preparadas foi submetida ao processo de eletrofiação para a produção dos *scaffolds*. As soluções foram colocadas em seringas de vidro conectadas a uma fonte de alta voltagem, que variou de 7,5 a 25,5 kV, dependendo da amostra. Então, as nanofibras foram ejetadas para um coletor com diferença de potencial a uma distancia de 14 cm. Todas as amostras foram envoltas em filme plástico de PVC a fim de protegê-las contra a umidade.

3.2.6 Caracterização dos *Scaffolds*

3.2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação morfológica dos *scaffolds* obtidos foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura a 10 kV. As amostras foram fixadas em stubs com o auxílio de fita adesiva de carbono e submetidas à metalização a vácuo com ouro. Cinco medidas de espessura das fibras foram feitas usando o software ImageJ e a média foi calculada.

3.2.6.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Os experimentos de MFA foram conduzidos pelo método não contato, com constante de força de $5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de ressonância de 160 kHz. A amostra

foi previamente pulverizada em suporte de silício. Áreas de 8 x 8 µm foram escaneadas e as imagens de topografia foram analisadas. O processamento dos dados foi realizado com o software Gwyddion 2.85.

3.2.6.3 Microscopia Confocal (MC)

Para a análise por MC, as nanofibras foram modificadas com rodamina (20 mg) via reação de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 1 mg) e NHS (N-hidroxisuccinimida, 10 mg) durante 18 h e protegidas da luz. A amostra foi examinada utilizando lente objetiva com aumento de 60 X e óleo de imersão. A imagem de fluorescência foi adquirida excitando a rodamina com laser a 561 nm e a emissão foi capturada usando filtro 595/50 (passagem de banda 570 – 620 nm). As imagens foram capturadas com o software Nis Elements 4.20.

3.2.7 Desenvolvimento das Nano e Micropartículas de Quitosana

Nano e micropartículas de quitosana foram obtidas utilizando uma técnica de gelificação iônica modificada (CALVO *et al.*, 1997). Pirofosfato de sódio tetrabásico deca-hidratado, trifosfato de sódio pentabásico, polifosfato de sódio, hexametáfosfato de sódio e hidrato de sal de sódio de ácido fítico foram usados como ânions nas massas: 0,02 g; 0,03 g; 0,04 g; 0,05 g; 0,1 g e 0,5 g em 20 mL de água. Todas essas quantidades foram combinadas com 0,05 g de quitosana em 50 mL de água, gotejando a solução aniônica sobre a solução catiônica, bem como a solução catiônica sobre a solução aniônica, sob velocidade de agitação magnética de 500 rpm em pH 4, totalizando 60 formulações (TABELA 13).

TABELA 13. FORMULAÇÕES DAS NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.

| Formulation | Ânions | Massa (g) | Fase Gotejada |
|-------------|-------------|-----------|---------------|
| F01 | Pirofosfato | 0,02 | Pirofosfato |
| F02 | Pirofosfato | 0,03 | Pirofosfato |
| F03 | Pirofosfato | 0,04 | Pirofosfato |
| F04 | Pirofosfato | 0,05 | Pirofosfato |
| F05 | Pirofosfato | 0,1 | Pirofosfato |
| F06 | Pirofosfato | 0,5 | Pirofosfato |
| F07 | Pirofosfato | 0,02 | Quitosana |

| | | | |
|-----|------------------|------|------------------|
| F08 | Pirofosfato | 0,03 | Quitosana |
| F09 | Pirofosfato | 0,04 | Quitosana |
| F10 | Pirofosfato | 0,05 | Quitosana |
| F11 | Pirofosfato | 0,1 | Quitosana |
| F12 | Pirofosfato | 0,5 | Quitosana |
| F13 | Trifosfato | 0,02 | Trifosfato |
| F14 | Trifosfato | 0,03 | Trifosfato |
| F15 | Trifosfato | 0,04 | Trifosfato |
| F16 | Trifosfato | 0,05 | Trifosfato |
| F17 | Trifosfato | 0,1 | Trifosfato |
| F18 | Trifosfato | 0,5 | Trifosfato |
| F19 | Trifosfato | 0,02 | Quitosana |
| F20 | Trifosfato | 0,03 | Quitosana |
| F21 | Trifosfato | 0,04 | Quitosana |
| F22 | Trifosfato | 0,05 | Quitosana |
| F23 | Trifosfato | 0,1 | Quitosana |
| F24 | Trifosfato | 0,5 | Quitosana |
| F25 | Hexametrafosfato | 0,02 | Hexametrafosfato |
| F26 | Hexametrafosfato | 0,03 | Hexametrafosfato |
| F27 | Hexametrafosfato | 0,04 | Hexametrafosfato |
| F28 | Hexametrafosfato | 0,05 | Hexametrafosfato |
| F29 | Hexametrafosfato | 0,1 | Hexametrafosfato |
| F30 | Hexametrafosfato | 0,5 | Hexametrafosfato |
| F31 | Hexametrafosfato | 0,02 | Quitosana |
| F32 | Hexametrafosfato | 0,03 | Quitosana |
| F33 | Hexametrafosfato | 0,04 | Quitosana |
| F34 | Hexametrafosfato | 0,05 | Quitosana |
| F35 | Hexametrafosfato | 0,1 | Quitosana |
| F36 | Hexametrafosfato | 0,5 | Quitosana |
| F37 | Polifosfato | 0,02 | Polifosfato |
| F38 | Polifosfato | 0,03 | Polifosfato |
| F39 | Polifosfato | 0,04 | Polifosfato |
| F40 | Polifosfato | 0,05 | Polifosfato |
| F41 | Polifosfato | 0,1 | Polifosfato |
| F42 | Polifosfato | 0,5 | Polifosfato |
| F43 | Polifosfato | 0,02 | Quitosana |
| F44 | Polifosfato | 0,03 | Quitosana |
| F45 | Polifosfato | 0,04 | Quitosana |
| F46 | Polifosfato | 0,05 | Quitosana |
| F47 | Polifosfato | 0,1 | Quitosana |

| | | | |
|-----|--------------|------|--------------|
| F48 | Polifosfato | 0,5 | Quitosana |
| F49 | Ácido Fítico | 0,02 | Ácido Fítico |
| F50 | Ácido Fítico | 0,03 | Ácido Fítico |
| F51 | Ácido Fítico | 0,04 | Ácido Fítico |
| F52 | Ácido Fítico | 0,05 | Ácido Fítico |
| F53 | Ácido Fítico | 0,1 | Ácido Fítico |
| F54 | Ácido Fítico | 0,5 | Ácido Fítico |
| F55 | Ácido Fítico | 0,02 | Quitosana |
| F56 | Ácido Fítico | 0,03 | Quitosana |
| F57 | Ácido Fítico | 0,04 | Quitosana |
| F58 | Ácido Fítico | 0,05 | Quitosana |
| F59 | Ácido Fítico | 0,1 | Quitosana |
| F60 | Ácido Fítico | 0,5 | Quitosana |

FONTE: A autora (2021).

3.2.8 Caracterização das Nano e Micropartículas de Quitosana

A mobilidade eletroforética de todas as formulações em um meio com NaCl 10 mM foi determinada e, em seguida, o potencial zeta foi calculado usando a equação de Smoluchowski. A distribuição do tamanho das partículas foi avaliada pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) pelo método dos cumulantes e de espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.9 Desenvolvimento das Nanopartículas de Albumina de Soro Bovino (BSA)

F35 e F47 foram escolhidas para a produção das nanopartículas de BSA. Para isso, 1 mg de BSA foi adicionado à solução de quitosana (5 mg em 5 mL de água ultrapura) que foi gotejada na solução de poliânion (10 mg em 2 mL de água ultrapura).

3.2.10 Caracterização das Nanopartículas de Albumina de Soro Bovino (BSA)

A mobilidade eletroforética das nanopartículas em um meio com NaCl 10 mM foi determinada e, em seguida, o potencial zeta foi calculado usando a equação de Smoluchowski. A distribuição do tamanho das partículas foi avaliada pelas

técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) pelo método dos cumulantes. As análises foram realizadas em triplicata.

3.1.11 Determinação da Eficiência da Encapsulação da Albumina do Soro Bovino (BSA) nas Nanopartículas

A eficiência da encapsulação do BSA foi determinada pelo método de Bradford. As nanopartículas foram centrifugadas a 170.000 g por 1 h a 4 °C. Tanto o BSA presente no sobrenadante quanto no precipitado foram quantificados por espectrofotometria UV a 595 nm. Para a curva padrão, soluções aquosas de BSA foram preparadas nas concentrações: 0,4; 0,64; 0,8; 4; 6,4; 8 e 16 µg.mL⁻¹. As concentrações de BSA foram calculadas a partir da equação:

$$y = (0,1065 \times 3) - (0,0162 \times 2) + (0,0069 \times x) + 0,0001$$

em que, x são os valores de absorvância obtidos em 595 nm.

3.1.12 Desenvolvimento das Nanopartículas com Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)

Para a incorporação de FGFb nas partículas de BSA, 0,1 mg de FGFb e 0,9 mg de BSA foram adicionados à solução de quitosana (5 mg de CS em 5 mL de água ultrapura), que foi gotejada na solução de poliânion (10 mg de poliânion em 2 mL de água ultrapura).

3.1.13 Caracterização das Nanopartículas de Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb)

As nanopartículas de FGFb foram caracterizadas da mesma forma que as nanopartículas de BSA (item 3.2.10).

3.1.14 Desenvolvimento das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda

As nanocápsulas de óleo essencial de *L. angustifolia* (NC) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989). A fase orgânica composta por PCL, óleo essencial, Span 80[®] e acetona foi gotejada sobre uma fase aquosa composta por Tween 80[®] e água ultrapura, sob agitação magnética. Em seguida, a dispersão obtida foi evaporada até atingir o volume final de 30 mL. Nanocápsulas foram preparadas usando triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílicos (branco) em vez de óleo essencial de *L. angustifolia*.

Para avaliar a eficiência da encapsulação do óleo essencial nas nanocápsulas, foi utilizado um planejamento fatorial 2³. Os três fatores avaliados foram: a concentração de PCL, de Span 80[®] e de Tween 80[®]. Quantidades fixas de acetona (20 g), de óleo essencial (500 mg) e de água (50 g) foram utilizadas. Foi definido um nível baixo (-) e um nível alto (+) para cada fator, sendo 40 mg (-) e 80 mg (+) para PCL, 60 mg (-) e 100 mg (+) para Span 80[®] e, 150 mg (-) e 250 mg (+) para Tween 80[®]. No total, oito nanocápsulas foram preparadas de acordo com a Tabela 14 e a eficiência da encapsulação (EE%) das formulações foi determinada.

TABELA 14 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.

| Experimento | PCL | Span 80 [®] | Tween 80 [®] |
|-------------|-----|----------------------|-----------------------|
| NC01 | - | - | - |
| NC02 | + | - | - |
| NC03 | - | + | - |
| NC04 | + | + | - |
| NC05 | - | - | + |
| NC06 | + | - | + |
| NC07 | - | + | + |
| NC08 | + | + | + |

FONTE: A autora (2021).

3.1.15 Caracterização das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda

O potencial interfacial das nanocápsulas foi medido por potencial de fluxo e a distribuição do tamanho das nanopartículas foi avaliada pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.1.16 Determinação da Eficiência da Encapsulação do Óleo Essencial de Lavanda nas Nanocápsulas

Para a determinação da eficiência da encapsulação do óleo essencial de lavanda nas nanocápsulas foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (GONÇALVES *et al.*, 2021), utilizando um cromatógrafo Agilent serie 1100 acoplado a um detector de arranjo de dióxido (CLAE-DAD). O padrão escolhido para avaliar a encapsulação foi o linalol, principal marcador do óleo essencial de lavanda. O método desenvolvido foi constituído de uma coluna C18, fase móvel de água (A) e acetonitrila (B) no modo gradiente, fluxo de 1 mL.min⁻¹, temperatura do forno de coluna de 25 °C, volume de injeção de 10 µL e detecção do analito em 210 nm. Inicialmente foi realizado um gradiente exploratório, para a definição do gradiente, sendo fixado um gradiente linear de 30% a 65,9% B de 0-20 minutos, 100% B de 21-25 minutos, seguido de reambientação da coluna nas condições cromatográficas iniciais por 5 minutos. Os cromatogramas foram analisados através do software Agilent Chemstation, versão B.04.03-16.

O método foi validado de acordo com a RDC 166/2017 (ANVISA) e a ICH Q2 (R1). Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, efeito matriz, limites de detecção e quantificação (LD e LQ), exatidão, precisão e robustez. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando os softwares Minitab, versão 17.1.0 e Prisma, versão 6.01. A estabilidade da solução padrão do linalol foi realizada para avaliar a potencial perda de conteúdo com o tempo. Para isto uma solução (1248 µg.mL⁻¹) foi preparada e monitorada num intervalo de 5 horas, com análise a cada hora. As análises foram feitas em triplicata.

Após o desenvolvimento e validação do método, a eficiência da encapsulação (EE%) do óleo essencial de lavanda nas nanocápsulas foi calculada pelo teor do linalol no sobrenadante obtido da centrifugação (2.854 g, 1 h) da dispersão de nanocápsulas em comparação com o óleo essencial puro.

3.1.17 Avaliação da Citotoxicidade das Nanocápsulas de Óleo Essencial de Lavanda

Fibroblastos embrionários de camundongo (NIH 3T3) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 U.mL⁻¹ de

solução antibiótica (penicilina/estreptomicina). Em seguida, as células foram incubadas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C.

A avaliação da citotoxicidade das nanocápsulas foi realizada *in vitro* através do ensaio MTT (MOSMANN, 1983). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços (1.10³ células/poço) com meio suplementado e incubadas durante 24 h para adesão. Em seguida, o mesmo meio suplementado contendo nanocápsulas de óleo essencial de *Lavandula angustifolia* (10, 50, 100, 150 e 200 µg.mL⁻¹) foi adicionado, seguido de incubação. Após 24 h, o meio foi substituído pela solução de MTT (0,05 mg.mL⁻¹) e as células foram incubadas por mais 3 h. Então, foram adicionados 100 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan formados e a absorvância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas. Os valores de densidade óptica (DO) foram convertidos em % de viabilidade celular usando a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = (DO \text{ do tratamento} / DO \text{ do controle}) . 100$$

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DOS SCAFFOLDS

4.1.1 Purificação da Quitosana (CS2) e Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana Purificada (CS1)

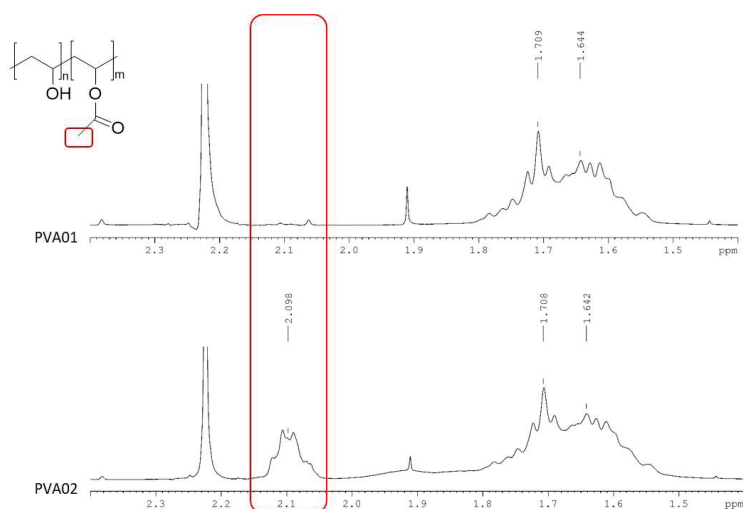
O processo de purificação da quitosana apresentou um rendimento médio de 97% e o grau de desacetilação obtido para a quitosana purificada foi igual a 79,24%, valor dentro do intervalo especificado pelo fornecedor, indicando que não houve mudanças nas cargas positivas dos grupos amino ativos durante o processo de purificação.

4.1.2 Caracterização das Matérias-primas

4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS2)

Os espectros de RMN obtidos na caracterização dos polímeros utilizados na produção dos *scaffolds* mostraram sinais entre 1.5 – 1.8 ppm, para ambos PVA1 e PVA2 (FIGURA 8), que são característicos dos hidrogênios dos grupos CH₂, enquanto o sinal em 4.03 ppm (não mostrado) refere-se ao hidrogênio do grupo CH (PETIT & ZHU, 1996; SHIN *et al.*, 2008). Comparando os espectros dos polímeros PVA1 e PVA2, podem-se observar diferenças no grau de desacetilação das moléculas. Uma vez que o sinal do hidrogênio do CH₃ do grupo acetila tem deslocamento de 2.09 ppm, conclui-se que o PVA1 é um polímero mais desacetilado ou hidrolisado que PVA2 (CONGDON, SHAW & GIBSON, 2015; EDGREN *et al.*, 2010).

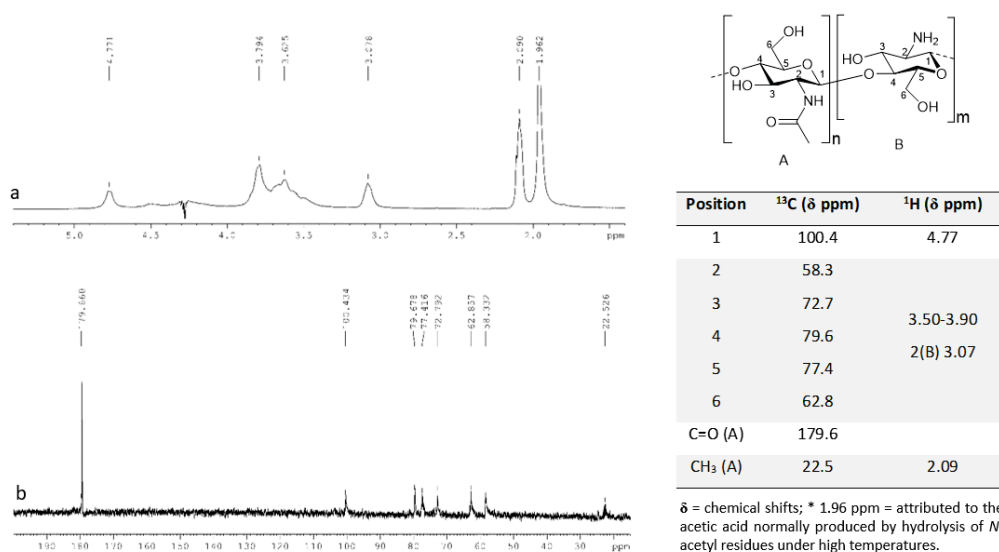
FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (PVA1 E PVA2) ($\Delta 1.4-2.4$ PPM) OBTIDO EM D_2O , 70°C .



FONTE: A autora (2021).

Os espectros de RMN obtidos para caracterização do polímero CS2 estão apresentados na FIGURA 9, juntamente com seus assinalamentos. Sinais característicos das unidades D-glucosamina e *N*-acetil-D-glucosamina, em especial foram observados àqueles referentes ao grupo *N*-acetila (179.6 ppm, 22.5/2.09 ppm) (PEREIRA, MUNIZ & HSIEH, 2015). A caracterização por RMN do polímero purificado (CS1) apresentou similaridade com material inicial, possivelmente refletindo a baixa concentração de impurezas já na amostra CS2.

FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN DE ^1H (a) E DE RMN DE ^{13}C (b) DA QUITOSANA BRUTA (CS2) OBTIDOS EM D_2O , 70°C .

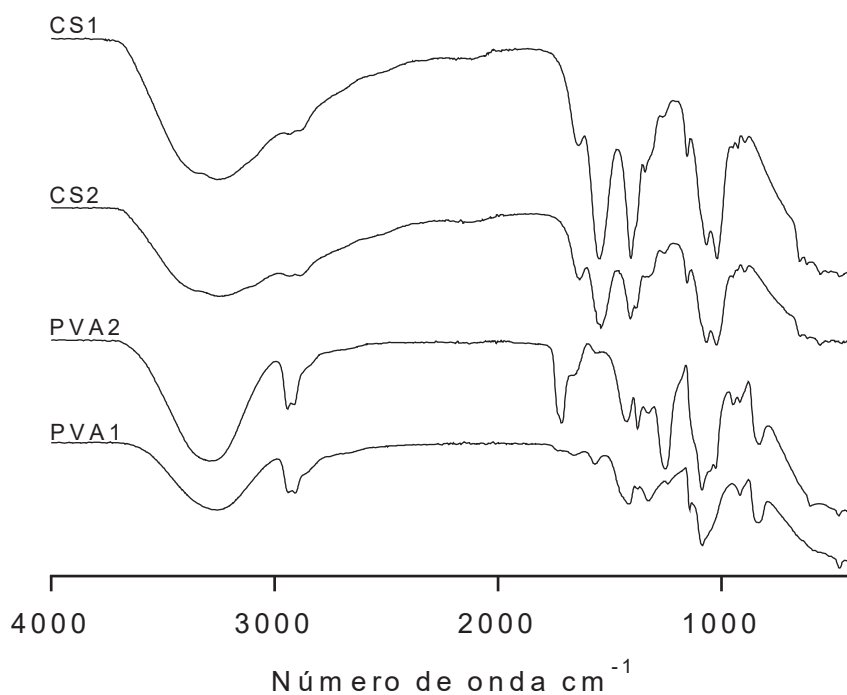


FONTE: A autora (2021).

4.1.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2) e da Quitosana (CS1 e CS2)

A identidade dos polímeros utilizados para a produção dos *scaffolds* foi confirmada por IVTF (FIGURA 10). Nos espectros das quitosanas foram identificadas as bandas características de estiramento de O-H entre 3600-3200 cm^{-1} ; bandas de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$; bandas de estiramento de C=O de amida em $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$; bandas de deformação angular de NH_2 em $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ e bandas de estiramento de C-N em $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. Os PVAs apresentaram as bandas características de estiramento de O-H entre 3600-3200 cm^{-1} ; bandas de estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ e banda de estiramento de C=O de éster em $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$, apenas no espectro do PVA2. Estes resultados estão em conformidade com os encontrados em literatura (DURU, KAMACI & PEKSEL, 2020; KAZEMI *et al.*, 2019) e com os resultados obtidos por RMN, que também mostraram que PVA1 é totalmente hidrolisado.

FIGURA 10. ESPECTROS OBTIDOS POR FTIR PARA OS POLÍMEROS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS.



FONTE: A autora (2021).

4.1.2.3 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) do Poli(álcool vinílico) (PVA1 e PVA2)

A TABELA 15 mostra as massas moleculares médias em massa (Mw) e as massas moleculares médias em número (Mn) obtidas para PVA1 e PVA2, com e sem ultrafiltração, por cromatografia de exclusão de tamanho. Observou-se que as massas moleculares médias de PVA1 e PVA2 são maiores sem ultrafiltração, etapa realizada para simular a ultrafiltração da solução polimérica final submetida à eletrofiação. E que, PVA2 apresenta maior massa molecular média que PVA1.

TABELA 15. VALORES DE Mw E Mn ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) DETERMINADOS PARA PVA1 E PVA2 POR SEC.

| | PVA1 Com Ultrafiltração | PVA1 Sem Ultrafiltração | PVA2 Com Ultrafiltração | PVA2 Sem Ultrafiltração |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Mw | 50,8 | 56,3 | 67,2 | 111,7 |
| Mn | 46,8 | 53,9 | 51,9 | 90,0 |
| Mw/ Mn | 1,1 | 1,0 | 1,3 | 1,2 |

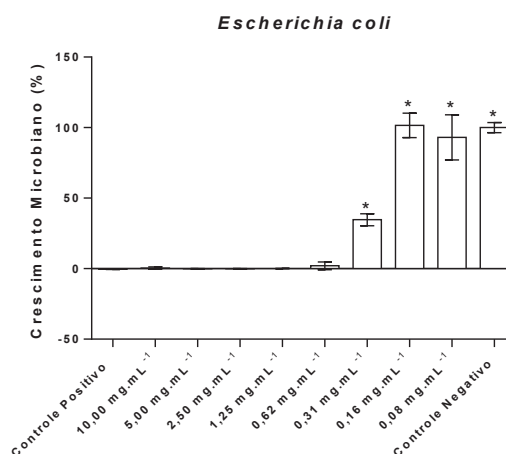
FONTE: A autora (2021).

4.1.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Quitosana (CS2)

A atividade antimicrobiana da quitosana é bem documentada na literatura. Mas, neste estudo, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da quitosana bruta para comparar com as concentrações de quitosana usadas no preparo dos *scaffolds*. Como mostrado nos GRÁFICOS 1 - 3, os valores de CIM encontrados para a quitosana foram: $0,62 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. coli* e $0,31 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A concentração de quitosana no *scaffold* selecionado (por análises posteriores) é de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Portanto, foi empregada quantidade suficiente para garantir a atividade antimicrobiana do substituto cutâneo contra a infecção dessas bactérias. Kavaz, Idris & Onyebuchi (2019) desenvolveram nanopartículas de quitosana e encontraram valores de CIM de $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a mesma cepa de *E. coli* e de $0,08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a mesma cepa de *S. aureus*. Essas diferenças nos valores de CIM podem ser devidas ao grau de desacetilação da quitosana que esses autores usaram, que é maior do que o grau de desacetilação da quitosana usada neste estudo. Em estudo anterior (GONÇALVES *et al.*, 2020), foi mostrada a atividade antimicrobiana de filmes poliméricos compostos por quitosana,

poli (álcool vinílico) e glicerol por meio de ensaios de disco-difusão. Esta mistura polimérica não apresentou um halo mensurável de inibição do crescimento bacteriano. No entanto, não houve colonização de bactérias sobre os filmes.

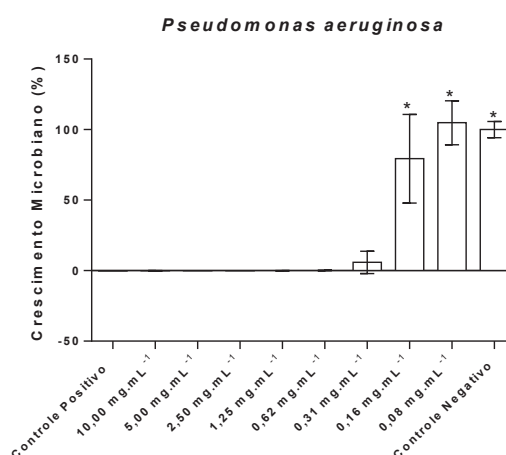
GRÁFICO 1. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA *E. coli*.



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: controle positivo composto por solução hidroalcoólica (5%) contendo cloranfenicol (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli* e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*) e controle negativo composto por solução hidroalcoólica (5%). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo.

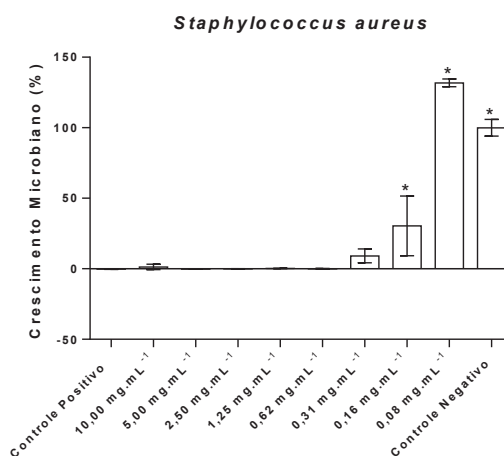
GRÁFICO 2. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA *P. aeruginosa*.



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: controle positivo composto por solução hidroalcoólica (5%) contendo cloranfenicol (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli* e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*) e controle negativo composto por solução hidroalcoólica (5%). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo.

GRÁFICO 3. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA QUITOSANA (CS2) OBTIDOS POR MICRODILUIÇÃO COLORIMÉTRICA PARA *S. aureus*.



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: controle positivo composto por solução hidroalcoólica (5%) contendo cloranfenicol (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli* e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*) e controle negativo composto por solução hidroalcoólica (5%). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo.

4.1.3 Caracterização dos *Scaffolds*

4.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV de todos os *scaffolds* obtidos são mostradas nas FIGURAS 11 - 22. Nanofibras com diferentes estruturas e espessuras foram observadas. Como o objetivo era selecionar fibras contínuas, espessas e com alto rendimento, foram feitas 5 medidas de cada amostra em diferentes regiões das imagens e calculadas as espessuras médias (TABELA 16). As nanofibras selecionadas quanto à espessura (mais de 200 nm) foram as seguintes: NF11, NF15, NF59, NF63, NF67, NF71, NF80, NF84, NF88, NF91, NF92, NF96.

No entanto, destas 12 formulações apenas 4 se apresentaram como nanofibras contínuas: NF59, NF63, NF67 e NF71. Foram eliminadas as amostras NF11 e NF15 porque apresentaram muitas *beads* e as amostras NF80, NF84, NF88, NF91, NF92 e NF96 porque não se mostraram tão uniformes quanto NF59, NF63, NF67 e NF71.

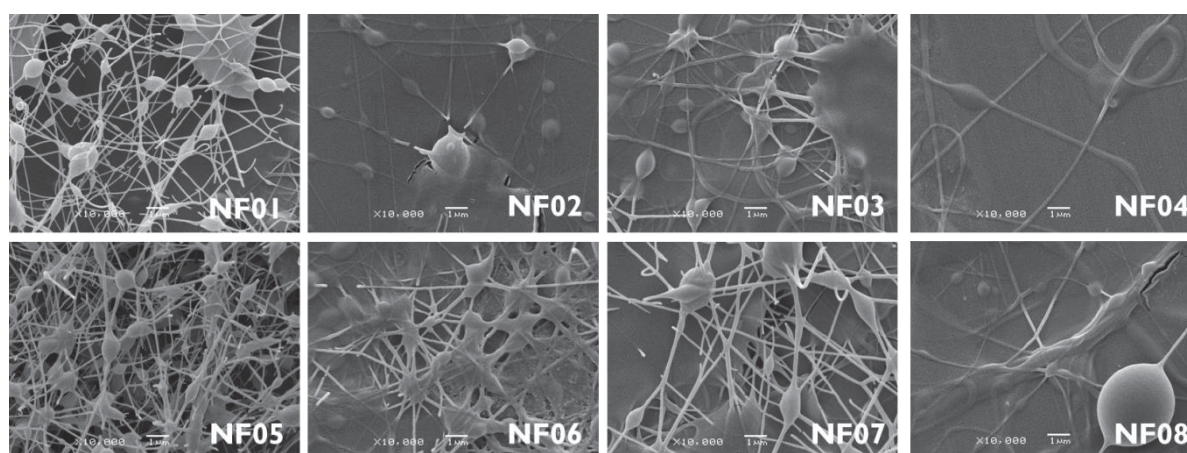
Então, foi analisada a composição das fibras NF59, NF63, NF67 e NF71 e verificou-se que todas foram obtidas a partir de quitosana não purificada (CS2), PVA1 e agulha com maior calibre. A diferença entre elas é que as soluções

poliméricas que originaram as amostras NF59 e NF63 não foram submetidas ao processo de ultrafiltração, enquanto que NF67 e NF71 foram submetidas ao processo de ultrafiltração. Observou-se também que, as amostras ultrafiltradas apresentaram maior rendimento na deposição que as amostras não ultrafiltradas. Entre as amostras ultrafiltradas a diferença é que na NF67 foi utilizada uma menor concentração de glicerina que em NF71. Selecionamos então, a amostra NF67, que apresentou maior espessura média que NF71.

Portanto, estes resultados mostraram que a amostra com melhor estrutura (contínua), maior espessura e maior rendimento foi obtida a partir de: quitosana não purificada, PVA1, agulha com maior calibre, solução final ultrafiltrada e menor concentração de glicerina.

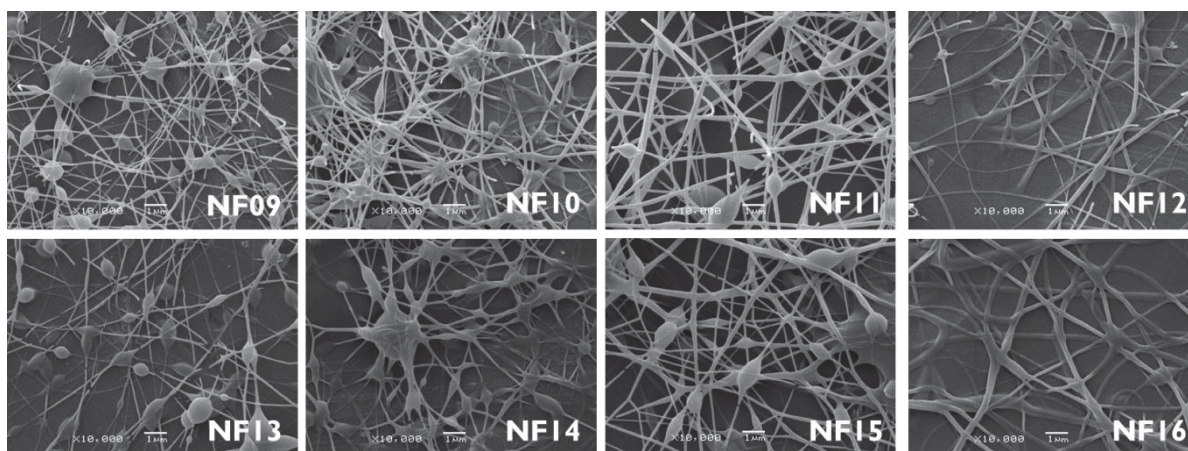
NF67 foi preparada com a proporção quitosana:PVA de 1:3,5. Como mencionado, o objetivo de usar uma blenda polimérica é melhorar as propriedades mecânicas da quitosana com a adição de um polímero sintético. Neste sentido, alguns autores que produziram nanofibras de quitosana e PVA também encontraram estruturas melhores com maior concentração de PVA (KOOSHA & MIRZADEH, 2015; WANG *et al.*, 2020).

FIGURA 11. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



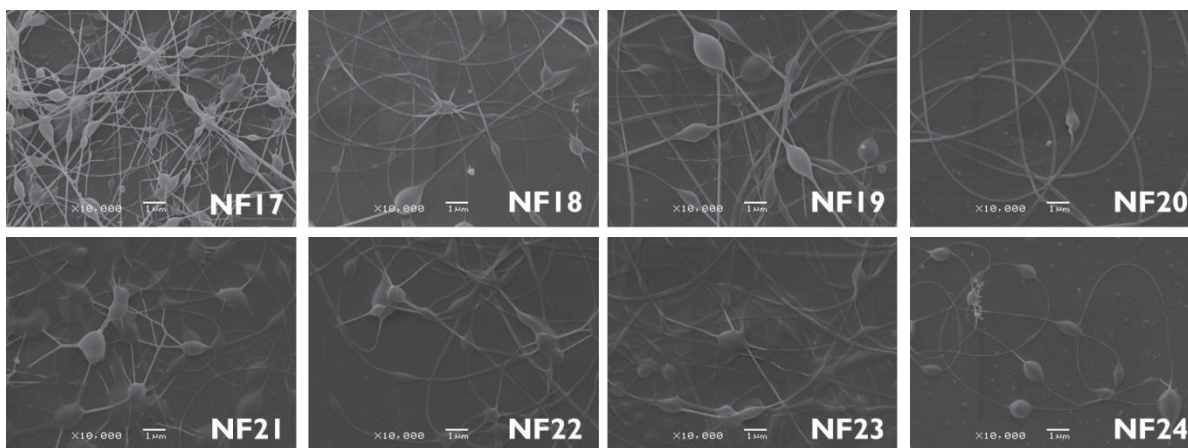
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 12. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



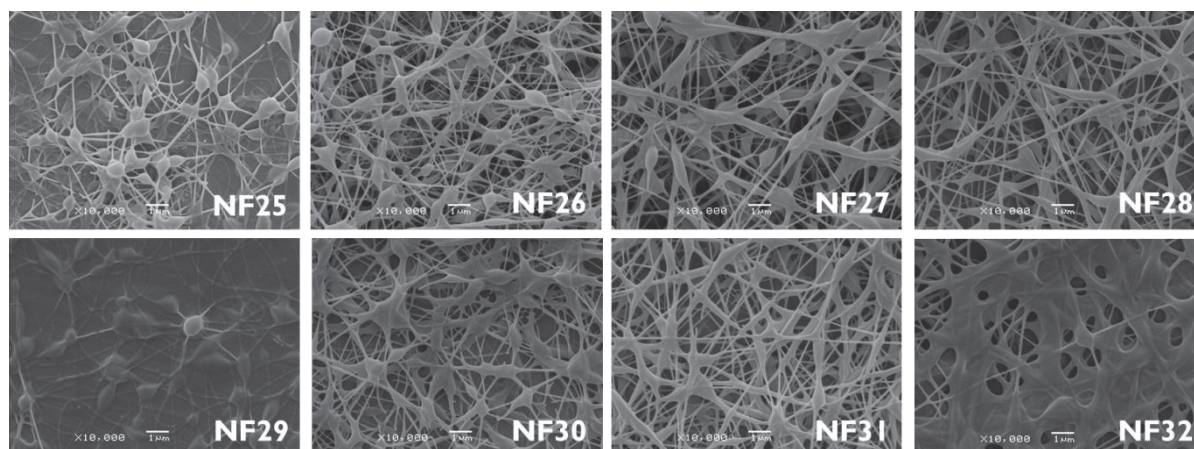
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 13. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.



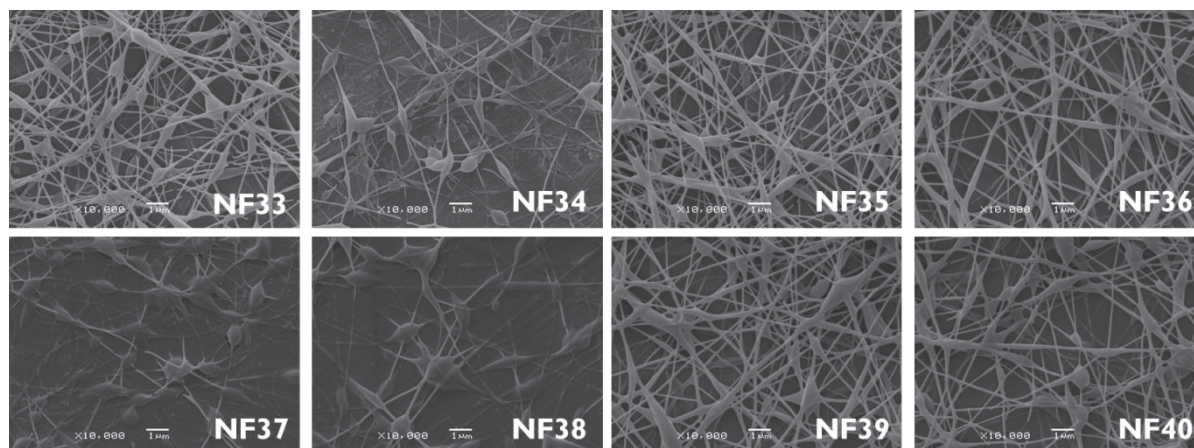
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 14. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



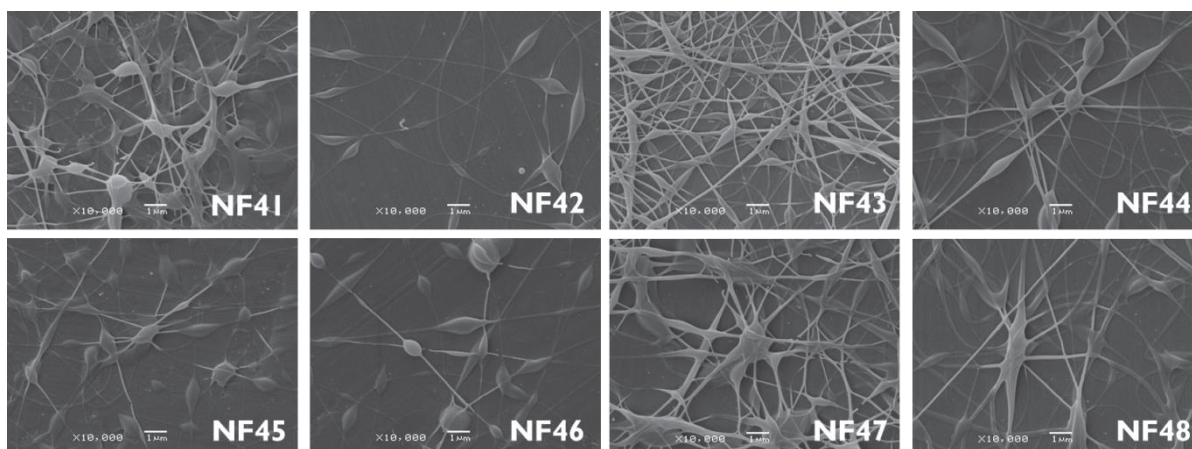
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 15. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



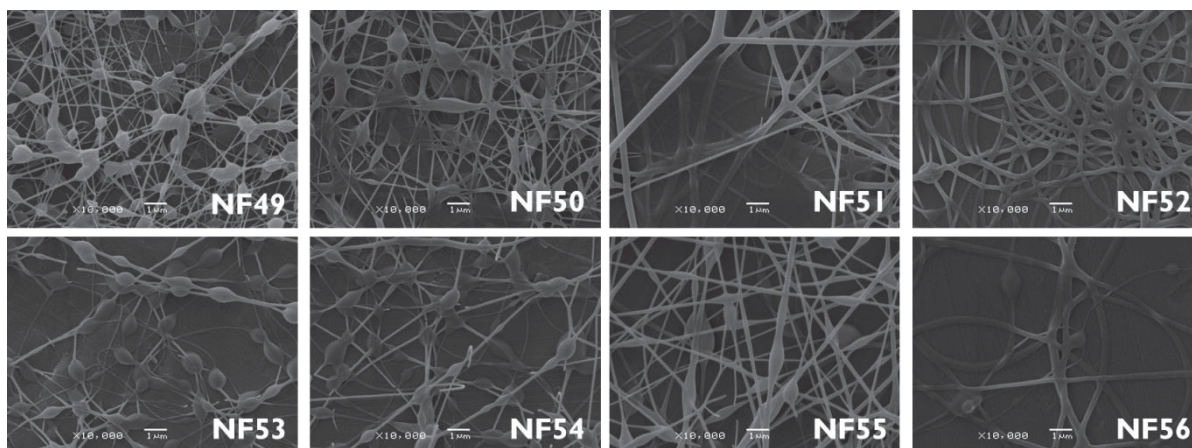
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 16. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 0,70X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.



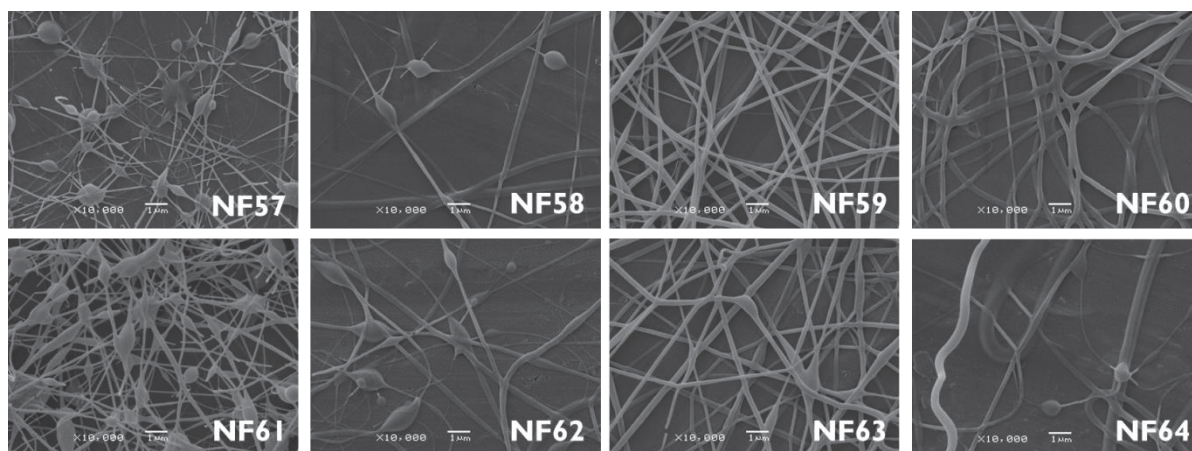
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 17. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (SIGMA-ALDRICH[®]), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



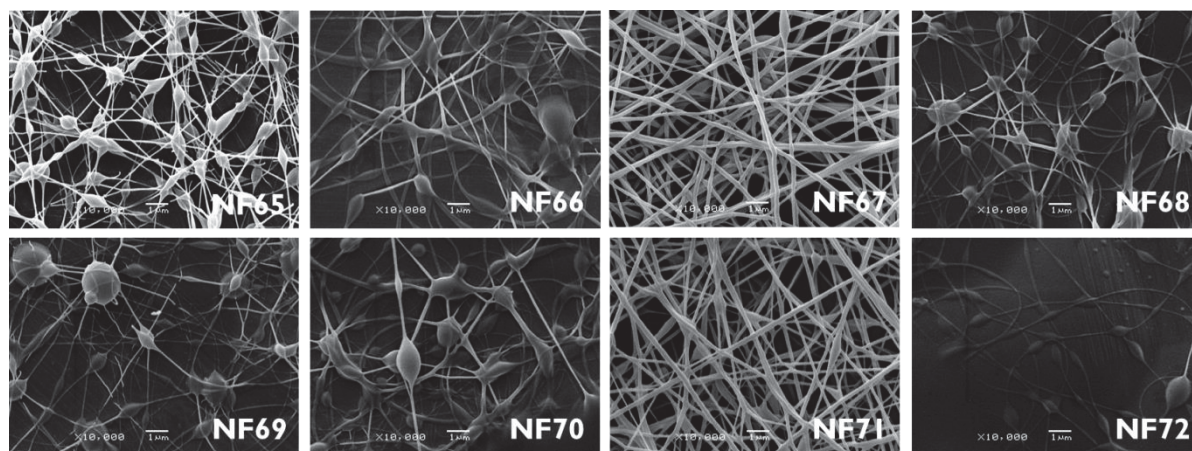
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 18. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



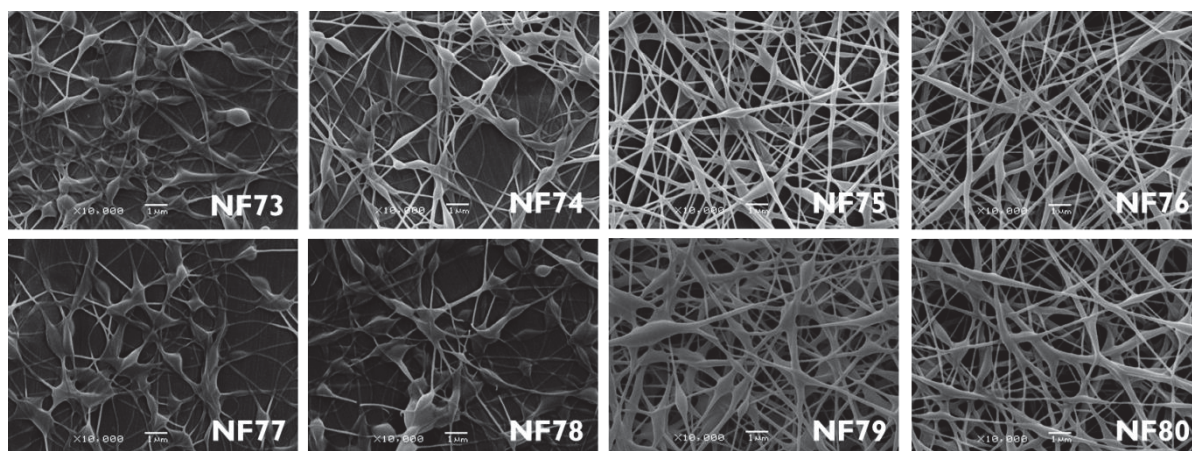
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 19. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (SIGMA-ALDRICH®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.



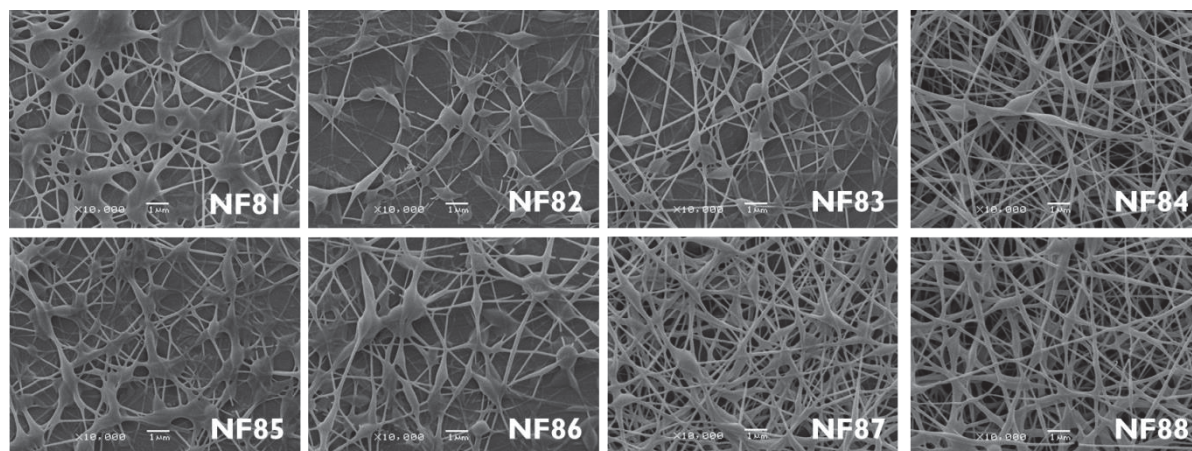
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 20. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA PURIFICADA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



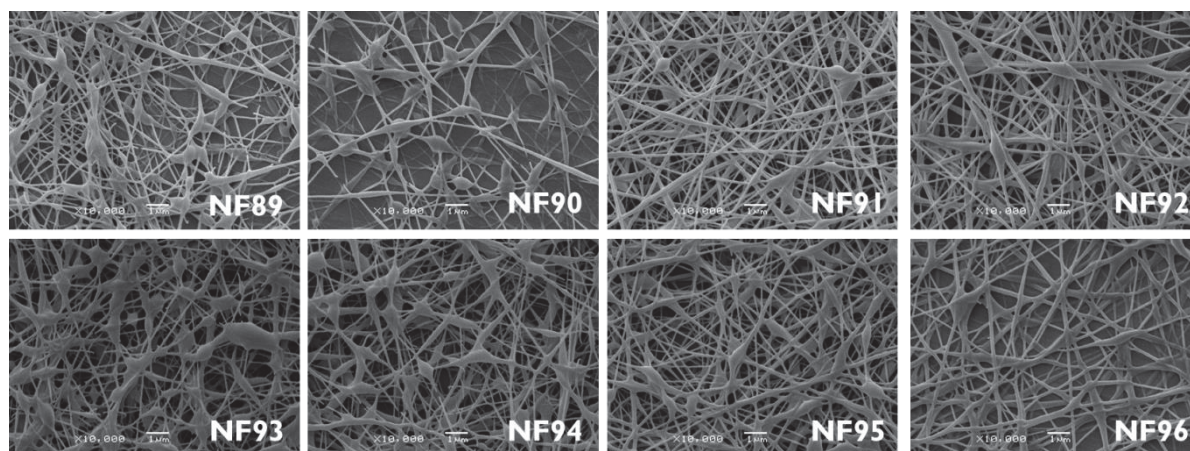
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 21. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E SEM ULTRAFILTRAÇÃO.



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 22. IMAGENS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS COM QUITOSANA BRUTA, PVA (VETEC®), GLICERINA, UTILIZANDO AGULHA 1,20X25 mm E COM ULTRAFILTRAÇÃO.



FONTE: A autora (2021).

TABELA 16. ESPESSURA DAS NANOFIBRAS MEDIDAS EM QUINTUPLICATA POR IMAGEJ, ESPESSURAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES RELATIVOS CALCULADOS.

| | Medida 1 (nm) | Medida 2 (nm) | Medida 3 (nm) | Medida 4 (nm) | Medida 5 (nm) | Média (nm) ± DPR* (%) |
|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|
| NF01 | 108,0 | 109,3 | 108,0 | 113,5 | 102,4 | 108,2 ± 3,7 |
| NF02 | 81,2 | 94,4 | 93,2 | 82,2 | 99,2 | 90,0 ± 8,8 |
| NF03 | 122,1 | 146,8 | 167,4 | 152,7 | 109,3 | 139,7 ± 16,9 |
| NF04 | 194,6 | 174,1 | 135,3 | 137,6 | 169,5 | 162,2 ± 15,6 |
| NF05 | 116,1 | 173,0 | 164,8 | 150,6 | 164,8 | 153,9 ± 14,7 |
| NF06 | 91,6 | 142,6 | 114,5 | 114,8 | 173,1 | 127,3 ± 24,6 |
| NF07 | 187,8 | 155,7 | 131,3 | 126,4 | 154,6 | 151,2 ± 16,1 |
| NF08 | 111,2 | 96,6 | 106,1 | 110,1 | 97,8 | 104,4 ± 6,5 |
| NF09 | 135,1 | 91,6 | 113,5 | 137,7 | 87,0 | 113,0 ± 20,9 |
| NF10 | 135,3 | 114,5 | 133,3 | 143,4 | 190,8 | 143,5 ± 19,9 |
| NF11 | 267,2 | 221,9 | 235,8 | 181,4 | 248,3 | 230,9 ± 14,0 |
| NF12 | 92,9 | 122,1 | 160,5 | 190,8 | 119,5 | 137,2 ± 28,0 |
| NF13 | 111,2 | 115,5 | 99,2 | 123,1 | 109,3 | 111,7 ± 7,8 |
| NF14 | 160,3 | 85,4 | 87,0 | 140,8 | 120,7 | 118,8 ± 27,7 |
| NF15 | 265,0 | 167,6 | 229,0 | 212,9 | 229,1 | 220,7 ± 16,0 |
| NF16 | 150,6 | 129,8 | 228,8 | 157,4 | 116,5 | 156,6 ± 27,8 |
| NF17 | 80,6 | 90,0 | 92,2 | 72,1 | 58,3 | 78,6 ± 17,7 |
| NF18 | 89,4 | 144,4 | 99,0 | 92,2 | 78,1 | 100,6 ± 25,4 |
| NF19 | 108,2 | 138,2 | 142,1 | 147,4 | 76,2 | 122,4 ± 24,5 |
| NF20 | 122,1 | 120,4 | 144,1 | 140,0 | 142,1 | 133,7 ± 8,6 |
| NF21 | 85,4 | 84,9 | 72,1 | 102,1 | 63,2 | 81,5 ± 18,1 |

| | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| NF22 | 122,1 | 136,0 | 174,6 | 161,3 | 111,8 | 141,2 ± 18,7 |
| NF23 | 214,0 | 91,9 | 116,6 | 230,2 | 103,0 | 151,1 ± 43,4 |
| NF24 | 70,7 | 80,6 | 60,3 | 84,9 | 70,7 | 73,4 ± 13,1 |
| NF25 | 110,0 | 80,0 | 152,6 | 92,2 | 92,2 | 105,4 ± 27,0 |
| NF26 | 107,7 | 117,1 | 300,8 | 174,9 | 165,5 | 173,2 ± 44,5 |
| NF27 | 127,3 | 107,7 | 130,4 | 148,7 | 148,7 | 132,6 ± 12,9 |
| NF28 | 80,6 | 85,4 | 94,9 | 178,9 | 102,0 | 108,4 ± 37,2 |
| NF29 | 94,9 | 72,2 | 50,0 | 80,6 | 64,0 | 72,3 ± 23,4 |
| NF30 | 108,2 | 116,6 | 100,0 | 100,0 | 82,4 | 101,4 ± 12,5 |
| NF31 | 90,0 | 165,5 | 147,7 | 72,8 | 121,7 | 119,5 ± 32,3 |
| NF32 | 80,6 | 84,9 | 64,0 | 72,1 | 106,3 | 81,6 ± 19,6 |
| NF33 | 107,7 | 70,7 | 103,0 | 120,4 | 114,0 | 103,2 ± 18,7 |
| NF34 | 72,8 | 56,6 | 76,2 | 64,0 | 92,2 | 72,4 ± 18,6 |
| NF35 | 128,1 | 100,6 | 161,2 | 156,2 | 90,0 | 127,2 ± 25,1 |
| NF36 | 136,0 | 205,9 | 134,5 | 147,7 | 114,0 | 147,6 ± 23,5 |
| NF37 | 67,1 | 72,1 | 76,2 | 80,6 | 90,2 | 77,2 ± 11,4 |
| NF38 | 60,8 | 85,4 | 78,1 | 50,0 | 76,2 | 70,1 ± 20,5 |
| NF39 | 126,5 | 143,2 | 128,1 | 127,3 | 108,2 | 126,7 ± 9,8 |
| NF40 | 111,8 | 108,2 | 140,4 | 136,0 | 80,0 | 115,3 ± 21,1 |
| NF41 | 85,4 | 58,3 | 108,2 | 94,9 | 63,3 | 82,0 ± 25,7 |
| NF42 | 89,4 | 72,1 | 60,0 | 63,3 | 64,0 | 69,8 ± 17,0 |
| NF43 | 133,4 | 148,7 | 111,8 | 94,9 | 178,0 | 133,4 ± 24,2 |
| NF44 | 104,4 | 108,2 | 80,6 | 70,7 | 64,0 | 85,6 ± 23,2 |
| NF45 | 58,3 | 86,0 | 80,6 | 86,0 | 50,0 | 72,2 ± 23,4 |
| NF46 | 70,7 | 60,8 | 70,7 | 60,0 | 56,6 | 63,8 ± 10,2 |
| NF47 | 150,3 | 106,3 | 113,1 | 110,0 | 116,6 | 119,3 ± 14,9 |
| NF48 | 92,2 | 99,0 | 98,5 | 100,0 | 64,0 | 90,7 ± 16,8 |
| NF49 | 100,0 | 85,4 | 134,2 | 120,4 | 80,6 | 104,1 ± 22,0 |
| NF50 | 92,2 | 100,0 | 145,6 | 103,0 | 190,3 | 126,2 ± 32,8 |
| NF51 | 375,4 | 130,0 | 51,0 | 110,0 | 141,4 | 161,6 ± 77,1 |
| NG52 | 200,0 | 160,0 | 136,0 | 194,2 | 220,2 | 182,1 ± 18,5 |
| NF53 | 72,1 | 142,2 | 106,3 | 92,2 | 80,6 | 98,7 ± 27,9 |
| NF54 | 86,2 | 82,5 | 111,8 | 134,2 | 134,5 | 109,8 ± 22,8 |
| NF55 | 123,7 | 133,4 | 164,9 | 145,6 | 176,9 | 148,9 ± 14,7 |
| NF56 | 300,8 | 161,2 | 100,0 | 53,9 | 163,8 | 155,9 ± 59,6 |
| NF57 | 156,2 | 100,0 | 50,0 | 94,3 | 78,1 | 95,7 ± 40,7 |
| NF58 | 56,6 | 85,4 | 120,4 | 98,5 | 102,0 | 92,6 ± 28,6 |
| NF59 | 156,5 | 341,3 | 170,0 | 183,6 | 189,7 | 208,2 ± 36,2 |
| NF60 | 113,1 | 131,5 | 212,1 | 224,7 | 177,2 | 171,7 ± 28,4 |
| NF61 | 120,8 | 90,6 | 238,5 | 120,0 | 192,4 | 152,5 ± 40,0 |

| | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| NF62 | 114,0 | 103,0 | 41,0 | 58,3 | 90,6 | 81,4 ± 37,8 |
| NF63 | 247,6 | 184,4 | 205,5 | 177,2 | 211,0 | 205,1 ± 13,4 |
| NF64 | 165,5 | 51,0 | 105,5 | 191,1 | 126,5 | 127,9 ± 42,5 |
| NF65 | 78,1 | 80,0 | 72,1 | 92,2 | 100,0 | 84,5 ± 13,4 |
| NF66 | 50,0 | 94,3 | 72,1 | 98,5 | 80,0 | 79,0 ± 24,6 |
| NF67 | 268,3 | 269,3 | 210,2 | 276,6 | 234,3 | 268,3 ± 19,5 |
| NF68 | 100,0 | 72,8 | 133,4 | 80,6 | 72,1 | 91,8 ± 28,1 |
| NF69 | 89,4 | 56,6 | 70,7 | 82,5 | 72,8 | 74,4 ± 16,8 |
| NF70 | 107,7 | 90,0 | 121,7 | 114,0 | 89,4 | 104,6 ± 13,8 |
| NF71 | 233,5 | 274,6 | 255,5 | 205,2 | 252,9 | 244,3 ± 10,8 |
| NF72 | 78,1 | 82,5 | 67,1 | 70,0 | 50,8 | 69,7 ± 17,5 |
| NF73 | 72,8 | 80,6 | 99,0 | 72,1 | 94,3 | 83,8 ± 14,7 |
| NF74 | 80,6 | 120,4 | 100,0 | 99,0 | 82,5 | 96,5 ± 16,7 |
| NF75 | 156,2 | 189,7 | 145,6 | 210,0 | 167,3 | 173,8 ± 15,0 |
| NF76 | 170,0 | 283,0 | 214,7 | 120,0 | 182,5 | 194,0 ± 31,1 |
| NF77 | 86,0 | 82,5 | 92,2 | 60,0 | 107,7 | 85,7 ± 20,2 |
| NF78 | 100,5 | 51,0 | 80,0 | 80,6 | 70,7 | 76,6 ± 23,4 |
| NF79 | 92,2 | 100,0 | 117,1 | 100,5 | 142,1 | 110,4 ± 18,0 |
| NF80 | 206,2 | 240,2 | 247,6 | 311,5 | 128,1 | 226,7 ± 29,5 |
| NF81 | 91,6 | 130,4 | 174,2 | 157,2 | 130,4 | 136,8 ± 22,9 |
| NF82 | 109,3 | 119,5 | 106,9 | 114,5 | 89,0 | 107,8 ± 10,8 |
| NF83 | 158,8 | 192,2 | 184,8 | 133,3 | 165,1 | 166,8 ± 13,9 |
| NF84 | 191,5 | 187,8 | 272,5 | 198,0 | 242,6 | 218,5 ± 17,1 |
| NF85 | 120,7 | 145,0 | 135,1 | 114,5 | 120,7 | 127,2 ± 9,8 |
| NF86 | 137,6 | 147,4 | 116,3 | 185,9 | 131,3 | 143,7 ± 18,2 |
| NF87 | 229,1 | 140,8 | 116,8 | 178,0 | 140,1 | 161,0 ± 27,3 |
| NF88 | 266,6 | 201,7 | 220,3 | 230,2 | 203,3 | 224,4 ± 11,8 |
| NF89 | 133,5 | 232,1 | 142,6 | 130,0 | 174,1 | 162,5 ± 26,2 |
| NF90 | 131,8 | 124,3 | 129,8 | 145,0 | 129,8 | 132,1 ± 5,8 |
| NF91 | 238,6 | 291,7 | 225,5 | 181,4 | 163,2 | 220,1 ± 23,0 |
| NF92 | 317,8 | 235,7 | 214,3 | 215,0 | 180,1 | 232,6 ± 22,2 |
| NF93 | 100,2 | 79,5 | 130,3 | 120,2 | 87,0 | 103,4 ± 20,8 |
| NF94 | 122,2 | 112,0 | 159,0 | 157,4 | 130,3 | 136,2 ± 15,5 |
| NF95 | 150,3 | 159,0 | 164,4 | 159,3 | 159,0 | 158,4 ± 3,2 |
| NF96 | 183,2 | 241,9 | 194,4 | 259,1 | 145,7 | 204,9 ± 22,4 |

*DPR: desvio padrão relativo.

FONTE: A autora (2021).

Normalmente, polímeros com maiores massas moleculares facilitam a obtenção de nanofibras contínuas e espessas. Mas, neste estudo, as nanofibras

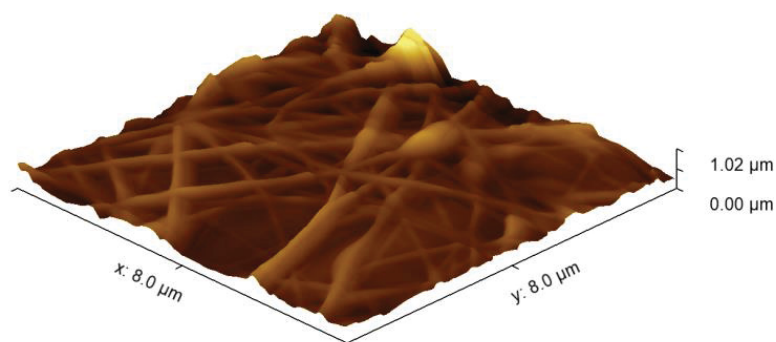
com melhores estruturas foram obtidas a partir de PVA1, que possui menor massa molecular que PVA2 (TABELA 15). No entanto, podemos observar nos espectros de RMN (FIGURA 8) e IVTF (FIGURA 10) que estes polímeros apresentam também diferentes graus de desacetilação. Esta pode ser uma das razões para a obtenção deste resultado. Uma vez que PVA1 apresenta maior porcentagem de hidrólise, ou seja, menor quantidade de monômeros acetilados, a interação entre suas cadeias é mais forte em uma solução que a interação entre moléculas que apresentam mais grupos acetil. Com interações mais fortes, as cadeias estão mais próximas, o que permite a acomodação de maior quantidade de polímero (maior concentração) com menor viscosidade, característica benéfica para o processo de eletrospinação.

Em resultados anteriores (GONÇALVES *et al.*, 2020), foi demonstrado que a glicerina reduz a hidrossolubilidade da blenda quitosana/PVA, o que também é desejável uma vez que estes scaffolds servem de suporte para o crescimento de células em meio aquoso. Por esse motivo a glicerina foi adicionada em todas as formulações. No entanto, menores quantidades de glicerina forneceram fibras com melhores estruturas, o que pode ser devido ao fato de a glicerina apresentar efeito semelhante à presença dos grupos acetil. Em soluções poliméricas, a glicerina se posiciona entre as cadeias dos polímeros, reduzindo a tensão superficial da solução (IFUKU *et al.*, 2014). De uma forma geral, o aumento do calibre da agulha melhorou a qualidade das nanofibras depositadas, podendo ser considerada uma estratégia para a obtenção de nanofibras mais espessas.

4.1.3.2. Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Confocal (MC)

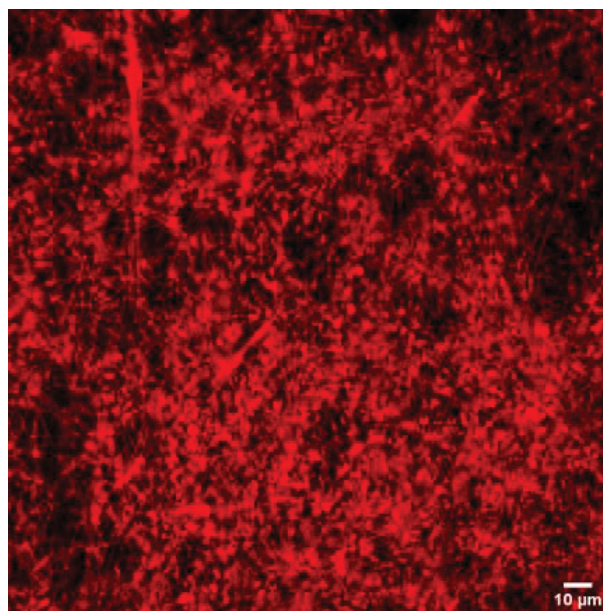
A análise de MFA também foi utilizada para visualizar as nanofibras de um dos scaffolds obtidos. A partir de um corte transversal nas imagens topográficas, é possível observar a espessura das nanofibras. A espessura de NF83 foi de 214 ± 86 nm (FIGURA 23), valor ligeiramente maior que os obtidos por MEV devido ao efeito de convolução resultante das interações entre a ponta do cantilever e a amostra (EATON & WEST, 2010). Na FIGURA 24, pode-se observar através da imagem de MC que a quitosana (marcada com rodamina) se distribui uniformemente por todo o scaffold.

FIGURA 23. IMAGEM DE NF83 OBTIDA A PARTIR DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 24. IMAGEM DE NF83 OBTIDA A PARTIR DE MICROSCOPIA CONFOCAL.



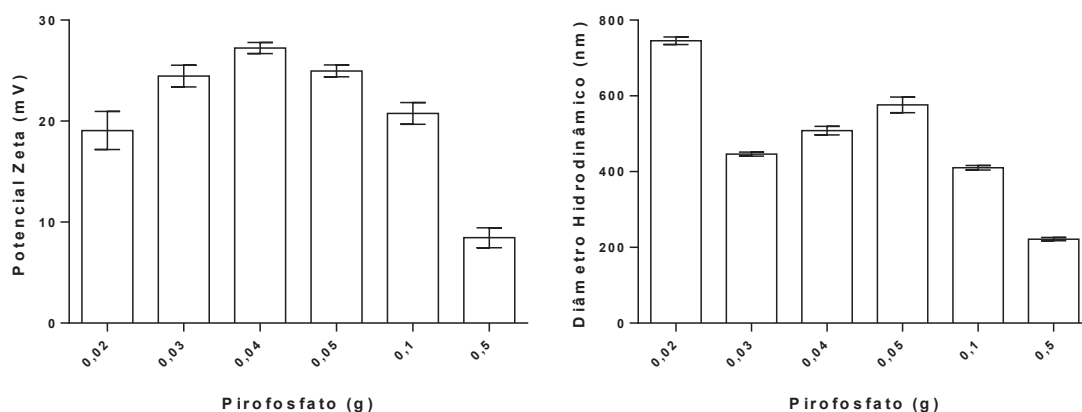
FONTE: A autora (2021).

4.2 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA, CONTENDO ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) E FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (FGFb)

Os resultados de potencial zeta e tamanho, obtidos para todas as formulações de nanopartículas de quitosana são mostrados nos GRÁFICOS 4 - 13. Todas as partículas obtidas com quitosana/pirofosfato foram encontradas na escala coloidal (menor que 1 μm) e apresentaram valores de potencial zeta positivos, entre

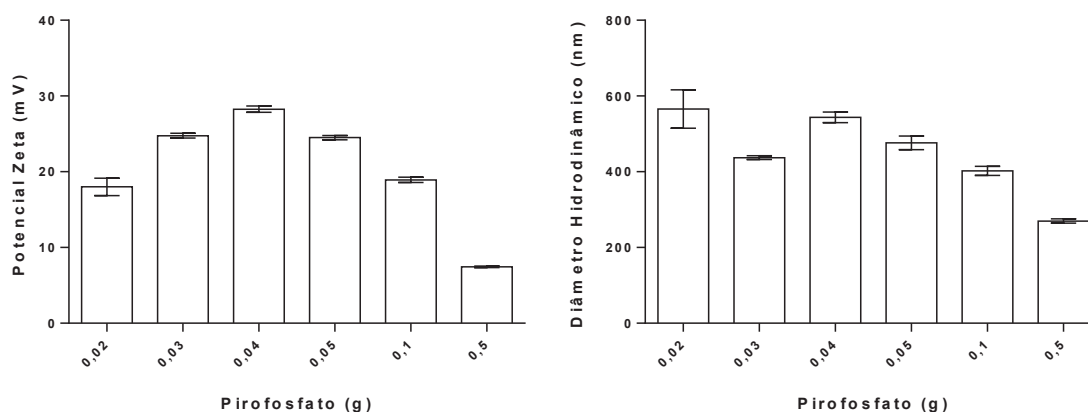
9 ± 1 e $28,4 \pm 0,4$ mV (GRÁFICOS 4 e 5). Os mesmos padrões de distribuição de tamanho e de carga superficial foram observados em ambas as ordens de gotejamento (GRÁFICOS 4 e 5).

GRÁFICO 4. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO OBTIDO POR DLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO PIROFOSFATO SOBRE A QUITOSANA.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 5. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO OBTIDO POR DLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O PIROFOSFATO.



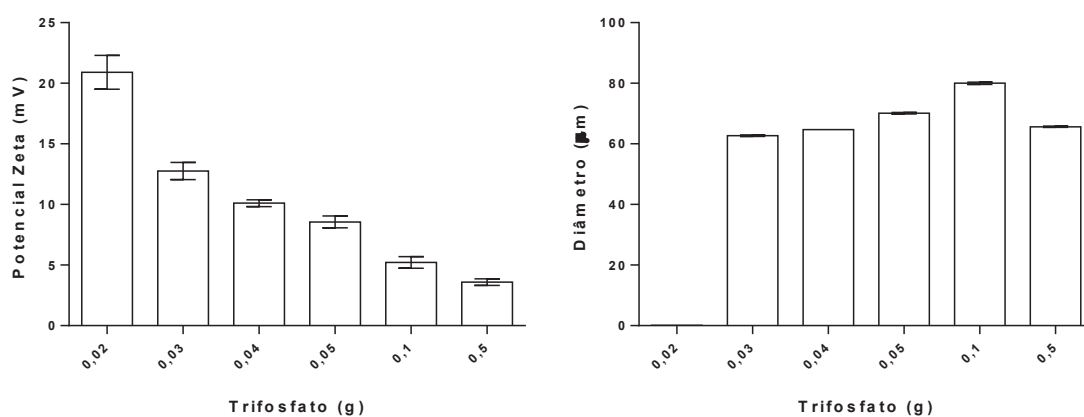
FONTE: A autora (2021).

As partículas de quitosana/trifosfato também apresentaram o mesmo comportamento em ambas as ordens de gotejamento (GRÁFICOS 6 e 7) e apenas valores positivos de potencial zeta, entre $3,51 \pm 0,27$ e $20,30 \pm 1,40$ mV. Esses valores de potencial zeta estão de acordo com os encontrados na literatura (HEJAJI, SMITH & MORRIS, 2017), uma vez que não foram encontradas partículas estáveis de quitosana/trifosfato carregadas negativamente. O menor valor de

potencial zeta foi encontrado por Silva *et al.* (2013), que fizeram partículas de quitosana/trifosfato (na proporção 1:8) e obtiveram um valor de potencial zeta de $-2,10 \pm 7,45$ mV. Partículas de quitosana/trifosfato carregadas negativamente podem ser obtidas com o uso de pectina (RASHIDIPOUR *et al.*, 2019), alginato (BAGRE, JAIN & JAIN, 2013) e poli(ácido acrílico) (WU *et al.*, 2019).

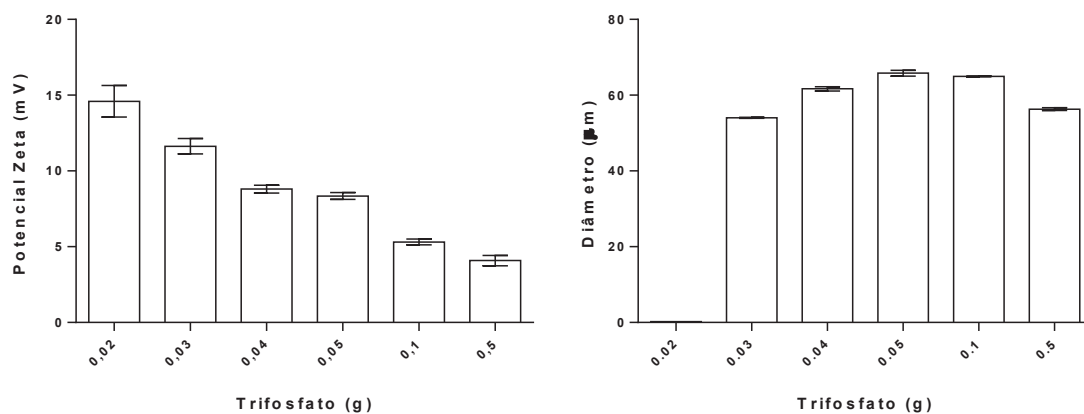
Além disso, nossas partículas apresentaram diâmetro médio entre 60 e 80 μm , tamanho muito superior aos valores apresentados na literatura para partículas com a mesma composição (BAY STIE *et al.*, 2019; SANG *et al.*, 2019).

GRÁFICO 6. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO TRIFOSFATO SOBRE A QUITOSANA.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 7. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O TRIFOSFATO.



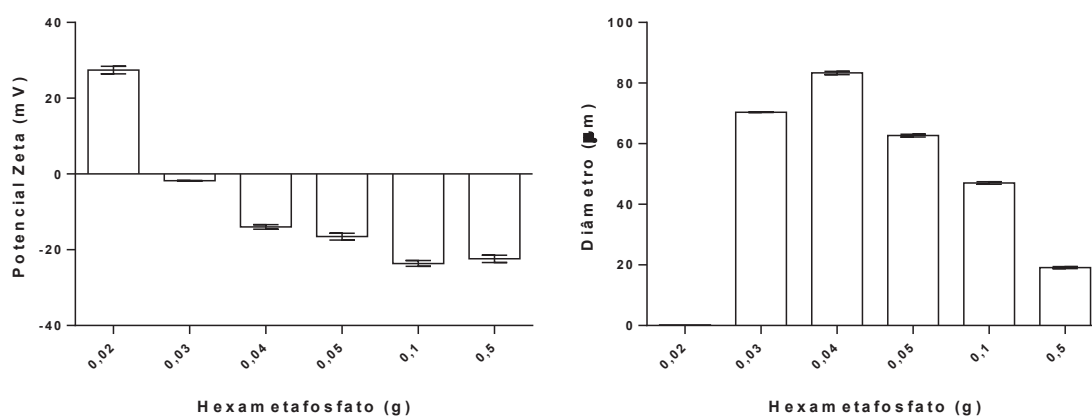
FONTE: A autora (2021).

No entanto, com o uso do hexametáfosfato e do polifosfato, foi encontrado um resultado inédito. Foi possível produzir micropartículas (com o gotejamento dos poliânions sobre a quitosana) e nanopartículas (com o gotejamento da quitosana sobre os poliânions) carregadas negativamente (GRÁFICOS 8, 9, 10 e 11). Com a concentração de 0,02 g de poliânions o valor do potencial zeta foi positivo, com 0,03 g o valor do potencial zeta foi próximo a 0 mV, mas a partir de 0,04 g o valor de potencial zeta foi negativo. Foram produzidas nanopartículas estáveis com um valor de potencial zeta igual a $-23,70 \pm 0,75$ mV usando o hexametáfosfato (0,1 g) e $-29,40 \pm 1,93$ mV usando o polifosfato (0,1 g). Sang *et al.* (2019) não mostraram valores de potencial zeta negativos para suas partículas de quitosana/hexametáfosfato, uma vez que a solução de hexametáfosfato foi adicionada à solução de quitosana, e não o contrário.

Outro achado interessante foi que ao gotejar o hexametáfosfato sobre a quitosana, micropartículas da ordem de 20 a 80 μm foram obtidas (GRÁFICO 8). Enquanto que ao gotejar a quitosana sobre o hexametáfosfato, ou seja, a carga positiva sobre a negativa, foram obtidas nanopartículas de aproximadamente 120 nm de diâmetro (GRÁFICO 9). Isso também aconteceu com as partículas de quitosana/polifosfato. No entanto, as partículas obtidas pelo gotejamento do polifosfato sobre a quitosana (GRÁFICO 10) apresentaram tamanho máximo em torno de 50 μm com a concentração de polifosfato de 0,03 g (resultado não mostrado), enquanto que o gotejamento da quitosana sobre o polifosfato gerou partículas com um tamanho médio de 150 nm (GRÁFICO 11).

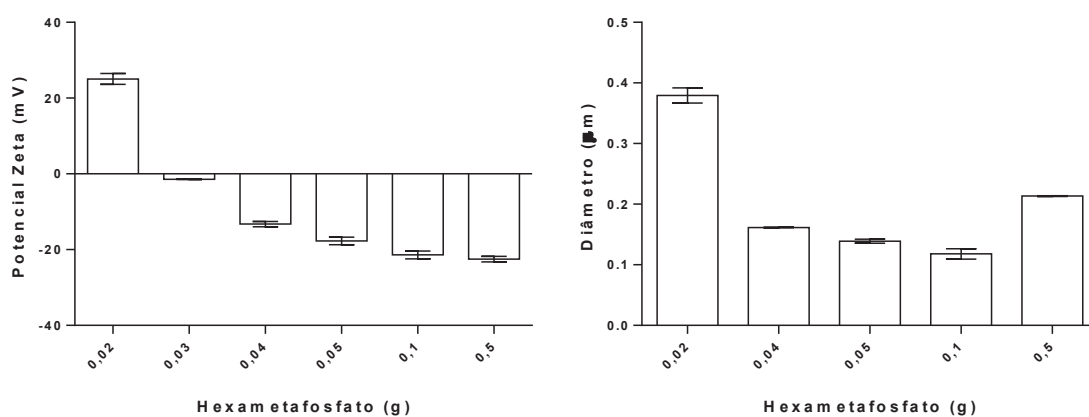
Esses resultados podem ser pelo fato de não haver inversão de carga na solução durante o gotejamento da quitosana sobre os fosfatos, o que favoreceria a agregação das partículas ao atingir o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas, como aconteceu com o gotejamento da solução negativa sobre a positiva (fosfatos sobre a quitosana).

GRÁFICO 8. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO HEXAMETAFOSFATO SOBRE A QUITOSANA.



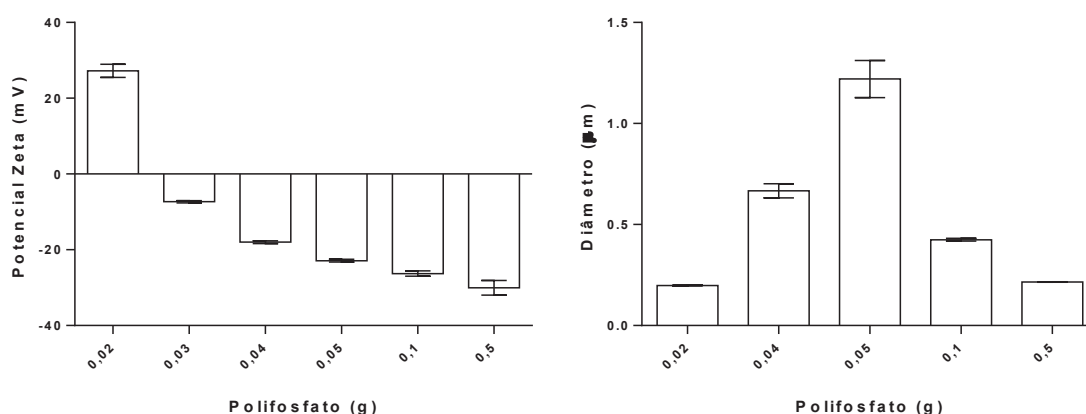
FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 9. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O HEXAMETAFOSFATO.



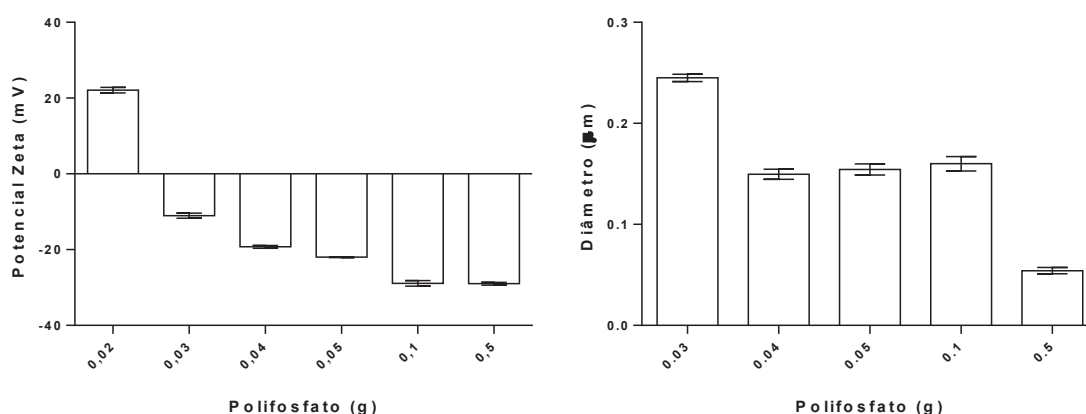
FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 10. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO POLIFOSFATO SOBRE A QUITOSANA.



FONTE: A autora (2021).

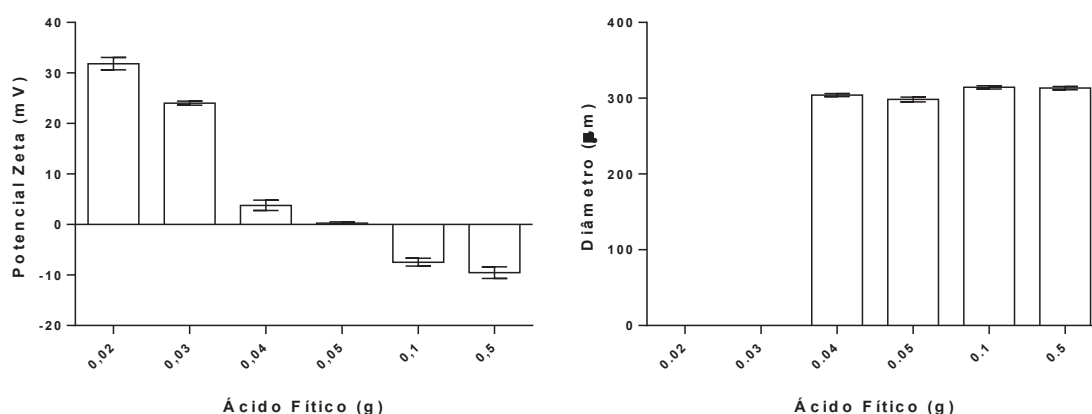
GRÁFICO 11. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O POLIFOSFATO.



FONTE: A autora (2021).

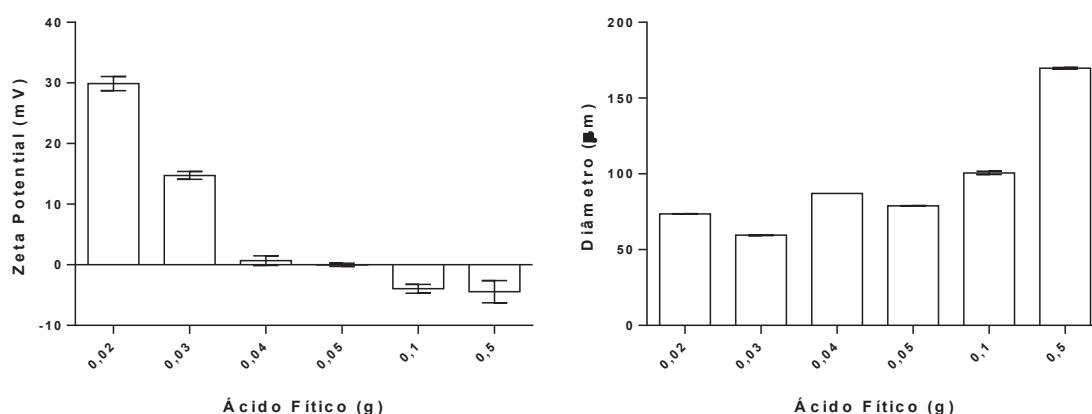
Com o uso do ácido fítico, foi possível obter partículas com carga positiva e partículas com carga negativa (GRÁFICOS 12 e 13). Com o gotejamento do ácido fítico sobre a quitosana, em baixas concentrações de poliânion, observamos a formação de nanopartículas com tamanho médio de 150 nm. Mas, a partir de 0,04 g de ácido fítico, todas as formulações se apresentaram como micropartículas com 300 µm de diâmetro (GRÁFICO 12). Por outro lado, com o gotejamento da quitosana sobre o ácido fítico, os diâmetros das micropartículas obtidas variaram entre 60 e 170 µm (GRÁFICO 13).

GRÁFICO 12. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DO ÁCIDO FÍTICO SOBRE A QUITOSANA.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 13. POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO OBTIDO POR LALLS DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR GOTEJAMENTO DA QUITOSANA SOBRE O ÁCIDO FÍTICO.



FONTE: A autora (2021).

As partículas escolhidas para o encapsulamento de BSA e, posteriormente, de FGfb foram as obtidas a partir do gotejamento da quitosana sobre o hexametáfosfato e o polifosfato, que apresentaram diâmetro e potencial zeta de 123 nm e - 21,5 mV e 162 nm e - 29 mV, respectivamente. As nanopartículas contendo BSA e FGfb mantiveram o mesmo tamanho e carga superficial. Essas nanopartículas foram as escolhidas porque as proteínas BSA e FGfb apresentam carga positiva (no pH 4 em que as nanopartículas foram formadas) e, então sua eficiência de encapsulação é mais alta nas nanopartículas carregadas negativamente.

Quanto à eficiência da encapsulação da albumina do soro bovino, no sobrenadante das nanopartículas de quitosana e hexametáfosfato foi encontrado 0,5% e no precipitado 85,71% de BSA. Nas nanopartículas de quitosana e polifosfato, 2,5% de BSA foi encontrado no sobrenadante e 92,86% no precipitado. A eficiência de encapsulação encontrada foi muito superior à encontrada na literatura para partículas de quitosana carregadas positivamente (RAMPINO *et al.*, 2013).

4.3 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA

O método proposto para a quantificação do óleo essencial de lavanda foi seletivo uma vez que o linalol apresentou um tempo de retenção distinto dos outros compostos presente na matriz e apresentou 99,68% de pureza espectral. A análise de regressão linear mostrou que o método é linear na faixa de 1.294 a 99,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9983. O ajuste de regressão (p-valor <0,05) e a falta de ajuste (p-valor = 0,316) indicam que o modelo linear é significativo e o erro é aleatório, respectivamente. Os dados mostraram-se homocedásticos (p-valor = 0,735, teste de Brown-Forsythe) e com normalidade residual (p-valor = 0,311, teste de Anderson-Darling). Por meio do teste F (TABELA 17), a comparação entre a curva de calibração do linalol na matriz e na solução apresentou variâncias iguais em altos (p-valor = 0,106), médios (p-valor = 0,909) e baixos (p-valor = 0,158) níveis de concentração. Portanto, foi possível realizar a comparação entre o coeficiente angular da curva de calibração em solução e na matriz, mostrando-se ausência de significância estatística (p-valor = 0,496, teste t de Student), implicando na ausência de efeito de matriz. O LD para o linalol obtido na regressão foi de 41,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o LQ foi fixado na menor concentração da curva de calibração (99,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, S/R 234,9). A exatidão variou entre 98,92 a 101,19%. O desvio padrão relativo obtido na repetibilidade ficou entre 2,50 e 1,56%. A precisão intermediária entre os diferentes dias não apresentou significância estatística (p-valor > 0,05 pelo teste F). A partir do gráfico de Pareto e plotagens de meia-normal dos testes de robustez, foi possível detectar um efeito significativo no teor de linalol (para comprimento de onda) e no fator de retenção (para temperatura e inclinação do gradiente). A mudança de $\pm 0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ do fluxo de eluição não influencia no teor e o fator de retenção de forma significativa. Após analisar a estabilidade da solução durante cinco horas, o teor de

linalol não apresentou alteração significativa (teste t de Student p-valor = 0,116). Portanto, a solução de linalol foi considerada estável dentro deste período.

TABELA 17. COEFICIENTES DA EQUAÇÃO E SIGNIFICÂNCIA DOS EFEITOS POR ANOVA.

| | Coefficiente codificado | Soma quadrática | GL | Média quadrática | F-valor | p- valor |
|------------|------------------------------------|----------------------------|-----------|-----------------------------|----------------|---------------------|
| Modelo | (Eficiência) ^{2,81} = | 9.485x10 ⁸ | 6 | 1.581x10 ⁸ | 30523.82 | 0.0044 |
| A | + 5905.22 * A | 2.790x10 ⁸ | 1 | 2.790x10 ⁸ | 53870.10 | 0.0027 |
| B | + 3183.63 * B | 8.108x10 ⁷ | 1 | 8.108x10 ⁷ | 15657.37 | 0.0051 |
| C | - 2557.94 * C | 5.234x10 ⁷ | 1 | 5.234x10 ⁷ | 10107.78 | 0.0063 |
| AB | + 520.50 * AB | 2.167x10 ⁶ | 1 | 2.167x10 ⁶ | 418.53 | 0.0311 |
| AC | - 7265.49 * AC | 4.223x10 ⁸ | 1 | 4.223x10 ⁸ | 81546.34 | 0.0022 |
| BC | - 3735.90 * BC | 1.117x10 ⁸ | 1 | 1.117x10 ⁸ | 21560.78 | 0.0043 |
| Intercepto | + 17076.14 | - | - | - | - | - |

A = PCL; B = Span 80; C = Tween 80, GL = grau de liberdade.

FONTE: Allan Michael Junkert (2021).

O método cromatográfico validado foi usado para quantificar o linalol no sobrenadante das oito diferentes formulações de nanocápsulas de acordo com o planejamento fatorial. A EE% obtida de todas as nanocápsulas foi usada para construir a superfície de resposta (FIGURA 25), que variou de 3,68% a 43,51%. Esta faixa de eficiência de encapsulamento é semelhante à faixa obtida por Pinto *et al.* (2016) que produziram nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de *L. sidoides* pelo método de emulsificação-difusão.

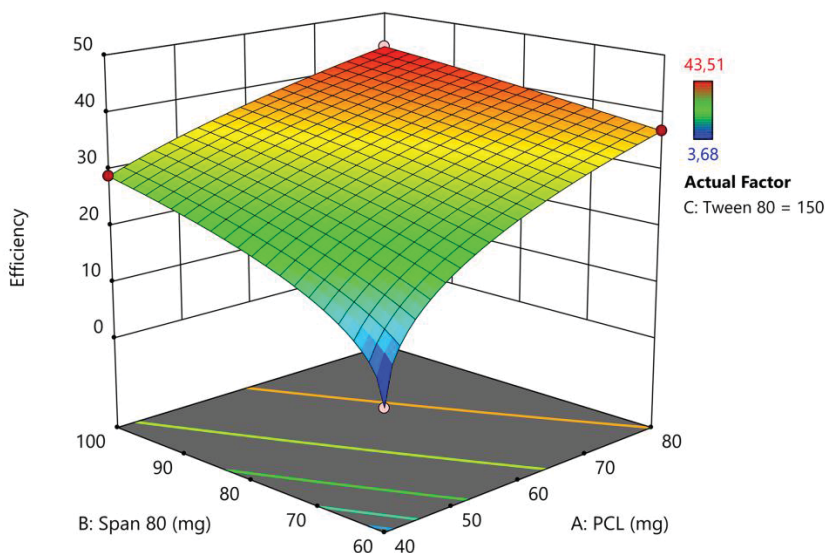
Todos os dados do modelo de regressão para a superfície de resposta foram transformados usando a potência de 2,81 para o ajuste dos dados. Todos os efeitos até a segunda ordem foram significativos (p-valor <0,05). O R² e o R²-ajustados obtidos foram 1, com R²-previsto de 0,9997, sugerindo um ajuste de regressão adequado. Os coeficientes de regressão são mostrados na equação:

$$EE\%_{2,48} = 5905,22A + 3183,63B - 2557,94C + 520,50AB - 7265,49AC - 3735,90BC + 17076,14$$

Com base nos resultados obtidos, todos os fatores (PCL, Span[®] 80 e Tween[®] 80) afetaram a eficiência de encapsulação do óleo essencial de lavanda. A combinação que apresentou a melhor eficiência (43,51%) consistiu na combinação

de 80 mg de PCL, 100 mg de Span[®] 80 e 150 mg de Tween[®] 80 juntamente com 20 g de acetona, 50 g de água, 500 mg de óleo essencial (formulação NC05).

FIGURA 25. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA USANDO PCL, SPAN[®] 80 E TWEEN[®] 80 (MG).

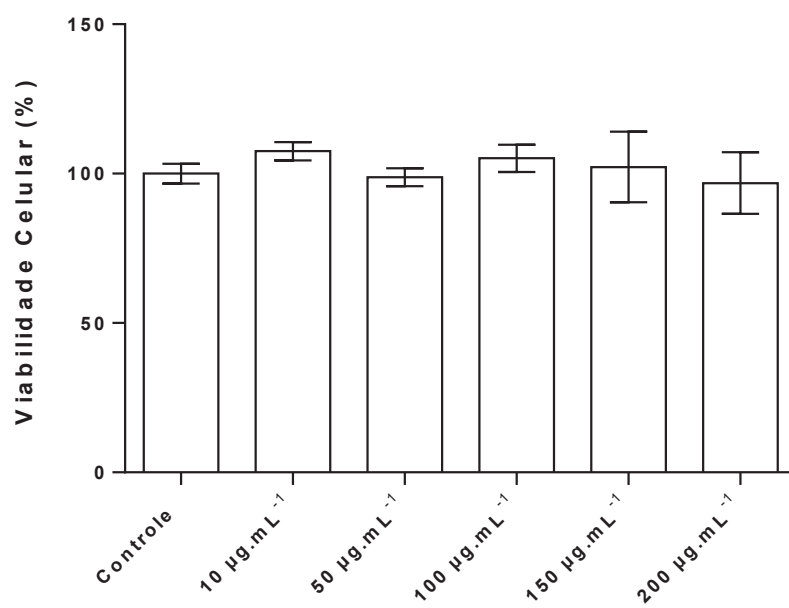


FONTE: Allan Michael Junkert (2021).

NC05 apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de $259,5 \pm 7,4$ nm, tamanho próximo ao encontrado por Ephrem *et al.* (2014) que produziu nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de alecrim. O valor do índice de polidispersão obtido foi de $0,148 \pm 0,03$, o que caracteriza uma formulação monodispersa e, o valor do potencial zeta encontrado foi de $-32,12 \pm 0,97$ em pH $4,29 \pm 0,14$, o que indica estabilidade da formulação por evitar a agregação de nanocápsulas (COVIELLO *et al.*, 2015).

De acordo com a análise de citotoxicidade de NC05 pelo método do MTT (GRÁFICO 14), não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nas concentrações testadas e o controle (fibroblastos embrionários de camundongo NIH 3T3 tratados apenas com o meio de cultura suplementado). Resultados semelhantes foram encontrados por Balasubramanian & Kkodam (2014), que avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial de *L. angustifolia* na mesma linhagem celular.

GRÁFICO 14. VIABILIDADE CELULAR (%) DE CÉLULAS NIH-3T3 TRATADAS COM AS NANOCÁPSULAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.



FONTE: A autora (2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto aos *scaffolds* obtidos, a amostra que apresentou maior rendimento na deposição, com nanofibras contínuas e espessas (aproximadamente 268 nm), foi produzida a partir da quitosana bruta e do poli(álcool vinílico) de menor massa molecular, mas maior grau de desacetilação na proporção 1:3,5, menor concentração de glicerina, maior calibre de agulha e com ultrafiltração da solução final. A partir desses resultados, pode-se sugerir que:

- Maiores calibres de agulha podem facilitar a produção de nanofibras pelo processo de eletrospinação;
- O grau de hidrólise do poli(álcool vinílico) pode ser mais importante que a massa molecular para a obtenção de nanofibras espessas e contínuas;
- Embora a glicerina seja capaz de reduzir a hidrossolubilidade da blenda quitosana/poli(álcool vinílico), ela também parece desorganizar as cadeias poliméricas em meio aquoso, dificultando o desenvolvimento do *scaffold*.

Quanto às partículas de quitosana desenvolvidas, foi possível obter nano e micropartículas tanto carregadas positivamente quanto carregadas negativamente a partir da interação com cinco diferentes poliânions, pela técnica de gelificação ionotrópica. Resumidamente:

- O uso do pirofosfato como poliânion resulta somente em nanopartículas carregadas positivamente;
- O uso do trifosfato como poliânion resulta somente em micropartículas carregadas positivamente;
- O uso do ácido fítico como poliânion resulta em nano e micropartículas carregadas positivamente e negativamente;
- Com o uso do hexametáfosfato é possível obter partículas carregadas negativamente, independente da ordem de gotejamento. No entanto, quando o poliânion é gotejado sobre a quitosana são obtidas micropartículas e quando a quitosana foi gotejada sobre o poliânion são obtidas nanopartículas;
- Com o uso do polifosfato é possível obter nanopartículas carregadas negativamente, independente da ordem de gotejamento.

A partir destes resultados, foi descrita pela primeira vez na literatura a obtenção de nanopartículas de quitosana/hexametáfosfato (123 nm e - 21 mV) e de quitosana/polifosfato (162 nm e - 29 mV) carregadas negativamente, o que

possibilita a obtenção de uma mais alta eficiência de encapsulação de proteínas carregadas positivamente.

Quanto às nanocápsulas de óleo essencial de lavanda, foram obtidas estruturas com diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 250 nm, distribuição unimodal (índice de polidispersão $0,148 \pm 0,03$), alta estabilidade coloidal (potencial zeta -32 mV), eficiência de encapsulação de 43,51% e ausência de citotoxicidade, sugerindo que sua aplicação tópica pode ser segura e eficaz para o tratamento de queimaduras.

Em razão da pandemia de COVID-19 não foi possível concluir este trabalho, com a determinação da eficiência da encapsulação do fator de crescimento fibroblástico básico nas nanopartículas, inclusão das nanoestruturas nas nanofibras e adição de fibroblastos e queratinócitos humanos aos *scaffolds* para a obtenção do produto final.

4.4 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a eficiência da encapsulação do fator de crescimento fibroblástico básico nas nanopartículas de quitosana;
- Avaliar a atividade cicatrizante *in vivo* e *in vitro* das nanopartículas contendo fator de crescimento fibroblástico básico;
- Avaliar a atividade cicatrizante *in vivo* e *in vitro* das nanocápsulas de óleo essencial de lavanda;
- Incorporar as nanopartículas contendo fator de crescimento fibroblástico básico no *scaffold* selecionado;
- Incorporar as nanocápsulas de óleo essencial de lavanda no *scaffold* selecionado;
- Avaliar os nanocompósitos obtidos;
- Incorporar fibroblastos e queratinócitos no substituto cutâneo.

REFERÊNCIAS

ABD EL-HACK, M. E., EL-SAADONY, M. T., SHAFI, M. E., ZABERMAWI, N. M., ARIF, M., BATIHA, G. E., KHAFAGA, A. F., ABD EL-HAKIM, Y. M., & AL-SAGHEER, A. A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726-2744, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>. Acesso em: 12 ago. 2021.

ABDULGHANI, S. & MITCHELL, G. R. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 750, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9110750>. Acesso em: 12 ago. 2021.

AJALLOUEIAN, F., TAVANAI, H., HILBORN, J., DONZEL-GARGAND, O., LEIFER, K., WICKHAM, A., & ARPANAEI, A. Emulsion electrospinning as an approach to fabricate PLGA/chitosan nanofibers for biomedical applications. **BioMed Research International**, 2014, 475280, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/475280>. Acesso em: 12 ago. 2021.

ALI, A., SHAHID, M.A., HOSSAIN, M.D., & ISLAM, M.N. Antibacterial bi-layered polyvinyl alcohol (PVA)-chitosan blend nanofibrous mat loaded with *Azadirachta indica* (neem) extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 13-20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.015>. Acesso em: 12 ago. 2021.

AMANI, H., DOUGHERTY, W. R., & BLOME-EBERWEIN, S. Use of Transcyte® and dermabrasion to treat burns reduces length of stay in burns of all size and etiology. **Burns**, v. 32, n. 7, p. 828-832, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.04.003>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ANTER, H. M., ABU HASHIM, I. I., AWADIN, W., & MESHALI, M. M. Novel chitosan oligosaccharide-based nanoparticles for gastric mucosal administration of the phytochemical "apocynin". **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4911–4929, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S209987>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ANTUNES, B. P., MOREIRA, A. F., GASPAR, V. W., & CORREIA, I. J. Chitosan/arginine–chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 104-112, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.072>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ARCHANA, D., SINGH, B. K., DUTTA, J., & DUTTA, P. K. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 49-57, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.055>. Acesso em: 11 ago. 2021.

BAGRE, A. P., JAIN, K., & JAIN, N. K. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 31-40, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.037>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BALASUBRAMANIAN, K. & KODAM, K.M. Encapsulation of therapeutic lavender oil in an electrolyte assisted polyacrylonitrile nanofibres for antibacterial applications. **RSC Advances**, v. 4, p. 54892–54901, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C4RA09425E>. Acesso em: 1 set. 2021.

BAY STIE, M., SEIR THOKE, H., ISSINGER, O-G., HOCHSCHERF, J., GUERRA, B., & OLSEN L.F. Delivery of proteins encapsulated in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles to human skin melanoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 216-223, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.005>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BELLO, Y. M., FALABELLA, A. F., & EAGLSTEIN, W. H. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 5, p. 305-313, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00128071-200102050-00005>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BENINGTON, L., RAJAN, G., LOCHER, C., & LIM, L. Y. Fibroblast Growth Factor 2-A Review of Stabilisation Approaches for Clinical Applications. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, 508, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060508>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BIAŁOŃ, M., KRZYŚKO-ŁUPICKA, T., NOWAKOWSKA-BOGDAN, E., & WIECZOREK, P. P. Chemical Composition of Two Different Lavender Essential Oils and Their Effect on Facial Skin Microbiota. **Molecules**, v. 24, n. 18, 3270, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24183270>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BIANCHI, C., CAZZELL, S., VAYSER, D., REYZELMAN, A. M., DOSLUOGLU, H., TOVMASSIAN, G., & EPIFIX VLU STUDY GROUP. A multicentre randomised controlled trial evaluating the efficacy of dehydrated human amnion/chorion membrane (EpiFix®) allograft for the treatment of venous leg ulcers. **International wound journal**, v. 15, n. 1, p. 114-122, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iwj.12843>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BOCHEVA, G., SLOMINSKI, R. M., & SLOMINSKI, A. T. Neuroendocrine Aspects of Skin Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2798, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112798>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BROWN, M. M., & HORSWILL, A. R. Staphylococcus epidermidis-Skin friend or foe?. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 11, e1009026, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009026>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CALVO, P., REMUÑAN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L., & ALONSO, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1431-1436, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1012128907225>. Acesso em: 09 ago. 2021.

CARVALHO, I. T., ESTEVINHO, B. N., & SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 2, p. 109-119, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ics.12232>. Acesso em: 31 ago. 2021.

CENTANNI, J. M., STRASESKI, J. A., WICKS, A., HANK, J. A., RASMUSSEN, C. A., LOKUTA, M. A., SCHURR, M. J., FOSTER, K. N., FAUCHER, L. D., CARUSO, D. M., COMER, A. R., & ALLEN-HOFFMANN, B. L. StrataGraft skin substitute is well-tolerated and is not acutely immunogenic in patients with traumatic wounds: results

from a prospective, randomized, controlled dose escalation trial. **Annals of Surgery**, v. 253, n. 4, p. 672–683, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318210f3bd>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CHANG, D. K., LOUIS, M. R., GIMENEZ, A., & REECE, E. M. The Basics of Integra Dermal Regeneration Template and its Expanding Clinical Applications. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 33, n. 3, p. 185-189, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693401>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CHAUDHARI, A. A., VIG, K., BAGANIZI, D. R., SAHU, R., DIXIT, S., DENNIS, V., SINGH, S. R., & PILLAI, S. R. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 1974, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CHEN, K-Y., & ZENG, S-Y. Fabrication of Quaternized Chitosan Nanoparticles Using Tripolyphosphate/Genipin Dual Cross-Linkers as a Protein Delivery System. **Polymers**, v. 10, 1226, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym10111226>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CHEN, Q., WU, J., LIU, Y., LI, Y., ZHANG, C., QI, W., YEUNG, K. W. K., WONG, T. M., ZHAO, X., & PAN, H. Electrospun chitosan/PVA/bioglass Nanofibrous membrane with spatially designed structure for accelerating chronic wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, 110083, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110083>. Acesso em: 09 ago. 2021.

CHOCARRO-WRONA C, LÓPEZ-RUIZ E, PERÁN M, GÁLVEZ-MARTÍN P, & MARCHAL JA. Therapeutic strategies for skin regeneration based on biomedical substitutes. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 3, p. 484-496, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jdv.15391>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CLEETON, C., KEIROUZ, A., CHEN, X., & RADACSI, N. (2019). Electrospun Nanofibers for Drug Delivery and Biosensing. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, p. 4183-4205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00853>. Acesso em: 16 ago. 2021.

CONGDON, T., SHAW, P., & GIBSON, M. I. Thermoresponsive, well-defined, poly(vinyl alcohol) co-polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 26, p. 4749-4757, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C5PY00775E>. Acesso em: 09 ago. 2021.

COVIELLO, T., TROTTA, A. M., MARIANECCI, C., CARAFA, M., DI MARZIO, L., RINALDI, F., DI MEO, C., ALHAIQUE, F., & MATRICARDI, P. Gel-embedded niosomes: preparation, characterization and release studies of a new system for topical drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 125, p. 291-299, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.060>. Acesso em: 01 set. 2021.

COZZOLINO, C. A.; NILSSON, F.; PIGA, A.; PIERGIOVANNI, L.; & FARRIS, S. Dye release behavior from polyvinyl alcohol films in a hydro-alcoholic medium: Influence of physicochemical heterogeneity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 403, p. 45-53, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.03.054>. Acesso em: 12 ago. 2021.

DAI, C., SHIH, S., & KHACHEMOUNE, A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. **Journal of Dermatological Treatment**. v. 31, n. 6, p. 639-648, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>. Acesso em: 11 ago. 2021.

DALLA-CORTE, L. M., FLEURY, B. A. G., HUANG, M., ADORNO, J., & MODELLI, M. E. S. Perfil epidemiológico de vítimas de queimaduras internadas em uma unidade no Distrito Federal do Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 18, n. 1, p. 10-15, 2019. Disponível em: <http://www.rbqueimaduras.com.br/details/453/pt-BR/perfil-epidemiologico-de-vitimas-de-queimaduras-internadas-em-uma-unidade-no-distrito-federal-do-brasil>. Acesso em: 11 ago. 2021.

DeMERLIS, C. C. & SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 319-326, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00258-2). Acesso em: 11 ago. 2021.

DOMASZEWSKA-SZOSTEK, A. P., KRZYŻANOWSKA, M. O., CZARNECKA, A. M., & SIEMIONOW, M. Local Treatment of Burns with Cell-Based Therapies Tested in

Clinical Studies. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 3, 396, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm10030396>. Acesso em: 16 ago. 2021.

DRĄG-ZALESIŃSKA, M., REMBIAŁKOWSKA, N., BORSKA, S., SACZKO, J., DRĄG, M., POREBA, M., & KULBACKA, J. (2019). A New Betulin Derivative Stimulates the Synthesis of Collagen in Human Fibroblasts Stronger than its Precursor. **In vivo**, v. 33, n. 4, p. 1087–1093, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/invivo.11577>. Acesso em: 31 ago. 2021.

DU, Z., LIU, J., ZHANG, T., YU, Y., ZHANG, Y., ZHAI, J., HUANG, H., WEI, S., DING, L., & LIU, B. A study on the preparation of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and its encapsulation mechanism for egg white derived peptides. **Food Chemistry**, v. 286, p. 530–536, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.012>. Acesso em: 16 ago. 2021.

DUAN, B., WU, L., LI, X., YUAN, X., LI, X., ZHANG, Y., & YAO, K. Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 18, n. 1, p. 95-115, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1163/156856207779146105>. Acesso em: 11 ago. 2021.

DURU KAMACI, U. & PEKSEL, A. Fabrication of PVA-chitosan-based nanofibers for phytase immobilization to enhance enzymatic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3315-3322, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.226>. Acesso em: 09 ago. 2021.

DYRING-ANDERSEN, B., LØVENDORF, M. B., COSCIA, F., SANTOS, A., MØLLER, L., COLAÇO, A. R., NIU, L., BZOREK, M., DOLL, S., ANDERSEN, J. L., CLARK, R. A., SKOV, L., TEUNISSEN, M., & MANN, M. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 5587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19383-8>. Acesso em: 16 ago. 2021.

DZIEMIDOWICZ, K., SANG, Q., WU, J., ZHANG, Z., ZHOU, F., LAGARON, J. M., MO, X., PARKER, G. J. M., YU, D. G., ZHU, L. M., & WILLIAMS, G. R. Electrospinning for healthcare: recent advancements. **Journal of Materials**

Chemistry B, v. 9, n. 4, p. 939-951, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0tb02124e>. Acesso em: 16 ago. 2021.

EATON, P. & WEST, P. Atomic Force Microscopy. Oxford: **Oxford University Press**, 2010.

EDGREN, D., ZHU, P. C., STRUBLE, E., FRAME, R., & ZHANG, Y. De-acetylated PVA for Pharmaceutical Hydrogel Applications. **Journal of Macromolecular Science**, v. 47, p. 6, p. 545-551, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10601321003742204>. Acesso em: 09 ago. 2021.

EPHREM, E., GREIGE-GERGES, H., FESSI, H., & CHARCOSSET, C. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 8, p. 746–753, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.918669>. Acesso em: 31 ago. 2021.

ERBATUR, S., COBAN, Y. K., & AYDIN, E. N. Comparison of clinical and histopathological results of hyalomatrix usage in adult patients. **International Journal of Burns and Trauma**, v. 2, n. 2, p. 118–125, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462522/pdf/ijbt0002-0118.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2021.

FAN, C., PEK, C. H., POR, Y. C., & LIM, G. Biobrane dressing for paediatric burns in Singapore: a retrospective review. *Singapore Medical Journal*, v. 59, n. 7, p. 360-365, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11622/smedj.2017116>. Acesso em: 16 ago. 2021.

FATHI, A., KHANMOHAMMADI, M., GOODARZI, A., FOROUTANI, L., MOBARAKEH, Z. T., SAREMI, J., ARABPOUR, Z., & AI, J. Fabrication of chitosan-polyvinyl alcohol and silk electrospun fiber seeded with differentiated keratinocyte for skin tissue regeneration in animal wound model. **Journal of Biological Engineering**, v. 14, n. 1, p. 27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-00249-y>. Acesso em: 12 ago. 2021.

FATHOLLAHIPOUR, S., ABOUEI MEHRIZI, A., GHAEI, A., & KOOSHA, M. Electrospinning of PVA/chitosan nanocomposite nanofibers containing gelatin

nanoparticles as a dual drug delivery system. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 103, n. 12, p. 3852-3862, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35529>. Acesso em: 12 ago. 2021.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N., & BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0). Acesso em: 31 ago. 2021.

GHOLIPOUR-KANANI, A., BAHRAMI, S. H., & RABBANI, S. Effect of novel blend nanofibrous scaffolds on diabetic wounds healing. **IET Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0066>. Acesso em: 12 ago. 2021.

GOODARZI, P., FALAHZADEH, K., NEMATIZADEH, M., FARAZANDEH, P., PAYAB, M., LARIJANI, B., TAYANLOO BEIK, A., & ARJMAND, B. Tissue Engineered Skin Substitutes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1107, p. 143-188, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/5584_2018_226. Acesso em: 11 ago. 2021.

GOUDARZIR, E. H., MONTAZER, M., LAFTIFI, M., & AGHAJI, A. A. G. Electrospinning of Chitosan/Sericin/PVA Nanofibers Incorporated with in Situ Synthesis of Nano Silver. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 231-239, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.082>. Acesso em: 12 ago. 2021.

GONÇALVES, M. M., CARNEIRO, J., JUSTUS, B., ESPINOZA, J. T., BUDEL, J. M., FARAGO, P.V., & PAULA, J. P. Preparation and characterization of a novel antimicrobial film dressing for wound healing application. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, e18784, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000118784>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GONÇALVES, M. M., JUNKERT, A. M., ADAM, L. M., MARCONDES, T. V. B., ADAO, K. E. M., SHIMIZU, P. H., PONTAROLO, R. & MALUF, D. F. Lavandula angustifolia essential oil-loaded nanocapsules and biological activity on fibroblasts.

International Journal of Development Research. v. 11, p. 46106-46110, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37118/ijdr.21561.04.2021>. Acesso em: 28 nov. 2021.

GRAÇA, M. F. P., MIGUEL, S. P., CABRAL, C. S. D., & CORREIA, I. J. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 241, 116364, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>. Acesso em: 11 ago. 2021.

GREENHALGH, D. G. Management of Burns. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 24, p. 2349–2359, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmra1807442>. Acesso em: 11 ago. 2021.

GRICE, E. A., & SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>. Acesso em: 16 ago. 2021.

GRONBACH, L., JURMEISTER, P., SCHÄFER-KORTING, M., KEILHOLZ, U., TINHOFER, I., & ZOSCHKE, C. Primary Extracellular Matrix Enables Long-Term Cultivation of Human Tumor Oral Mucosa Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 579896, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579896>. Acesso em: 16 ago. 2021.

HEJJAJI, E.M.A., SMITH A.M., & MORRIS, G.A. Designing chitosan-tripolyphosphate microparticles with desired sizefor specific pharmaceutical or forensic applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 564-573, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.092>. Acesso em: 10 ago. 2021.

HONG, J., YEO, M., YANG, G. H., & KIM, G. Cell-Electrospinning and Its Application for Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, 6208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20246208>. Acesso em: 11 ago. 2021.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>. Acesso em: 11 ago. 2021.

HOSSEINI, S.F., SOLEIMANI, M.R., & NIKKHAH, M. Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles as eficiente vehicles for antioxidant peptidic fraction from common kilka. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 730-737, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.023>. Acesso em: 11 ago. 2021.

HUANG, S. & FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 149-159, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.018>. Acesso em: 12 ago. 2021.

ICH, Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, **International Council for Harmonisation**. 1994 (2005).

IBRAHIM, N. I., WONG, S. K., MOHAMED, I. N., MOHAMED, N., CHIN, K. Y., IMA-NIRWANA, S., & SHUID, A. N. Wound Healing Properties of Selected Natural Products. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, 2360, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph15112360>. Acesso em: 31 ago. 2021.

IFUKU, S., IKUTA, A., IZAWA, H., MORIMOTO, M., & SAIMOTO, H. Control of mechanical properties of chitin nanofiber film using glycerol without losing its characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 714-717, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.076>. Acesso em: 10 ago. 2021.

IM, A. R., PARK, I., JI, K. Y., LEE, J. Y., KIM, K. M., NA, M., & CHAE, S. Protective effects of *Oxya chinensis sinuosa* Mishchenko against ultraviolet B-induced photodamage in hairless mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 286, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2692-4>. Acesso em: 31 ago. 2021.

JAISWAL, S., DUTTA, P.K., KUMAR, S., KOH, J., & PANDEY, S. Methyl methacrylate modified chitosan: Synthesis, characterization and application in drug

and gene delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 109–117, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.104>. Acesso em: 16 ago. 2021.

JESCHKE, M. G. & HERNDON, D. N. Burns in children: standard and new treatments. **Lancet**, v. 383, n. 9923, p. 1168-1178, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61093-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61093-4). Acesso em: 11 ago. 2021.

JIANG, Y., TSOI, L. C., BILLI, A. C., WARD, N. L., HARMS, P. W., ZENG, C., MAVERAKIS, E., KAHLBERG, J. M., & GUDJONSSON, J. E. Cytokocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. **JCI Insight**, v. 5, n. 20, e142067, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142067>. Acesso em: 16 ago. 2021.

JOHNSON, S. M., CHERRY, J. V., THOMAS, N., JAFRI, M., JARIWALA, A., & MCLEOD, G. G. Clinical outcomes and ultrasonographic viability of GraftJacket® augmented rotator cuff repair: a prospective follow-up study with mean follow-up of forty-one months. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 11, n. 3, p. S372–S377, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.09.001>. Acesso em: 16 ago. 2021.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Histologia básica, texto e atlas. 12ª edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

KANG, S. W., PARK, J. K., SHON, H. C., CHOI, E. S., KIM, D. S., & MIN, K. T. Skin graft using MatriDerm® for plantar defects after excision of skin cancer. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 2947-2950, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S198568>. Acesso em: 16 ago. 2021.

KAVAZ, D., IDRIS, M., & ONYEBUCHI, C. Physiochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus* rhizome essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 837-845, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.177>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KAVOOSI, G., NATEGHPOOR, B., DADFAR, S. M. M., & DADFAR, S. M. A. Antioxidant, Antifungal, Water Binding, and Mechanical Properties of Poly(vinyl

alcohol) Film Incorporated with Essential Oil as a Potential Wound Dressing Material. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, p. 1-8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.40937>. Acesso em: 12 ago. 2021.

KAZEMI, M.S., MOHAMMADI, Z., AMINI, M., YOUSEFI, M., TARIGHI, P., EFTEKHARI, S., & RAFIEE TEHRANI, M. Thiolated chitosan-lauric acid as a new chitosan derivative: Synthesis, characterization and cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 823-830, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.132>. Acesso em: 09 ago. 2021.

KEIROUZ, A., CHUNG, M., KWON, J., FORTUNATO, G., & RADACSI, N. 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 4, e1626, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wnan.1626>. Acesso em: 16 ago. 2021.

KHAN, A. A., KHAN, I. M., NGUYEN, P. P., LO, E., CHAHADEH, H., CERNIGLIA, M., & NORIEGA, J. A. Skin Graft Techniques. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 37, n. 4, p. 821-835, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2020.07.007>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KHAN, F., PHAM, D. T. N., OLOKETUYI, S. F., MANIVASAGAN, P., OH, J., & KIM, Y. M. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, 110627, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110627>. Acesso em: 12 ago. 2021.

KHEIRJOU, R., RAD, J. S., KHOSROSHAHI, A. F., & ROSHANGAR, L. The useful agent to have an ideal biological scaffold. **Cell and Tissue Banking**, v. 22, n. 2, p. 225-239, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09881-w>. Acesso em: 16 ago. 2021.

KIERSZENBAUM, A. & TRES, L. Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à Patologia. 4ª Edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2016.

KIM, H. S., SUN, X., LEE, J.H., KIM, H.W., FU, X., & LEONG, K. W. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced Drug**

Delivery Reviews, v. 146, p. 209-239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.014>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KINODA, J., ISHIHARA, M., NAKAMURA, S., FUJITA, M., FUKUDA, K., SATO, Y., & YOKOE, H. Protective effect of FGF-2 and low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles on radiation-induced healing-impaired wound repair in rats. **Journal of Radiation Research**, v. 59, n. 1, p. 27–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx044>. Acesso em: 16 ago. 2021.

KOIKE, Y., YOZAKI, M., UTANI, A., & MUROTA, H. Fibroblast growth factor 2 accelerates the epithelial-mesenchymal transition in keratinocytes during wound healing process. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 18545, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75584-7>. Acesso em: 16 ago. 2021.

KONG, M., CHEN, X. G., XING, K., & PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>. Acesso em: 12 ago. 2021.

KOOSHA, M. & MIRZADEH, H. Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 9, p. 3081-3093, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35443>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KOSEKI, K., KAWASAKI, H., ATSUGI, T., NAKANISHI, M., MIZUNO, M., NARU, E., EBIHARA, T., AMAGAI, M., & KAWAKAMI, E. Assessment of skin barrier function using skin images with topological data analysis. **NPJ Systems Biology and Applications**, v. 6, n. 1, 40, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41540-020-00160-8>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KOU, S. G., PETERS, L. M., & MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 85-94, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LAMMARI, N., LOUAER, O., MENIAI, A. H., & ELAISSARI, A. Encapsulation of Essential Oils via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and

Prospects. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, 431, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050431>. Acesso em: 31 ago. 2021.

LEE, C.-H., LI, Y.-J., HUANG, C.-C., & LAI, J.-Y. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule carriers with sustained drug release: single dose for long-term glaucoma treatment. **Nanoscale**, v. 9, n. 32, p. 11754–11764, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7nr03221h>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LI, R., WU, Z., WANG, Y., DING, L., & WANG, Y. Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. **Biotechnology reports**, v. 9, p. 46–52, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.01.002>. Acesso em: 16 ago. 2021.

LIANG, R., KNIGHT, K., EASLEY, D., PALCSEY, S., ABRAMOWITZ, S., & MOALLI, P. A. Towards rebuilding vaginal support utilizing an extracellular matrix bioscaffold. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 324-333, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.015>. Acesso em: 16 ago. 2021.

LICHTMAN, M. K., OTERO-VINAS, M., & FALANGA, V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 2, p. 215–222, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wrr.12398>. Acesso em: 16 ago. 2021.

LIN, H. Y. (a), CHEN, H. H., CHANG, S. H., & NI, T. S. Pectin-chitosan-PVA nanofibrous scaffold made by electrospinning and its potential use as a skin tissue scaffold. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 4, p. 470-484, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.693047>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LIN, H.Y. (b), KUO, Y. J., CHANG, S. H., NI, T. S. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 2, 025009, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/2/025009>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LOPES, A. A., FONSECA, F. N., ROCHA, T. M., FREITAS, L. B., ARAÚJO, E. V. O., WONG, D. V. T., LIMA JÚNIOR, R. C. P., LEAL, L. K. A. M. Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities

and Its Nanoformulation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/8194849>. Acesso em: 31 ago. 2021.

LOPEZ-MOYA, F., SUAREZ-FERNANDEZ, M., & LOPEZ-LLORCA, L.V. Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 332, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LU, Y., HUANG, J., YU, G., CARDENAS, R., WEI, S., WUJCIK, E. K., & GUO, Z. Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 5, p. 654–677, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wnan.1391>. Acesso em: 16 ago. 2021.

LUBAMBO, A. F., FREITAS, R. A., SIERAKOWSKI, M. R., LUCYSZYN, N., SASSAKI, G.L., SERAFIM, B.M., & SAUL, C.K. Electrospinning of commercial guar-gum: Effects of purification and filtration. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 484-491, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.031>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MALEKI H., GHAREHAGHAJI, A. A., & DIJKSTRA, P. J. A Novel Honey-Based Nanofibrous Scaffold for Wound Dressing Application. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 4086-4092, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.37601>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MALEKI DANA, P., HALLAJZADEH, J., ASEMI, Z., MANSOURNIA, M. A., & YOUSEFI B. Chitosan applications in studying and managing osteosarcoma. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 321-329, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MARTÍNEZ RIVAS, C. J., TARHINI, M., BADRI, W., MILADI, K., GREIGE-GERGES, H., NAZARI, Q. A., RODRÍGUEZ, S. A. G., ROMÁN, R. A., FESSI, H., ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66–81, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>. Acesso em: 31 ago. 2021.

MATICA, M. A., AACHMANN, F. L., TØNDERVIK, A., SLETTA, H., & OSTAFE, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, 5889, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MELE, E. Electrospinning of Essential Oils. *Polymers*, v. 12, n. 4, 908, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym12040908>. Acesso em: 16 ago. 2021.

MOGOŞANU, G. D. & GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 127-136, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MOREIRA, A., LAWSON, D., ONYEKURU, L., DZIEMIDOWICZ, K., ANGKAWINITWONG, U., COSTA, P. F., RADACSI, N., & WILLIAMS, G. R. Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 1172-1197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.046>. Acesso em: 16 ago. 2021.

MORGADO, P. I., AGUIAR-RICARDO, A., & CORREIA, I.J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. **Journal of Membrane Science**, v. 490, p. 139-151, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.04.064>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MORI, H. M., KAWANAMI, H., KAWAHATA, H., & AOKI, M. Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, 144, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1128-7>. Acesso em: 31 ago. 2021.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 31 ago. 2021.

MUXIKA, A., ETXABIDE, A., URANGA, J., GUERRERO, P., & DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>. Acesso em: 12 ago. 2021.

NGUYEN, A. V., & SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 1811, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>. Acesso em: 16 ago. 2021.

NGUYEN, H., TRUJILLO-PAEZ, J. V., UMEHARA, Y., YUE, H., PENG, G., KIATSURAYANON, C., CHIEOSILAPATHAM, P., SONG, P., OKUMURA, K., OGAWA, H., IKEDA, S., & NIYONSABA, F. Role of Antimicrobial Peptides in Skin Barrier Repair in Individuals with Atopic Dermatitis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, 7607, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21207607>. Acesso em: 16 ago. 2021.

NICHOLAS, M. N., JESCHKE, M. G., & AMINI-NIK, S. Methodologies in creating skin substitutes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 18, p. 3453–3472, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2252-8>. Acesso em: 16 ago. 2021.

OMAR, A. A., MAVOR, A. I., JONES, A. M., & HOMER-VANNIASINKAM, S. Treatment of venous leg ulcers with Dermagraft. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v., 27, n. 6, p. 666-672, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2004.03.001>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ORYAN, A., & SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104 (Pt A), p. 1003-1011, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124>. Acesso em: 12 ago. 2021.

PANT, A., & NEGI, J. S. Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- β -CD inclusion complex. **European Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 112, p. 180–185, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.020>. Acesso em: 16 ago. 2021.

PEREIRA, A. G. B., MUNIZ, E. C., & HSIEH, Y.L. ^1H NMR and ^1H – ^{13}C HSQC surface characterization of chitosan–chitin sheath-core nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 46-52, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.017>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PERINELLI, D. R., FAGIOLI, L., CAMPANA, R., LAM, J. K. W., BAFFONE, W., PALMIERI, G. F., CASETTARI, L., & BONACUCINA, G. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018 v. 117, p. 8-20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PETIT, J. M. & ZHU, X.X. ^1H and ^{13}C NMR Study on Local Dynamics of Poly(vinyl alcohol) in Aqueous Solutions. **Macromolecules**, v. 29, p. 2075-2081, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ma951502d>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PINTO, N. O. F., RODRIGUES, T. H. S., PEREIRA, R. C. A., SILVA, L. M. A., CÁCERES, C. A., AZEREDO, H. M. C., MUNIZ, C. R., BRITO, E. S., & CANUTO, K. M. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279–288, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.013>. Acesso em: 02 set. 2021.

QIAN, Y., ZHOU, X., ZHANG, F., DIEKWISCH, T., LUAN, X., & YANG, J. Triple PLGA/PCL Scaffold Modification Including Silver Impregnation, Collagen Coating, and Electrospinning Significantly Improve Biocompatibility, Antimicrobial, and Osteogenic Properties for Orofacial Tissue Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 41, p. 37381-37396, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b07053>. Acesso em: 16 ago. 2021.

QIN, Y., & LI, P. Antimicrobial Chitosan Conjugates: Current Synthetic Strategies and Potential Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, 499, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21020499>. Acesso em: 12 ago. 2021.

RAJA, M. A. G., KATAS, H., WEN, T. J. Stability, Intracellular Delivery, and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, e0128963, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128963>. Acesso em: 16 ago. 2021.

RAMPINO, A., BORGOGNA, M., BLASI, P., BELLICH, B., & CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219-228, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>. Acesso em: 09 ago. 2021.

RASHIDIPOUR, M., MALEKI, A., KORDI, S., BIRJANDI, M., PAJOUHI, N., MOHAMMADI, E., HEYDARI, R., REZAEI, R., RASOULIAN, B., & DAVARI, B. Pectin/Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles: Efficient Carriers for Reducing Soil Sorption, Cytotoxicity, and Mutagenicity of Paraquat and Enhancing Its Herbicide Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 5736-5745, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01106>. Acesso em: 10 ago. 2021.

RECILLAS, M., SILVA, L.L., PENICHE, C., GOYCOOLEA, F.M., RINAUDO, M., & ARGÜELLES-MONAL, W.M. Thermoresponsive Behavior of Chitosan-*g*-*N*-isopropylacrylamide Copolymer Solutions. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1633-1641, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm9002317>. Acesso em: 28 jul. 2021.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 02 set. 2021.

ROGINA, A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 296, p. 221-230, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.098>. Acesso em: 12 ago. 2021.

SALEHI, M., FARZAMFAR, S., EHTERAMI, A., PAKNEJAD, Z., BASTAMI, F., SHIRIAN, S., VAHEDI, H., KOEHKONAN, G. S., & GOODARZI, A. Kaolin-loaded

chitosan/polyvinyl alcohol electrospun scaffold as a wound dressing material: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Wound Care**, v. 29, n. 5, p. 270-280, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12968/jowc.2020.29.5.270>. Acesso em: 28 jul. 2021.

SALLAM, M. A. & ELZOGHBY, A. O. Flutamide-Loaded Zein Nanocapsule Hydrogel, a Promising Dermal Delivery System for Pilosebaceous Unit Disorders. **An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 19, n. 5, p. 2370-2382, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1087-z>. Acesso em: 28 jul. 2021.

SAMUELSON, R., LOBL, M., HIGGINS, S., CLAREY, D., & WYSONG, A. The Effects of Lavender Essential Oil on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 26, n. 8, p. 680-690, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/acm.2019.0286>. Acesso em: 31 ago. 2021.

SANG, Z., QIAN, J., HAN, J., DENG, X., SHEN, J., LI, G., & XIE, Y. Comparison of three water-soluble polyphosphate tripolyphosphate, phytic acid, and sodium hexametaphosphate as crosslinking agents in chitosan nanoparticle formulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, 115577, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115577>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SHAH, B. R., ZHANG, C., LI, Y., & LI, B. Bioaccessibility and antioxidant activity of curcumin after encapsulated by nano and Pickering emulsion based on chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. **Food Research International**, v. 89, p. 399–407, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.022>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SHEIKHOLESLAM, M., WRIGHT, M. E. E., JESCHKE, M. G., & AMINI-NIK, S. Biomaterials for Skin Substitutes. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 5, 10.1002/adhm.201700897, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adhm.201700897>. Acesso em: 11 ago. 2021.

SHI, L., & RONFARD, V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. **International Journal of Burns and**

Trauma, v. 3, n. 4, p. 173-179, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828736/pdf/ijbt0003-0173.pdf>.

Acesso em: 16 ago. 2021.

SHIN, J., KIM, Y., LIM, Y. M., & NHO, Y. C. Removal of Sodium Acetate in Poly(Vinyl Alcohol) and its Quantification by ¹H NMR Spectroscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 3179-3183, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.27453>. Acesso em: 09 ago. 2021.

SHPICHKA, A., BUTNARU, D., BEZRUKOV, E. A., SUKHANOV, R. B., ATALA, A., BURDUKOVSKII, V., ZHANG, Y., & TIMASHEV, P. Skin tissue regeneration for burn injury. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, 94, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>. Acesso em: 11 ago. 2021.

SILVA, N.C., SILVA, S., SARMENTO, B., & PINTADO, M. Chitosan nanoparticles for daptomycin delivery in ocular treatment of bacterial endophthalmitis. **Drug Delivery**, v. 22, n. 7, p. 885-893, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.858195>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SIVASHANKARI, P. R., & PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1382-1389, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043>. Acesso em: 12 ago. 2021.

SOFIA, J., & AMBARDEKAR, A. Pediatric burn resuscitation, management, and recovery for the pediatric anesthesiologist. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 33, n. 3, p. 360-367, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000859>. Acesso em: 11 ago. 2021.

STEIN, M. J., ARNAOUT, A., LICHTENSTEIN, J. B., FRANK, S. G., CORDEIRO, E., ROBERTS, A., GHAEDI, B., & ZHANG, J. A Comparison of Patient-Reported Outcomes between Alloderm and Dermacell in Immediate Alloplastic Breast Reconstruction: A Randomized Control Trial. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 74, n. 1, p. 41-47, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.08.018>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SUDHAKAR, Y., KUOTSU, K., & BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery-a promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 15-40, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.012>. Acesso em: 11 ago. 2021.

SUN, J., PERRY, S. L. & SCHIFFMAN, J. D. Electrospinning Nanofibers from Chitosan/Hyaluronic Acid Complex Coacervates. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 11, p. 4191-4198, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01072>. Acesso em: 12 ago. 2021.

SUNG, J. H., HWANG, M. R., KIM, J. O., LEE, J. H., KIM, Y. I., KIM, J. H., CHANG, S. W., JIN, S. G., KIM, J. A., LYOO, W. S., HAN, S. S., KU, S. K., YONG, C. S., & CHOI, H. G. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, p. 232-240, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.024>. Acesso em: 11 ago. 2021.

TAUFIQUE, Z. M., BHATT, N., ZAGZAG, D., LEBOWITZ, R. A., & LIEBERMAN, S. M. Revascularization of AlloDerm Used during Endoscopic Skull Base Surgery. **Journal of Neurological Surgery, Part B, Skull base**, v. 80, n. 1, p. 46-50, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1666851>. Acesso em: 16 ago. 2021.

TEMİZ, A., ALBAYRAK, A., PEKSÖZ, R., DIŞCI, E., KORKUT, E., TANRIKULU, Y., & ALBAYRAK, Y. Factors affecting the mortality at patients with burns: Single centre results. **Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi**, v. 26, n. 5, p. 777-783, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14744/tjtes.2020.37862>. Acesso em: 16 ago. 2021.

VEIGA, A., TOLEDO, M. G. T., ROSSA, L. S., MENGARDA, M., STOFELLA, N. C. F., OLIVEIRA, L. J., GONÇALVES, A. G., & MURAKAMI, F. S. Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC_{50%}, and IC_{90%} of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50-61, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>. Acesso em: 09 ago. 2021.

VIJAYAVENKATARAMAN, S., LU, W. F., & FUH, J. Y. H. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, 032001, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032001>. Acesso em: 12 ago. 2021.

YU, D. G., WANG, M., LI, X., LIU, X., ZHU, L. M., & ANNIE BLIGH, S. W. Multifluid electrospinning for the generation of complex nanostructures. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 3, e1601, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wnan.1601>. Acesso em: 12 ago. 2021.

WANG, C., CHIEN, H.-S., HSU, C.-H., WANG, Y.-C., WANG, C.-T., & LU, H.-A. (2007). Electrospinning of Polyacrylonitrile Solutions at Elevated Temperatures. **Macromolecules**, v. 40, n. 22, p. 7973–7983, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ma070508n>. Acesso em: 16 ago. 2021.

WANG, C., ZHANG, F., & LINEAWEAVER, W. C. Clinical Applications of Allograft Skin in Burn Care. **Annals of Plastic Surgery**, v. 84, p. S158–S160, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/sap.0000000000002282>. Acesso em: 13 ago. 2021.

WANG, S., YAN, F., REN, P., LI, Y., WU, Q., FANG, X., CHEN, F., & WANG, C. Incorporation of metal-organic frameworks into electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane with enhanced antibacterial activity for wound dressing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 9-17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.116>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WANG, X. Y. & HEUZEY, M. C. Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability. **Langmuir**, v. 32, n. 4, p. 929-936, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03556>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WESKA, R.F., MOURA, J.M., BATISTA, L.M., RIZZI, J., & PINTO, L.A.A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 749-

753, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.006>. Acesso em: 28 jul. 2021.

WU, Y., WU, J., CAO, J., ZHANG, Y., XU, Z., QIN, X., WANG, W., & YUAN, Z. Facile fabrication of poly(acrylic acid) coated chitosan nanoparticles with improved stability in biological environments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, p. 148-154, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.020>. Acesso em: 10 ago. 2021.

XU, Z., CHEN, X., TAN, R., SHE, Z., CHEN, Z., & XIA, Z. Preparation and characterization of a gallium-loaded antimicrobial artificial dermal scaffold. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, 110063, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110063>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ZAULYANOV, L., & KIRSNER, R. S. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 1, p. 93–98, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ciia.2007.2.1.93>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ZHANG, X., KANG, X., JIN, L., BAI, J., LIU, W., & WANG, Z. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3897–3906, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S168998>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ZHOU, Y., YANG, H., LIU, X., MAO, J., GU, S., & XU, W. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 88-92, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.013>. Acesso em: 12 ago. 2021.